



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“BIOSÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE LA
TOXINA DE VENENO DE ALACRÁN
TsTXK- β ”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Q U Í M I C A
P R E S E N T A
CLAUDIA NATHALLI GÓMEZ REYNOSO



MÉXICO, D.F.

AÑO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: M. en C. Francisco Rojo Callejas

VOCAL: Profesor: Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

SECRETARIO: Profesor: Dr. José Federico del Rio Portilla

1er. SUPLENTE: Profesor: Dr. Luis Tonatihut Sánchez Linares

2° SUPLENTE: Profesor: Dra. Nuria Esturau Escofet

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 1 DEL
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DE BIOMACROMOLÉCULAS Y
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR. INSTITUTO DE QUÍMICA.
UNAM**

ASESOR DEL TEMA: DR. JOSÉ FEDERICO DEL RIO PORTILLA

SUSTENTANTE: CLAUDIA NATHALLI GÓMEZ REYNOSO

“Nunca te das cuenta de lo que ya has hecho; sólo puedes ver lo que te queda por hacer”

Marie Curie, 1867-1934, química polaca nacionalizada francesa

Es de verdadera importancia para mí, agradecer a todas las personas que me han acompañado en este viaje que, sin duda, ha sido uno de los más enriquecedores de mi vida y que me ha motivado a seguir adelante.

Primero, quiero agradecer a Dios, porque desde mi perspectiva es la fuerza y luz que me ha guiado tanto como seres humanos como seres inteligentes, y que siempre tendrá un descubrimiento nuevo cada vez que decidamos buscar.

A la UNAM, la Facultad de Química y al Instituto de Química, porque gracias a estas tres instituciones he aprendido no solo conocimientos teóricos y prácticos de mi carrera, sino también valores y experiencias que no creo haber podido adquirir en algún otro lugar.

A Claudia, mi mamá, porque siempre has visto por mí y por la familia tan hermosa a la que pertenezco, nunca voy a terminar de agradecerte el haberme dado la vida y el seguirme apoyando siempre, en las buenas y en las malas, porque siempre me has escuchado con el corazón.

A Juan, mi papá, gracias por seguir siendo mi modelo a seguir, porque gracias a ti y todo tu esfuerzo, amor y regaños has hecho de mi una mujer más valiente, fuerte y viva, por siempre procurar por nosotras tres y por siempre impulsarme a ser mejor persona en todos los sentidos.

A Aline, hermanita, gracias por ser mi compañera fiel de juegos y confidencias, por venir al mundo a alegrar el mío, porque en ti, más que mi hermana, he encontrado a mi compañera de vida, que se que siempre estará ahí para escucharme, para seguir adelante y para regañarme también de vez en cuando.

A Jesús, gracias por ser un compañero, novio y amigo ideal, por estar ahí siempre, echándome porras y dándome un amor diferente, que me ha enseñado que estar en libertad no necesariamente es estar sola y a mirar siempre hacia adelante. También te agradezco por ser la persona especial e ideal que nunca busqué. Nadie como tú

A Xochitl, amiga y hermana, porque a lo largo de los años que ya llevamos de conocernos he encontrado en ti a esa persona alocada que me complementa, con

la que puedo hablar de lo que sea y con la que comparto momentos increíbles que, aunque ya no son tan frecuentes como en la prepa, siguen siendo igual de maravillosos.

A Fede, gracias por haber creído en mí, por darme una oportunidad de aprender de ti y de tu experiencia, este proyecto ha sido uno de los más fructíferos, del cual he aprendido a trabajar con algo que me gusta tanto, que a veces no es tan fácil como parece.

A mi abuelito Simón, por todo ese cariño inmenso que siempre me ha demostrado. A todos mis tíos, primos y sobrinos, tanto de la familia Gómez como de la Reynoso: Andrés, Agustina, Mago, Lupe, Felipe, Ma. de la Luz, Ale, Ana, Lulú, Olimpia, Mario, Vero, entre muchos, muchos otros, que siempre han visto por mí de alguna manera, a veces solo preguntando como estoy.

A todos mis amigos, tanto de la carrera como de la vida: Laura, Ara, Juan, Daniel, Gerardo, David, Eli, Nay, Thalía, los Goonies y muchos otros tantos que, de mencionarlos, tomaría otro tomo de más páginas de esta tesis, pero que sin duda, han tenido ese lugarcito en sus vidas diarias para compartir experiencias inolvidables.

A mis compañeros de laboratorio Iza, David, Laura, Emiliano y Fátima, gracias por brindarme su ayuda y amistad dentro de las labores del QB1. A Paty, por siempre tener un consejo, alguna que otra recomendación y porque no, alguna experiencia que compartir. A Belén, por haberme dado la oportunidad de conocerte y por haberme guiado a este proyecto. A Andrea, y Ángeles, por haberme brindado su amistad en algún momento, y por enseñarme a cerrar ciclos.

Por último, y no menos importante, a todas esas personas que ya no están presentes en este mundo, y que donde quiera que estén, sé que siempre me enviarán su cariño y su apoyo incondicional.

Agradezco el apoyo otorgado por PAPIIT con el proyecto IN205110, durante el periodo 2012-2 y 2013-1

ÍNDICE DE TEMAS

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	MARCO TEÓRICO	2
2.1.	TOXINAS	2
2.1.1.	<i>Clasificación (Familias)</i>	3
2.1.2.	<i>Canales de Potasio</i>	4
2.1.3.	<i>Toxinas de alacrán Tityus serrulatus</i>	5
2.1.3.1.	<i>TsTxK-β</i>	7
2.1.4.	<i>Nomenclatura de las toxinas</i>	9
2.2.	RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	10
2.2.1.	<i>RMN de Proteínas</i>	11
3.	OBJETIVOS	13
4.	HIPÓTESIS	13
5.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	14
5.1.	OBTENCIÓN DEL PLÁSMIDO	14
5.1.1.	<i>pET-32a</i>	16
5.1.2.	<i>Restricción</i>	17
5.1.3.	<i>Ligación</i>	18
5.2.	OBTENCIÓN DE TOXINA RECOMBINANTE	19
5.2.1.	<i>Transformación en cepas de E. Coli</i>	19
5.2.1.1.	<i>C41[®]</i>	20
5.2.2.	<i>Inducción con IPTG</i>	21
5.2.3.	<i>Lisado</i>	21
5.3.	PURIFICACIÓN	22
5.3.1.	<i>Cromatografía de Afinidad Metal-Quelato (CAMQ)</i>	22
5.3.2.	<i>Proteólisis</i>	23
5.3.2.1.	<i>Proteasa Trombina</i>	24
5.4.	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)	24
5.4.1.1.	<i>Columnas</i>	25
5.4.1.2.	<i>Gradientes</i>	26
5.5.	ESPECTROMETRÍA DE MASAS	27
5.5.1.	<i>MALDI-TOF</i>	28
5.6.	OBTENCIÓN DE ESPECTROS DE RMN	29
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
6.1.	OBTENCIÓN DEL PLÁSMIDO P _{ET} -32A MODIFICADO	30
6.2.	CINÉTICA DE SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN	33
6.3.	CINÉTICA DE CORTE (PROTEÓLISIS)	36
6.4.	PURIFICACIÓN POR CAMQ	37

6.5.	PURIFICACIÓN POR HPLC.....	38
6.6.	OBTENCIÓN DE MASAS POR LA TÉCNICA DE MALDI-TOF	41
6.8.	PREDICCIÓN DE ESTRUCTURAS: I-TASSER Y QWARK.....	50
7.	CONCLUSIONES	54
8.	BIBLIOGRAFÍA	55
	ANEXO I. PROTOCOLO DE PRODUCCIÓN DE TOXINAS, DESARROLLADO EN EL LABORATORIO DE QUÍMICA DE BIOMACROMOLÉCULAS 1. INSTITUTO DE QUÍMICA. UNAM.	58
	ANEXO II. DISOLUCIONES EMPLEADAS EN LOS PROCEDIMIENTOS DESCRITOS	68
	ANEXO III. PROTOCOLO DE OBTENCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	69

ABREVIATURAS

Cromatografía Líquida de Alta Resolución	HPLC
Cromatografía de Afinidad Metal-Quelato	CAMQ
Espectrometría de desorción-ionización por laser asistida por una matriz.....	MALDI-TOF
Resonancia Magnética Nuclear	RMN
Escherichia coli	<i>E. Coli</i>
Cepa de <i>E. Coli</i> C41	C41[®]
Cepa de <i>E. Coli</i> BL21(DE3)	BL21 (DE3)[®]
Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido	IPTG
Toxina β de veneno de alacrán <i>Tityus serrulatus</i>	TsK2
Toxina β de veneno de alacrán <i>Tityus serrulatus</i>	TsTXK-β
Toxina α de veneno de alacrán <i>Tityus serrulatus</i>	TsK4
Toxina α de veneno de alacrán <i>Tityus serrulatus</i>	TsTXK-α
Toxina β de veneno de alacrán <i>Androctonus australis</i>	AaTXK-β
Toxina β de veneno de alacrán <i>Mesobuthus martensii</i>	BmTXK-β
Concentración Inhibitoria al 50%	IC₅₀
Ácido Ribonucleico mensajero	ARNm
Ácido Desoxirribonucleico Circular	ADNc
Ácido Desoxirribonucleico	ADN
Reacción en cadena de polimerasa	PCR
Ensayo inmunosorbente enlazado a enzimas	ELISA
Protein Data Bank	PDB
Kilopares de bases, pares de bases	Kpb, pb
Región de ADN para la Codificación de 6 Histidinas	His-Tag[®]
Adenintrifosfato	ATP
Adeninmonofosfato	AMP
Medio de cultivo Lysogeny Broth	LB
Agua Deuterada	²H₂O
Acetonitrilo	ACN
Ácido sinapínico	SA
Ácido α-ciano-4-hidroxicinámico	CHCA
Ditiotreitol	DTT
Carbono alfa al residuo	Cα

1. Introducción

En la naturaleza existen alrededor de 1500 especies de alacranes distribuidos en los cinco continentes, diferenciados en distintas familias y grupos, de los cuales los más abundantes se localizan en el continente Americano [1]. Sin embargo, se ha observado que sólo 25 de estas especies pueden provocar un envenenamiento grave en los seres humanos [2]. Se han estudiado muchas características de ellos incluyendo su veneno, ya que resulta de interés farmacológico debido a que tiene una composición muy variada de sustancias neurotóxicas. Entre ellos se encuentran péptidos y proteínas que, en conjunto, le dan la toxicidad al veneno. Éstos péptidos, entre otras características, son afines y selectivos a canales iónicos de la célula transportadores de Na^+ y K^+ principalmente, lo que supone una actividad en ciertos tipos de células, por ejemplo, macrófagos [3, 4].

A pesar de esta aplicación importante de los venenos de alacrán, muchos de estos péptidos encontrados en ellos no han sido completamente estudiados. La estructura secundaria y el arreglo tridimensional ya han sido determinados, pero de la mayoría sólo se cuenta con la secuencia primaria de aminoácidos [5].

Por lo tanto, obtener la estructura espacial de estos péptidos es crucial para entender cómo se comportan, cuáles son sus características y estudiar su actividad biológica en los seres vivos [6]. Para estos estudios, es necesario aislar la molécula pura mediante diversos procedimientos. Normalmente, las cantidades de sustancias tóxicas obtenidas a partir del veneno son muy pequeñas. Por lo tanto, estos procesos de purificación son requisitos importantes para poder estudiarlos individualmente y saber sus características.

Obtener el péptido puro del veneno de alacrán es un proceso muy complicado y se obtienen generalmente con bajos rendimientos. Se han desarrollado técnicas de Biología Molecular [7] con las cuales, por medio del diseño de un gen y su inserción en cepas de *E.coli*, puede obtenerse una proteína recombinante de alta pureza, de rendimiento aceptable y con un plegamiento adecuado.

2. Marco Teórico

2.1. Toxinas

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la definición de toxina no está aún bien consensada en la comunidad científica. Sin embargo, dice que se entiende por una toxina como “toda aquella sustancia sintetizada por algún ser vivo sea planta, animal, microorganismo, virus, hongo; así como sustancias infecciosas o moléculas recombinantes, sea cualquiera su método de producción, incluyendo aquellas que sean producto de ingeniería genética y sean producidas por algún organismo vivo, o bien; cualquier isómero de alguna molécula venenosa, ya sea producto biológico, homólogo o derivado sintético de alguna sustancia encontrada en seres vivos; que causa efectos perjudiciales a la salud del ser humano” [8]. De acuerdo a esta definición, aún siendo una molécula recombinante la que se presentará a lo largo de ésta tesis, se le puede llamar toxina.

El campo de estudio que abarcan las toxinas es muy variado, ya que se han estudiado para encontrar antídotos de venenos de los mismos animales que pueden provocar la intoxicación, así como diversas aplicaciones en el ámbito de la medicina. Muchas de estas aplicaciones se deben a que las toxinas tienen una actividad muy específica sobre canales iónicos en ciertas células eucariotas. Por ejemplo, hay toxinas que regulan canales iónicos relacionados con la sinapsis de las células cerebrales. Inclusive se ha encontrado que ciertas toxinas presentan afinidad por células de características muy especiales, como las cancerígenas.

El veneno de un alacrán es una mezcla de componentes muy variados, entre los cuales existen sales inorgánicas, compuestos orgánicos de bajo peso molecular, iones metálicos, proteínas y péptidos pequeños. Estas moléculas conforman el veneno con un porcentaje entre el 90 y 95% [2]. Los péptidos pequeños son las toxinas, las cuales afectan blancos específicos como la membrana celular, receptores y canales iónicos, lo cual implica una serie de efectos tóxicos sobre el organismo, como la afectación del funcionamiento muscular, la desestabilización de la membrana muscular y el bloqueo del sistema nervioso, entre los más

importantes. Es importante destacar que aunque el veneno de un alacrán es una mezcla compleja, se ha logrado determinar su composición separando varias fracciones e identificando los componentes por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés, o bien, HPLC).

2.1.1. Clasificación (Familias)

Han sido diversos los trabajos que han clasificado a las toxinas en diversas familias, de acuerdo a su origen, su orden cronológico de aparición, sus interacciones con canales, sus estructuras, en inclusive de acuerdo a su potencia en diversos seres vivos. Pero la clasificación de las toxinas debe hacerse lo más comprensible posible para que sea una única nomenclatura. En el caso de las toxinas aisladas de los alacranes se ha encontrado que existen cuatro súper-familias, ordenadas de acuerdo a su actividad en canales iónicos, descritas de la siguiente forma:

- Familia 1: Contiene péptidos de 60-70 aminoácidos, unidos por cuatro puentes disulfuro, éstos modulan la actividad de los canales de Na^+ .
- Familia 2: Conformada por péptidos de cadenas cortas (30-40 aminoácidos) y largas (60-64) con tres o cuatro puentes disulfuro, estas bloquean los canales de K^+ .
- Familia 3: Contiene los péptidos tipo insecto-toxinas de cadena corta, de aproximadamente 36 aminoácidos con cuatro puentes disulfuro que presumiblemente bloquean canales de Cl^- .
- Familia 4: incluye péptidos que modulan canales de Ca^{2+} sensibles a rianodina.

De estas familias, la que es del interés de este trabajo es la Familia 2, ya que la toxina que se estudia presenta actividad sobre canales de potasio. Esta familia, de acuerdo con la descripción hecha por Miller y tomada por Tytgat [9, 10], puede subdividirse en cuatro tipos de toxinas, los cuales son:

- α -KTx: son péptidos conformados por una cadena de entre 23 a 43 aminoácidos, y cuyo motivo estructural predominante es el α/β estabilizado

por cisteínas, el cual se define por tener una hélice α y una hoja β conformada por dos hebras, ambas unidas por puentes disulfuro. Esta categoría de péptidos ha sido una de las más estudiadas. Se cuenta con más de 124 toxinas y están catalogadas en doce sub-familias [9, 11].

- **β -KTx o tipo escorpinas:** son péptidos conformados entre 45 a 68 aminoácidos. Se especula que tienen también un motivo estructural α/β estabilizado por cisteínas, además de un dominio de hélices α . Sin embargo, la estructura de ningún miembro de ésta familia ha sido determinada por algún método, simplemente se han hecho simulaciones [12] y comparaciones con algunas otras moléculas con las que son análogas como las defensinas.

Se tiene poca información acerca de su actividad, sólo se ha determinado para dos toxinas: TsTXK- β nativa [4] y BmTXK- β [13] recombinante.

- γ -KTx: son proteínas de 36 a 46 aminoácidos que bloquean sólo los canales ERG. Tienen de 3 a 4 puentes disulfuro y adoptan el mismo motivo que las α .
- κ -KTx: es la familia menos conocida puesto que recientemente se descubrió [5], se conforma por dos hélices α estabilizados por cisteínas.

2.1.2. Canales de Potasio

Los canales de potasio se encuentran en la mayoría de las células de los organismos vivos, y se les atribuyen un sinnúmero de funciones fisiológicas [14]. Son proteínas tetraméricas transmembranales que forman un poro acuoso a través del cual los iones de potasio (K^+) permean selectivamente. Se conocen diversas familias de canales de K^+ y están clasificadas de acuerdo a la señal fisiológica que los regula, entre las cuales se encuentran [15]:

- Regulados por voltaje, de los cuales existen doce familias, ordenadas de la K_{v1} a la K_{v12} .
- Activados por Calcio (Ca^{2+})
- Rectificador de entrada de K^+ desde el interior de la célula

- Canales tipo 2-P (cuyos dominios tienen esta forma)
- Regulados por proteínas G
- Regulados por poliaminas

Muchos de éstos canales se encuentran codificados en el ADN del ser humano, contándose entre 30 y 100 genes diferentes. La función de éstos canales es variada, dependiendo del tejido celular en que éstos se encuentren; pero regulan ciertos procesos biológicos y, en algunos casos, son responsables de ciertas patologías, tales como arritmias cardiacas, sorderas, epilepsia, diabetes y la mala regulación de la presión. Es por ello, que el estudio de estos canales y sus interacciones con diversas moléculas abre un campo de investigación interdisciplinario y de interés científico muy amplio.

En el caso de este trabajo se hablará brevemente de los canales regulados por voltaje, ya que se ha comprobado que la toxina aquí estudiada es activa contra este tipo de canales. En los canales regulados por voltaje el interior de la célula manda una señal eléctrica, con la cual el canal puede abrirse y dar paso al ión de potasio que requiere, y el mismo ión genera una corriente que indica al canal cuando cerrarse [16]. La selectividad de estos canales se debe al tamaño del poro del canal y a cierto carácter hidrofílico presente en el interior del canal dado por la presencia de algunos aminoácidos.

Las interacciones que tiene el canal con el medio externo a la célula hacen que ciertas moléculas, por ejemplo las toxinas, sean extremadamente selectivas a ciertos canales. En muchos casos, la posición de los aminoácidos en las toxinas es muy específica para la oclusión del poro del canal, conocido este fenómeno como “diada funcional”. En otros casos, el bloqueo de canales se da por medio de la inserción de la toxina en el canal, debido a que alguno de sus extremos tiene el tamaño adecuado. Por ello, la elucidación de estructuras tanto de toxinas como de canales abre paso a un estudio más completo de sus interacciones.

2.1.3. Toxinas de alacrán *Tityus serrulatus*

El alacrán *Tityus serrulatus* es una alacrán endémico de Brasil y es conocido como alacrán amarillo. Es uno de los alacranes más venenosos de la región. El estudio

de su veneno se ha incrementado debido a la cantidad de envenenamientos ocurridos a causa de la picadura de este alacrán. Junto con estos estudios, además de la búsqueda de un antídoto para el veneno, se han descubierto ciertas propiedades del veneno, entre ellas, que se conforma de una mezcla compleja de toxinas, sales y sustancias orgánicas que, en su conjunto, dan la toxicidad al veneno. Para ello, se han hecho diversos trabajos para identificar la mayoría de los componentes que lo conforman. Se ha observado que las toxinas de éste alacrán son activas hacia determinado tipo de canal iónico, y además, son muy específicas.

En el veneno del alacrán *Tityus serrulatus*, se han encontrado una gran variedad de toxinas, afines a canales de sodio, de potasio, reguladores de calcio y cloro. Todos estos canales se encuentran presentes en cierto tipo de tejidos celulares, y se prevé que las toxinas puedan ser utilizadas para fines terapéuticos, dependiendo de la afinidad que presenten.

La separación e identificación de los péptidos del veneno se ha logrado por medio de técnicas de cromatografía de líquidos. Mediante la degradación de Edman se han determinado las secuencias totales o parciales de los mismos y la realización de pruebas de MALDI-TOF para corroborar sus masas. Parte de estos experimentos ha dado la pauta para poder producir estos péptidos a través de Ingeniería Genética, lo cual favorecerá estudiar de manera individual sus características farmacológicas [17].

Por medio de la técnica de MALDI-TOF, se ha determinado la presencia de ciertas toxinas, así como su relación masa/carga (m/z). Así mismo, se ha determinado que algunos de los cálculos de masa hechos previamente son correctos para ciertas toxinas y erróneos para algunas otras, logrando obtener una referencia de las masas de los componentes encontrados en los venenos de las especie *Tityus serrulatus* [18, 19].

2.1.3.1. TsTxK- β

Este trabajo se centró en obtención y purificación de la toxina TsTxK- β , proveniente del veneno del alacrán *Tityus serrulatus*. Se ha descrito esta toxina y su actividad en canales de potasio de tipo 1.1 regulados por voltaje.

El descubrimiento de ésta actividad se dio después de que algunos autores comenzaran a estudiar los efectos del veneno de alacrán, específicamente de *Tityus serrulatus* en algunas células del organismo [20]. En dicha investigación, realizada en 1991; se reporta la comparación de la actividad de los venenos de diversos alacranes sobre sinaptosomas de neuronas de rata, con lo cual se identificaron tres tipos de canales de potasio controlados por voltaje:

- Independientes de calcio de dos tipos:
 - Inactivados de tipo A
 - No activados de corriente alterna retardada
- Activados por calcio (Ca^{2+})

Para poder obtener estos resultados, los autores obtuvieron un extracto soluble en agua del veneno y lo separaron por medio de HPLC. Determinaron que dos toxinas, nombradas TsK2 y TsK4, eran particularmente potentes y selectivas contra canales no activados regulados por voltaje, con un IC_{50} de 30 y 8 nM. También, observaron que la toxina TsK2 disminuye su eficiencia de bloqueo al purificarla por HPLC, pudiendo ser debido a un desplegamiento parcial. Además, observaron que si se combinan otras toxinas como la caribdotoxina, la α -DaTX del veneno de la serpiente *Dendroaspis angusticeps*; y la Lq_{K4} del alacrán *Leiurus quinquestriatus hebraeus* respectivamente; el efecto de bloqueo de la TsK2 se potencializa [20].

Tres años después en el trabajo de Rogowski, et.al. [4], se rectificó la información de ambas toxinas y se nombran como TsTXK- α (TsK4) y TsTXK- β (TsK2). En este trabajo se indica que la toxina TsTXK- β , mezclada con la toxina α -dendrotoxina de *Dendroaspis angusticeps*, tenía actividad en sinaptosomas de neuronas de rata, que contienen canales de potasio no activados por voltaje. Se determinó su

estructura primaria, pero sólo se obtuvo la secuencia de los primeros 45 aminoácidos.

En un trabajo posterior [3], se determinó la secuencia primaria de aminoácidos de ésta toxina mediante la extracción de ARNm de aguijones de alacranes de la especie, los cuales fueron transcritos a ADNc y luego amplificados por medio de una reacción de PCR. Este mismo se secuenció y, tras su análisis por pares de bases, se obtuvo la estructura primaria de la toxina, la cual es consistente con los estudios presentados anteriormente, pero en este caso, se obtuvo la secuencia completa, siendo ésta la siguiente:

```
1           10           20           30
M E R K L A L L L I L G M V T L A S C G L R E K H V Q K L V
           40           50           60
A L I P N D Q L R S I L K A V V H K V A K T Q F G C P A Y E
           70           80           87
G Y C N D H C N D I E R K D G E C H G F K C K C A K D
```

En ella, se observa que la toxina se acompaña de una cadena de aminoácidos adicional, la cual aparece subrayada. La proteína completa se conoce como proteína precursora de la toxina TsTXK- β , misma que al tener que ser expulsada por la glándula al momento de realizar una picadura, pierde los aminoácidos para dar pie a la toxina descrita en la referencia [4].

Esta estructura primaria se obtuvo comparando los trabajos ya realizados y mencionados [4, 3] y se comprobó gracias a los trabajos de Kalapothakis [21], en el cual se muestra la identificación de proteínas inmunogénicas por medio de pruebas de ELISA, partiendo también de ARNm de glándulas venenosas de alacranes y cuya secuenciación obtuvo la toxina que es del interés de este trabajo.

La toxina TsTXK- β se ha postulado como la primera toxina de una nueva clase de bloqueadores de canales de potasio. Sin embargo, aun no se ha determinado alguna estructura tridimensional de estas toxinas e, inclusive, se les ha relacionado con las defensinas, por el hecho de tener un pro-peptido señal, que se ha encontrado en éstas últimas. Al día de hoy no se han encontrado similitudes

con otro tipo de toxinas bloqueadoras de potasio debido a su longitud (60 aminoácidos).

La clasificación ya descrita por Rodríguez de la Vega, et.al. [5] coloca a la toxina junto con algunas otras encontradas en los alacranes *Androctonus australis* (AaTXK- β) y *Mesobuthus martensii* (BmTXK- β 1 y 2), que son las únicas toxinas encontradas que son similares en algún porcentaje con la toxina TsTXK- β .

Las aplicaciones que pueden derivar de la obtención de ésta toxina son variadas; van desde la determinación de aspectos funcionales y estructurales de los canales, así como su purificación mediante técnicas de cromatografía de afinidad; otra aplicación es el estudio de los sitios de unión de las toxinas, incluyendo su mecanismo [20].

2.1.4. Nomenclatura de las toxinas

De acuerdo a lo anteriormente mencionado, el campo de estudio de las toxinas se ha ido incrementando gradualmente debido a su amplio ramo de aplicaciones. Sin embargo, la mayoría de las veces las toxinas recién descubiertas no tienen una nomenclatura específica, hasta que se propuso una nueva en 2008 por King. En ella se pretende nombrar las toxinas de acuerdo al origen, a la actividad y a su parecido con otras, para poder así compararlas y clasificarlas de manera coherente. La mayor parte de las toxinas tienen un nombre arbitrario, en algunos casos se incluye la especie de donde se obtuvo, en otros solo algunos datos experimentales de su aislamiento [22].

La nomenclatura propuesta por King [22] se basa en su función y contra qué tipo de canales tiene actividad; el grupo de la que proviene junto con el tipo de biomolécula (TX, para toxina), la especie, la familia de toxinas a la que pertenece y el número de toxina, si existiera algún análogo de la misma especie.

Por lo tanto, para nombrar correctamente la toxina TsTXK- β , se tiene que bloquea canales de potasio regulados por voltaje tipo 1.x, simbolizado como κ ; proviene del alacrán *Tityus serrulatus* (Ts), del grupo Buthidae (BUTX) y es una toxina tipo β .

Por lo tanto, el nombre que se le debe asignar de acuerdo con ésta nomenclatura es:



Sin embargo, esta nomenclatura aun no ha sido aceptada por la comunidad científica, ya que muchos de los trabajos actuales y las bases de datos de las toxinas aún manejan los mismos nombres asignados a las mismas para poder identificarlas, o bien, se utilizan números de identificación en sistemas de información como el PDB o UNIPROT

2.2. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica espectroscópica de amplio uso en diversos ámbitos de la química, debido a que revela información precisa sobre la estructura y dinámica de las moléculas estudiadas por éste método. Tiene aplicaciones diversas en análisis químico, diagnóstico médico, investigación biomédica, caracterización de materiales e ingeniería química [23].

La RMN se basa en la propiedad del núcleo atómico de responder a un estímulo ocasionado por una onda de radiofrecuencia, al estar orientado con un campo magnético estable. Ésta respuesta tiene una duración mucho más larga que la respuesta de los electrones en otras espectroscopías y se puede detectar e interpretar en forma de un espectro, que se puede obtener haciendo una Transformada de Fourier [23].

No todos los elementos o isótopos pueden ser observables con la RMN. El *espín*, caracterizado por el número cuántico I , es el que determina si el núcleo es observado o no por la técnica. Los valores de espín que posee el núcleo para ser observable son números fraccionarios, el más común es $\frac{1}{2}$. Los núcleos atómicos con spin $\frac{1}{2}$ son ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , ^{19}F , entre otros. Cada núcleo tiene un valor de frecuencia característico, haciendo que la técnica pueda ser selectiva para un isótopo definido.

Por otra parte, el estímulo que se detecta en un experimento de RMN es la magnetización. Éste fenómeno es la suma de todos los momentos magnéticos

individuales de los núcleos producidos por el espín. Al estar orientada la magnetización, ya sea a favor o en contra del campo magnético aplicado en el eje Z, y recibir un impulso de radiofrecuencia, la magnetización del núcleo se modifica y se ocasiona que gire en torno al eje de aplicación del pulso de radiofrecuencias. La señal que se detecta es la componente en el eje Y como una fuerza electromotriz.

Las señales detectadas son afectadas por diversos factores: la posición de los núcleos en la molécula, el entorno electrónico, las interacciones intramoleculares y en algunos casos, la interacción con el disolvente en que se encuentren. Esto se ve reflejado en la posición de cada una de las señales y, conforme la molécula sea más compleja, el espectro se va volviendo más complicado de visualizar, ya que muchas señales se empiezan a superponer. En particular, la RMN de ^1H es una imagen de la estructura que tienen las moléculas.

2.2.1. RMN de Proteínas

Históricamente, el primer experimento de RMN realizado con una molécula biológica se reportó en 1954, en el cual se deseó observar el efecto de la hidrogenación del ácido desoxirribonucleico. Tres años más tarde, se reportó el primer experimento de ^1H de una proteína, la ribonucleasa. Sin embargo, pasaron otros 25 años para que se pudiera asignar un sistema de espín a una proteína completa, y así elucidar su estructura. En los siguientes años, la técnica de RMN adquirió un papel importante en la elucidación de estructuras no sólo en el área de química orgánica, sino que también juega un papel fundamental en la resolución de estructuras de moléculas biológicas. Esto es gracias al avance en la tecnología de los equipos y la evolución de los métodos empleados para la realización de los experimentos. Tales métodos incluyen la transformada de Fourier, la espectroscopía de dos y tres dimensiones, los magnetos superconductores y la mejora de los métodos computacionales [24].

Se encuentra bien documentado que el espectro de RMN de una proteína globular es mucho más complejo que si se empleara sólo la suma de las señales que se observarían con los aminoácidos constituyentes que la conforman. Esto se debe

principalmente al entorno químico que genera la misma proteína. Las diferencias que pueden encontrarse entre un espectro de ^1H RMN de una proteína plegada y una no plegada, puede explicarse por medio de las interacciones que se presentan con el disolvente. El desplazamiento químico puede determinarse con la estructura covalente de la proteína. Sin embargo, también puede verse afectado por la interacción de ésta última con el disolvente. Gracias a ello, los aminoácidos presentes en la proteína pueden distinguirse unos de otros dependiendo de su posición en la cadena y si se encuentran expuestos al disolvente o no [25].

En una proteína que se encuentra plegada, los estudios de RMN de ^1H pueden ser útiles para una primera aproximación del plegamiento de una estructura. Las señales que corresponden a los enlaces peptídicos, que usualmente se encuentran en un desplazamiento de 6-8 ppm, tienden a distribuirse a lo largo del espectro, llegando a situarse hasta 11 ppm. Si una proteína se encuentra desplegada, el desplazamiento químico se mantiene de 6 a 8 ppm.

En general, la RMN de una proteína es totalmente distinta a la de una sustancia orgánica simple por el hecho de ser macromoléculas y, además, ser polímeros conformados por diversos monómeros [26]. Su análisis requiere de la interpretación de los espectros que se obtengan, así como de la realización de cálculos de minimización de energía. Para ello, se consideran como ventajas de la RMN que se puede manejar la muestra en disolución, tal como se encuentran en los seres vivos, así como también es útil en el estudio de proteínas que no cristalizan y para observar sus interacciones.

3. Objetivos

- Optimizar los procedimientos de obtención y purificación de proteínas para establecer las condiciones de producción de la toxina TsTXK- β mediante técnicas de Biología Molecular.
- Caracterizar mediante espectrometría de masas y Resonancia Magnética Nuclear la toxina TsTXK- β .
- Determinar si la toxina tiene plegamiento por medio de la Resonancia Magnética Nuclear

4. Hipótesis

Se propone obtener la toxina TsTXK- β con plegamiento y puentes disulfuro por medio de una serie de técnicas de Biología Molecular y de purificación de proteínas, y que pueda caracterizarse por medio de las técnicas MALDI-TOF y RMN.

5. Metodología experimental

En este trabajo, se planteó obtener la toxina TsTXK- β por medio de técnicas de Biología Molecular. Las técnicas que se emplearon abarcaron desde el diseño del plásmido, pasando por la obtención de la proteína mediante síntesis microbiana, su purificación por medio de diversas técnicas para la realización de las pruebas de caracterización correspondientes.

Frecuentemente, las toxinas provenientes del veneno de alacrán se obtienen en cantidades muy pequeñas, ya que la toxina constituye tan solo el 1% de la mezcla; se requeriría de una gran cantidad de alacranes y de su veneno para poder obtener un rendimiento aceptable en el proceso de purificación [19]. Por ello, el apoyo de la Biología Molecular en la obtención de ésta toxina resulta importante debido a que se puede obtener una cantidad mayor de la toxina deseada.

Cabe destacar que los métodos que se describen brevemente en esta sección se encuentran desarrollados en el Anexo I, ya que parte del trabajo realizado fue realizar un protocolo para producir toxinas en general, las condiciones que se emplearon y modificaron en cada método se describen en esta sección. Así mismo, la composición de las disoluciones empleadas se encuentra detallada en el Anexo II.

5.1. Obtención del plásmido

Un plásmido es una molécula de ADN extra-cromosomal de doble cadena que se encuentran naturalmente en diversos tipos de bacterias, el cual se replica de manera independiente al cromosoma bacteriano [27]. Éstas moléculas de ADN codifican para una gran cantidad de moléculas, esencialmente enzimas, que confieren a la bacteria resistencia a ciertos antibióticos y metales pesados, o bien, que degradan moléculas orgánicas y producen toxinas, entre otras funciones [27].

Se han manipulado y utilizado como vectores para la inserción de ADN externo a la bacteria, de manera que se adapte a las necesidades de clonación. Estos diseños tienen diversas ventajas, entre las cuales se encuentran:

- Su tamaño, determinado por cadenas pequeñas, que fácilmente pueden aislarse y manipularse
- Su naturaleza circular que permite que el ADN sea mucho más estable durante su extracción
- Su origen de replicación que es independiente de la replicación del cromosoma bacteriano
- Su alto número de copias que permite la eficiencia de su extracción
- La presencia de marcadores seleccionables como los genes de resistencia a antibióticos, que permiten que sea sencilla la detección y aislamiento de las colonias portadoras.

La mayoría de los plásmidos están conformados básicamente por un origen de replicación autónomo, un conjunto de genes que confieren resistencias, marcadores de selección y un sitio múltiple de clonación, caracterizado por no estar presente en otras regiones del plásmido. Otra característica es que los plásmidos se pueden conservar por largos periodos a -20°C para utilizarse cuando sea necesario [27].

Existen numerosos tipos de plásmidos, entre los que se encuentran los pET. Éste tipo de plásmidos son comúnmente utilizados debido a que permiten una sencilla clonación, detección y purificación de proteínas marcadas.

La inserción del ADN al plásmido se realiza debido a que éste último contiene sitios de restricción únicos, de los cuales se hablará más adelante. Los plásmidos tienen sitios que codifican para optimizar la purificación de las proteínas marcadas, por ejemplo, contienen sitios de poli-histidinas, un sitio promotor de replicación T7, entre los más importantes.

Todos los plásmidos pET contienen un codón de paro (3 bases que indican la finalización de la expresión) en la terminación del inserto de ADN para permitir que sólo se genere la proteína de interés. Por último, y dependiendo del tipo de plásmido pET que se trate, será el marcador que codifique la resistencia que codifique, comúnmente β -lactamasa o resistencia a ampicilina (*bla*); y resistencia a kanamicina (*kan*).

El plásmido utilizado en este trabajo para la expresión de la proteína es el que se conoce como pET-32a.

5.1.1. pET-32a

Es un plásmido que permite expresar en cepas de *E.coli* por medio del promotor T7lac; es selectivo debido a que confiere resistencia a ampicilina; tiene numerosos sitios de restricción que pueden emplearse para insertar el ADN de interés, entre los cuales destacan los sitios NcoI, KpnI, EcoRI y BamHI; cuenta con un sitio de tiorredoxina con His-Tag. Tiene un peso de 5,9 kpb y un sitio de proteólisis de trombina y enterocinasa (Fig. 1) [28, 29]. Estas características son importantes debido a que la transformación de las bacterias y producción de la proteína de fusión dependen directamente de ellas, así como el procedimiento de purificación. Para poder emplear este plásmido, se debe de realizar una reacción de restricción y una de ligación.

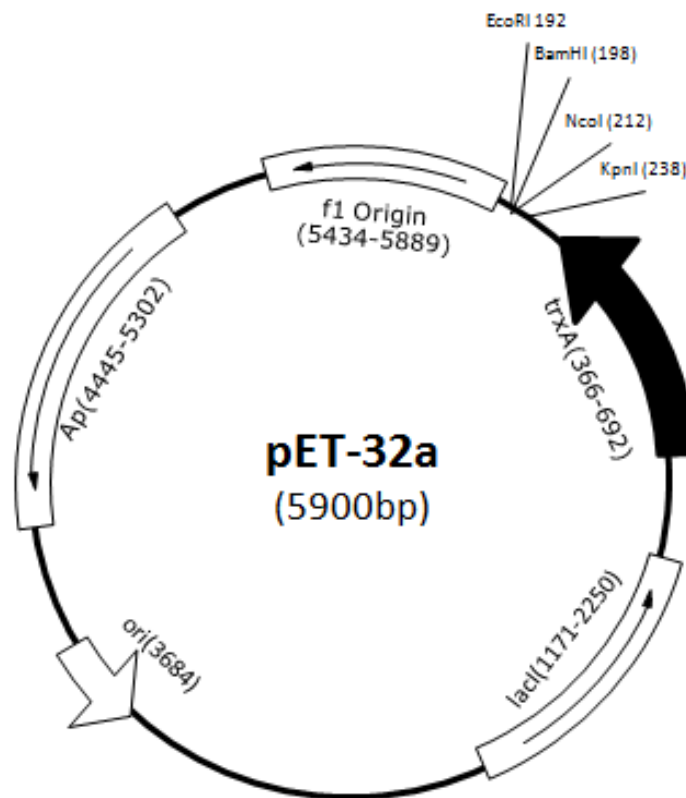


Figura 1. Estructura simplificada del pET-32a, mostrando los sitios relevantes de restricción, el sitio de resistencia a ampicilina, los orígenes de replicación y la tiorredoxina.

5.1.2. Restricción

La reacción de restricción consiste básicamente en hacer un corte en el ADN de interés en un sitio de reconocimiento muy específico marcado por una secuencia de bases blanco. Ésta secuencia de nucleótidos debe encontrarse en el plásmido que se restringirá. Se realiza por medio de enzimas de restricción, las cuales realizan una hidrólisis específica de los enlaces fosfodiéster de una secuencia de nucleótidos y, en su caso, al aumentar la temperatura, la separación de los puentes de hidrógeno.

Existen dos tipos de productos de restricción:

- Productos con extremos cohesivos. Se reconoce cierta secuencia de bases y se separa por el corte de los enlaces fosfodiéster y con un choque térmico se separan los puentes de hidrógeno, dejando de 4 a 7 bases sin aparear. Éste tipo de restricción es la más útil para la clonación debido a que es más sencillo aparear estos extremos para estabilizar a la molécula de ADN y permitir que se vuelvan a unir. [27]
- Productos con extremos romos. El resultado de la restricción es que las cadenas se han cortado simétricamente por la ruptura de los puentes fosfodiéster, sin dejar extremos cohesivos o bases sin aparear.

Las enzimas de restricción se seleccionan de acuerdo a los sitios con los que cuenta el plásmido. En este caso, se seleccionaron dos enzimas de restricción: BamHI y KpnI, debido a que ambas moléculas de ADN poseen esos sitios de corte y ambos sitios producen extremos cohesivos, lo que permitirá el reconocimiento selectivo de los mismos. (Fig. 2)

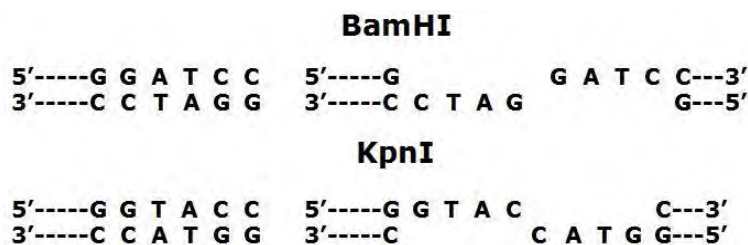


Figura 2. Representación en una letra de la secuencia palindrómica de nucleótidos que reconocen las dos enzimas utilizadas: EcoRI y KpnI

Para poder visualizar los fragmentos de ADN obtenidos, se cargó una muestra en un gel de agarosa, el cual separa las moléculas de ADN de acuerdo a su masa molecular, por medio de una corriente eléctrica. Dependiendo de su tamaño, se verán bandas que corresponden a cada fragmento obtenido. Posteriormente se purificaron estos fragmentos por medio de una técnica de extracción del ADN del gel [30] y continuando con una reacción de ligación.

5.1.3. Ligación

Una vez que ambos fragmentos se han purificado se procede a realizar una reacción de ligación, la cual consiste en poner en contacto ambos fragmentos de ADN en una mezcla con ligasa, en específico, la T4 ADN ligasa. La ligación consiste en la formación de enlaces fosfodiéster entre el extremo 5'-P de la molécula de ADN restringida y el extremo 3'-OH del otro fragmento restringido. Esta reacción consiste en tres pasos (Fig. 3):

- La ligasa es activada por una molécula de ATP, uniéndose covalentemente al AMP y libera un pirofosfato.
- El AMP se adhiere al fosfato del extremo 5', formando un enlace fosfoanhídrido
- Una vez realizada esta aproximación entre moléculas de ADN, se forma un enlace fosfodiéster entre los extremos 3' y 5' realizado por la ligasa.

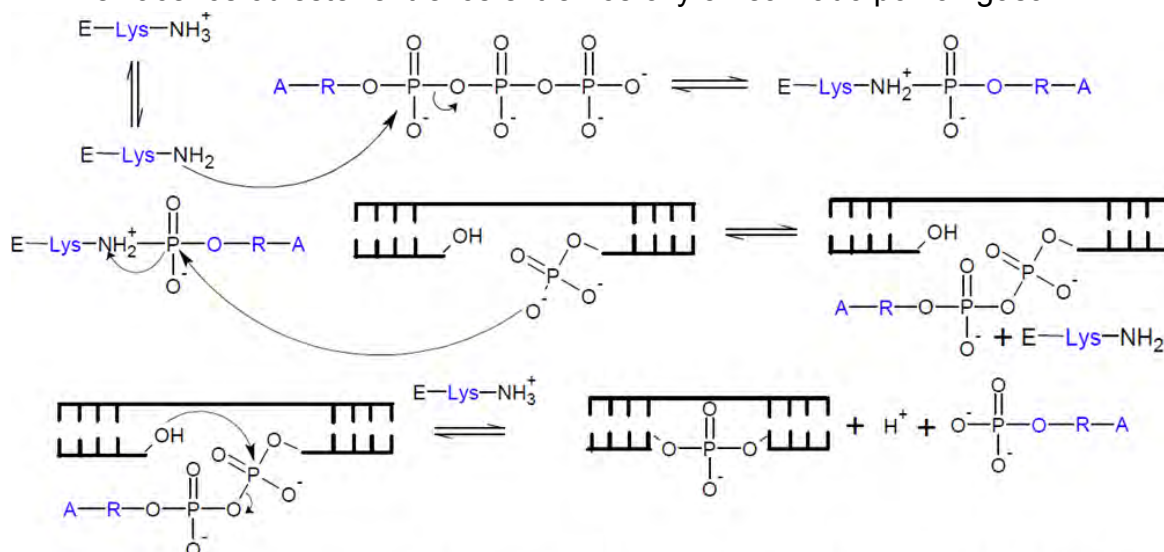


Figura 3. Mecanismo que ilustra la reacción de ligación. En él, la ligasa utiliza ATP para la formación del enlace fosfodiéster por medio de un residuo de lisina (Lys), el cual se une al AMP y realiza la catalisis.

El uso de la T4 ADN ligasa cataliza la formación del enlace fosfodiéster. Esta enzima es una de las más utilizadas, debido a su capacidad de formar puentes fosfodiéster tanto entre fragmentos con extremos romos como pegajosos [31].

La reacción para ligar los extremos de ambos fragmentos de ADN de interés de éste trabajo se realizó a temperatura ambiente (23°C), mezclando 1 µL de ligasa en concentración 400,000 unidades/mL en 20 µL de reacción, en los cuales debe incluirse el volumen que incluye la disolución de ADN que se ligará, así como una disolución amortiguadora a pH 7.5 que contenga el ATP, indispensable para llevar a cabo la ligación [32].

5.2. Obtención de toxina recombinante

Tras haber obtenido el plásmido clonado que codifica a la proteína de interés, se obtuvo la toxina por medio de su inserción en algunos tipos de cepas de *E.coli*, las cuales pueden albergar varias copias del vector. Mediante la inducción con IPTG se produjo la toxina deseada fusionada con una secuencia de tiorredoxina, llamada proteína de fusión. La tiorredoxina ayuda a plegar la toxina y a poder purificarla selectivamente.

5.2.1. Transformación en cepas de *E. Coli*

La transformación consiste en la inserción de un ADN foráneo a una célula conocida como célula huésped, ya sea por medio de electroporación o por tratamiento con cloruro de calcio. En ambos casos, la membrana de la célula es preparada para poder incorporar al ADN a su citoplasma. De manera más específica, la competencia de las células obtenida por cloruro de calcio consiste en exponer a las bacterias a una solución de cloruro de calcio saturada, tras éste procedimiento, están listas para ser transformadas, poniéndolas en contacto con el plásmido de interés [33]. Se sabe aun poco del proceso de transformación, sin embargo, se ha observado que las células poseen mecanismos variados para la incorporación de ADN externo por parte de la célula aceptora. Estos mecanismos incluyen la presencia de canales y proteínas que ayudan a adquirir el ADN [34].

El plásmido será incorporado una vez que la bacteria sea competente por medio de un choque térmico, primero se aumenta la temperatura a 45 °C y después se baja hasta 4 °C. Se comprueba posteriormente la efectividad de la transformación, sembrando un poco de estas bacterias en placas de agar con antibiótico. Si hay colonias, la transformación fue efectiva.

Uno de los organismos con mayor capacidad para albergar, propagar y expresar genes clonados es la bacteria *Escherichia coli*. En particular, una cepa muy particular y no patógena llamada *E. coli* K-12 se emplea para la transformación genética, debido a su gran capacidad de transferencia genética y de recombinación bacteriana. Además, la bacteria es de fácil y económico manejo y crecimiento, así como su material genético muy manipulable. De ésta cepa se derivan muchas otras, con diversas características como resistencias a antibióticos, la mutación de sus genes para optimizar la síntesis de proteínas recombinantes y la capacidad de facilitar su extracción por medio de una lisis eficiente. Específicamente, la cepa que se utilizó para la producción de la toxina se conoce como C41[®].

5.2.1.1.C41[®]

La cepa de *E. coli* C41[®] es una derivada de la cepa inocua BL21 (DE3). Tiene la particularidad de que se suprimen ciertos genes, lo que permite que pueda producir en grandes cantidades proteínas tóxicas, que en otras condiciones provocan la muerte celular y una baja producción [35, 36].

Estas características, además de permitir un rendimiento de producción alto y tener un bajo número de proteasas, son importantes debido a que se maneja una proteína de fusión que contiene en su secuencia una proteína tóxica, lo que en otras cepas podría explicar una baja producción de proteína recombinante.

A diferencia de otras cepas, la cepa C41[®] no tiene ninguna resistencia natural a antibióticos. Sin embargo, debido a la transformación, adquiere una resistencia a ampicilina, conferida por el plásmido.

5.2.2. Inducción con IPTG

El plásmido utilizado para la producción de proteína recombinante puede replicarse por medio del bacteriófago T7 ARN polimerasa bajo el control del Operón *lacUV5* [28]. La expresión de la proteína se lleva a cabo por medio de la adición de Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG). Este azúcar es un análogo de la lactosa que no es degradado por la bacteria, debido a la presencia de un átomo de azufre en su estructura. (Fig. 4) Esto permite que la expresión genética de la proteína de interés se mantenga inducida.

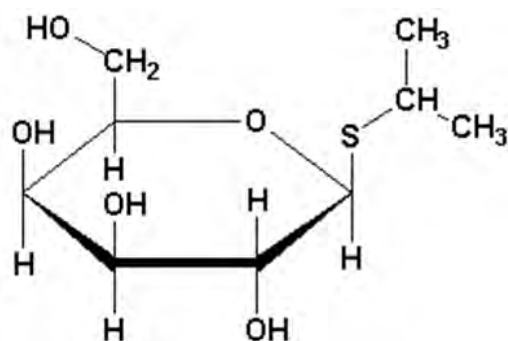


Figura 4. Estructura del isopropil- β -D-tiogalactopiranosido o IPTG, análogo de lactosa utilizado para la inducción de sobreexpresión.

En el presente trabajo se realizó la sobreexpresión de la toxina por medio del cultivo de la cepa C41[®] en medio LB (Anexo I). Se inoculó una colonia en 50 mL de medio por un periodo de 12 h, el cual se traspasó a un volumen de 6 L. Se llegó a la densidad óptica de 0.6 y se indujo con una concentración de 0.5 mM de IPTG. El tiempo de inducción determinó con una cinética de expresión, tomando muestras en un lapso de 24 h.

5.2.3. Lisado

Previo al procedimiento de lisado, las células se obtienen por medio de centrifugación del cultivo a 6000 rpm para remover el medio y se suspenden en búffer de lisis (Anexo II). Una vez obtenidas se aplican a las células choques ultrasónicos, mediante el uso de un sonicador. Éstas ondas ultrasónicas rompen la pared celular; tras ello, la proteína puede obtenerse ya sea en la fracción

insoluble, que contiene fragmentos celulares, partículas de membranas y organelos o puede obtenerse en la soluble.

Se utilizó un método de sonicado con 30 s de pulso y 1 min 30 s de descanso, en una potencia de 360 W y con un equipo Misonix 3000. Tras una centrifugación a 16500 rpm para separar ambas partes, puede procederse a la purificación de la proteína de fusión.

5.3. Purificación

La parte trascendente de la obtención de la toxina es su purificación. Ya se ha mencionado que después de la expresión de la proteína de fusión debe obtenerse en la fracción soluble, en este caso, la fracción soluble pasa por una serie de pasos para purificarla de otras proteínas propias de la célula que no son de nuestro interés. A continuación se describen los procedimientos que se requieren para realizar la purificación.

5.3.1. Cromatografía de Afinidad Metal-Quelato (CAMQ)

La proteína de fusión contiene fundamentalmente tres partes (Fig. 5):

- Una tiorredoxina, la cual favorece la solubilización y plegamiento de proteínas en el citosol.
- Una región de Poli-Histidina, la cual favorecerá su purificación por medio de cromatografía de afinidad, que está incluida en la tiorredoxina.
- Un sitio específico de proteólisis, que está diseñado para ser reconocido por la proteasa trombina, y que ayudara a obtener la toxina libre.
- La proteína de interés, en éste caso, la toxina TsTXK-β

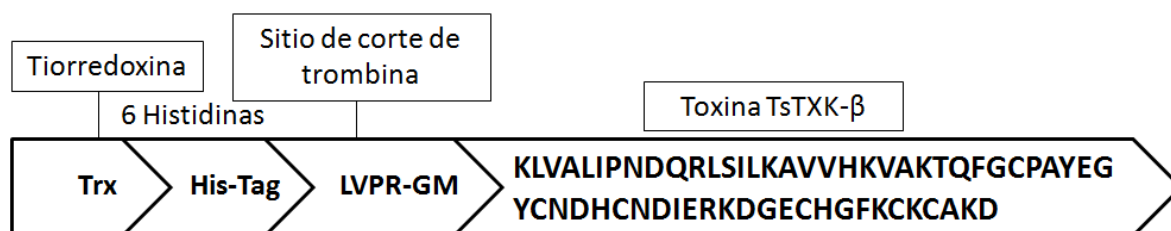


Figura 5. Representación esquemática de la proteína de fusión, en la cual se muestran las tres partes que la conforman

La cromatografía de afinidad metal quelato (CAMQ por sus siglas) consiste en la retención de cierto tipo de aminoácidos por medio de iones metálicos que se fijan en la matriz de una columna. La matriz es una red de Sepharose[®] que es una forma polimérica de la agarosa, que se encuentra en forma de esferas. En ésta caso, se empleó una columna que contiene Ni²⁺ que se coordina a la resina. Los residuos de aminoácido que son afines a Ni²⁺ son principalmente las histidinas. Entonces, debido al contenido de una poli-histidina en la proteína de fusión se pudo purificar por medio de ésta técnica. Para ello, se hizo pasar la disolución de lisado previamente filtrada por una columna Hitrap[®] cargada con Ni²⁺, mediante el uso de una bomba peristáltica. Después, se eluye con una concentración de 500 mM de imidazol, el cual reemplaza los lugares ocupados por las histidinas por efecto de la concentración. Debido a que no es la única proteína que se puede quedar retenida en la columna, se efectuaron lavados con una disolución de 80 mM para eluir las impurezas que se pudieron quedar retenidas en la columna. La elución que contiene la proteína concentrada se desala por medio de diálisis unidireccional, para realizar una prueba de Bradford y conocer su concentración.

5.3.2. Proteólisis

La proteólisis consiste en la ruptura de los enlaces peptídicos. Puede darse de manera química o enzimática, siendo ésta última la más utilizada debido a su especificidad y rapidez, además de ser un método limpio.

Existen varias enzimas que realizan éste trabajo y que se emplean en Biología Molecular. Algunas se emplean integrándolas en la disolución de la proteína a cortar, algunas otras pueden unirse a esferas de agarosa y poder así recuperarlas de manera sencilla y práctica, conservando su actividad.

Las condiciones para que se lleve a cabo una proteólisis dependen de la estabilidad tanto de la enzima como de la proteína a cortar, así como del pH, el contenido de sales presentes en la disolución y si se encuentra algún factor que inhiba la actividad de la enzima. En el caso de éste trabajo se utilizó la proteasa conocida como Trombina.

5.3.2.1. Proteasa Trombina

La trombina es una proteasa que se encuentra en varios mamíferos, la que se ha estudiado más es la de humano y la de bovino, en este caso, la que se emplea en biología molecular es la trombina de bovino. La trombina tiene una masa molecular de 37 kDa y juega un papel clave en la coagulación de la sangre. Para su uso en biología molecular, tiene un sitio de reconocimiento general de algunos aminoácidos, en específico, el sitio de trombina que se emplea está conformado por los aminoácidos -LVPRGM-, en donde la trombina separa los aminoácidos R y G, dejando libre a la tiorredoxina y a la toxina. (Fig. 6)



Figura 6. Representación esquemática del corte con trombina de la proteína de fusión, en la cual se muestra el sitio del corte y los fragmentos que se generan

En específico, el corte se llevó a cabo en búffer de lisis. Se realizó una cinética de corte con estas condiciones, para establecer el tiempo óptimo de proteólisis y poder realizarla a mayor escala. Se utilizó la cantidad equivalente de trombina para cortar 1 mg de proteína de fusión.

Tras la reacción de proteólisis, se llevó a cabo otra purificación por medio de CAMQ, ya que hay que remover la tiorredoxina para facilitar su purificación. En este caso, la tiorredoxina debe quedarse retenida en la columna ya que su fragmento posee las seis histidinas. Después de este paso, se concluye la purificación de la proteína con la siguiente técnica.

5.4. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) [23]

La cromatografía es una técnica de separación ampliamente utilizada en el análisis químico. Se basa en que la muestra sea disuelta en una fase móvil que pasa a través de una fase estacionaria fija. Las dos fases deben elegirse de tal forma que los componentes que son retenidos por la fase estacionaria se mueven

más despacio que aquellos que no se retienen, lo que genera la separación de los componentes de la mezcla.

La calidad de la separación depende directamente de las interacciones de la muestra tanto con la fase estacionaria como con la fase móvil. Así mismo, depende del flujo de la fase móvil, del tamaño de partícula de la fase estacionaria, del tamaño del poro, de las diferentes cargas que cada fabricante de columnas incluye en la resina y de la difusión que pueda presentarse debida al paso de la muestra por la columna. La HPLC tiene la particularidad de ser una técnica rápida y, en muchos casos, separar compuestos de manera eficiente, dependiendo de la instrumentación y de la naturaleza de la muestra.

Principalmente, un equipo de HPLC consiste en un inyector, una columna de separación, un detector y un colector, así mismo, incluye una bomba de alta presión que permite que los eluyentes y la muestra diluida pasen de manera rápida por la columna y así pueda efectuarse la separación. Además, la fase móvil puede pasar por un degasificador, el cual eliminara los gases que pudieran estar disueltos en ellos, mismos que pueden interferir en la calidad de la separación.

Existen ciertos factores que afectan la separación de proteínas en un equipo de HPLC, mismos que se describen a continuación.

5.4.1.1. Columnas

Existe una numerosa cantidad de tipos de columnas, las cuales varían de acuerdo a su fase estacionaria, el material que se emplea para su relleno y el tamaño, el cual dependerá de la cantidad que se desea separar, siendo clasificadas en analíticas, semi-preparativas y preparativas. Dependiendo de la naturaleza de la muestra a separar se selecciona el tipo de columna que se utiliza para una óptima separación.

De acuerdo a esto, existen dos tipos de fases: normal y reversa. La fase normal se refiere a una columna que se conforma por una fase estacionaria polar, en la que se quedarán preferentemente retenidas moléculas polares y eluirán a mayor velocidad las que no lo son. Por otra parte, en la fase reversa las columnas son de

fase estacionaria no polar, lo cual deriva en la elución rápida de moléculas polares y la retención de las no polares.

La separación varía en función de las cadenas laterales con las que se recubra la fase estacionaria reversa; esto debido a las interacciones que se llevan a cabo al entrar en contacto con la muestra a purificar. Entre menor sea el número de carbonos de esta cadena, la separación será menos selectiva, dependiendo ello también del tamaño molecular de la muestra. Si la molécula posee un tamaño mayor a 10 kDa, la purificación se optimiza con un menor número de carbonos y con un tamaño de poro mayor.

En el caso de la separación de la toxina de los demás componentes presentes en la muestra, se emplearon dos columnas de fase reversa de C4 y C5 respectivamente, y con cada una se hicieron pruebas de purificación para determinar los tiempos de retención y purificar un lote de toxina de manera continua.

5.4.1.2. Gradientes

Existen dos formas de eluir una muestra:

1. Con una elución isocrática, que consiste en pasar un solo disolvente de forma continua
2. Un gradiente, en el que se utilizan dos o más disolventes, que difieren en cuanto a su polaridad y cuya mezcla se va variando conforme al tiempo.

El gradiente de disolvente que se emplee al inyectar la muestra depende del tipo de disolventes, de la columna utilizada y del flujo que se trabaje.

En el caso de la separación de proteínas, se emplea como disolvente principal H₂O, ya que se busca que la proteína se conserve lo más parecido posible a el medio nativo, constituido por H₂O; y el segundo disolvente es el acetonitrilo, debido a que es miscible con el agua, su viscosidad es baja, lo que permite mejores separaciones; y su punto de ebullición bajo permite separar la mezcla agua-acetonitrilo fácilmente. El acetonitrilo tiene un carácter no polar que permite que proteínas poco solubles sean separadas.

Por otro lado, la cantidad de disolvente que se emplea y los porcentajes que deben utilizarse, dependen en gran medida también de la columna que se utilizará y de la mezcla que se desea separar, ya que debido a sus propiedades pueden soportar ciertos disolventes, pH de trabajo o porcentaje de cada uno.

En el caso de la purificación se diseñó, optimizó y empleó un gradiente que toma en cuenta el tiempo de retención de la toxina y el tipo de columna empleado. Así mismo, se tomó en cuenta el tiempo empleado en la purificación de la toxina para mejorar el método.

5.5. Espectrometría de masas [23]

La espectrometría de masas engloba a una serie de técnicas analíticas empleada para la identificación de moléculas mediante su relación masa/carga, principalmente. Se basa en la formación de iones de las moléculas a analizar. Los iones producidos pasan a un detector que permite determinar el cociente masa/carga de las moléculas. Dependiendo de las diferentes técnicas, se obtendrá un espectro de masas distinto para cada una.

Existen varios tipos de métodos de ionización; entre ellos se encuentran la fuente de ionización gaseosa y la fuente de desorción. En la primera, se vaporiza la muestra y luego se le hace incidir un haz de electrones, los cuales la ionizan. Por otra parte, la desorción se realiza con muestras que son difíciles de vaporizar, ya sea por ser lábiles a altas temperaturas o no ser volátiles.

Las fuentes de iones también pueden clasificarse en duras y blandas. Las fuentes duras irradian al analito la energía suficiente para excitar a las moléculas; y posteriormente con la relajación se ocasione una ruptura de enlaces. La fragmentación proporciona información sobre su estructura. Por otra parte, la segunda sólo ocasiona poca o nula fragmentación, por lo tanto, se observa sólo el pico del ión molecular y proporciona información exacta de la masa.

La técnica utilizada en este trabajo es un análisis por desorción, debido a que las proteínas no soportarían la temperatura requerida para vaporizarla, además de que su masa es mayor a 10^3 Da.

5.5.1. MALDI-TOF

La espectrometría de desorción-ionización por laser asistida por una matriz (MALDI, por sus siglas en inglés de Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) es un método reciente que permite saber con precisión la masa molecular de biomoléculas polares cuya masa molecular superan los miles de daltons. Consiste en colocar una pequeña muestra de la sustancia a analizar en una matriz que absorbe de manera intensa la radiación laser, la cual promueve la desorción e ionización tanto de sí misma como del analito. La desorción produce los iones que serán detectados posteriormente por un analizador de masas, donde el más utilizado es el denominado de tiempo de vuelo (TOF, por sus siglas en inglés de Time Of Flight).

Éste analizador detecta iones acelerados por un tubo de arrastre libre de campo mediante un campo eléctrico pulsante. La separación de los iones producidos está en función de su recorrido hasta el detector, el cual está situado al final del tubo. Las velocidades de los iones acelerados está en función de sus masas, por lo tanto, las partículas más ligeras y con mayor carga llegarán primero que las que tienen una mayor masa.

Los detectores de tiempo de vuelo tienen algunas ventajas como su amplio rango de masas detectables, su sencillez y el fácil acceso a la fuente de iones; sin embargo también deben ser altamente sensibles a diferencias de masas muy pequeñas, lo que supone una desventaja para su uso.

El equipo utilizado fue un espectrómetro de masas MALDI-TOF Flex Control Microflex[®] de Bruker[®], el cual cuenta con un laser de 337 nm de longitud de onda. Las matrices utilizadas fueron ácido sinapínico para masas moleculares mayores a 10 kDa y ácido α -ciano-4-hidroxicinámico para masas moleculares menores a 10 kDa.

La preparación de la muestra se realizó con el método de la gota seca, en el cual la matriz disuelta en un disolvente volátil, como acetonitrilo; es mezclada con el analito, para posteriormente depositar una gota en una placa de metal, misma que

luego se dejó secar. La proporción utilizada para los análisis realizados fue de 30 ng/ μ l.

5.6. Obtención de espectros de RMN

Para obtener los espectros de RMN, la muestra de 3 mg obtenida se disolvió en agua pura (MilliQ[®]), en una proporción 95:5 con $^2\text{H}_2\text{O}$. Se utilizó un tubo de resonancia de 3mm. Se empleó una secuencia de pulsos optimizada para eliminar la señal producida por el disolvente (H_2O). Sólo se realizó un experimento de ^1H , del cual se discuten los resultados más adelante.

6. Resultados y discusión

A lo largo de éste trabajo se desarrolló el método para obtener y caracterizar a la toxina TsTXK- β . Los resultados se presentan a continuación junto con su discusión.

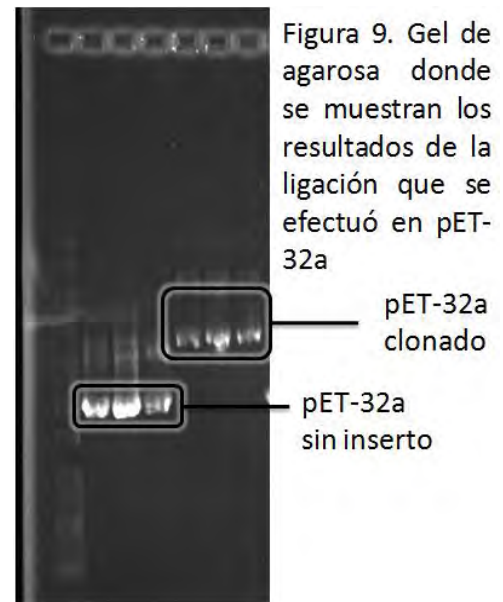
6.1. Obtención del plásmido pET-32a modificado

Para empezar a trabajar, se pidió a Epochlab sintetizar un gen que tuviera los nucleótidos necesarios para expresar la toxina de interés, el cual contiene los codones mostrados en la figura 7. Éste gen se recibió ligado con un plásmido comercial, el cual tiene los sitios de restricción para las enzimas KpnI y BamHI. El gen se obtuvo por medio de una reacción de restricción con éstas enzimas.

ATG
 Inicio
 AAA CTG GTG GCG CTG ATT CCG AAT GAT CAG
 K L V A L I P N D Q
 CTG CGT AGC ATT CTG AAA GCG GTG GTG CAT
 L R S I L K A V V H
 AAA GTG GCG AAA ACC CAG TTT GGC TGC CCG
 K V A K T Q F G C P
 GCT TAT GAA GGC TAT TGT AAC GAT CAT TGC
 A Y E G Y C N D H C
 AAC GAT ATT GAA CGT AAA GAT GGC GAA TGT
 N D I E R K D G E C
 CAT GGC TTT AAA TGC AAA TGC GCG AAA GAT
 H G F K C K C A K D
 TAG
 Stop

Figura 7. Codones requeridos y secuencia de aminoácidos de la toxina.

Por otra parte, en el laboratorio se cuenta con un plásmido pET-32a modificado, el cual, como ya se mencionó; ya tiene en si una resistencia a ampicilina y un sitio de codificación para tiorredoxina. Sin embargo, éste plásmido se encuentra mutado con el gen de otra toxina, por lo cual también es necesario realizar la restricción para poder extraerla. Se realizó una reacción de restricción con las enzimas BamHI y KpnI, mediante la cual se obtuvieron los fragmentos de ADN tanto para la toxina como el plásmido sin la toxina anterior. Para verificar que se diera la restricción de manera correcta, se corrió un gel de agarosa (Fig. 8).



Tras obtener estos fragmentos, se purificaron mediante un gel preparativo de agarosa con una columna de extracción de ADN. Después de la purificación se procedió inmediatamente a realizar una reacción de ligación con la enzima T4 ligasa, la cual dió como resultado un único plásmido, (Fig.9) que se insertó en la cepa de *E.coli* DH5α, para propagarlo. La inserción del plásmido a las bacterias dio origen a la obtención de colonias en una caja petri adicionada con ampicilina, de las cuales se tomaron cuatro colonias y se cultivaron toda la noche para obtener el plásmido por medio del uso de columnas de extracción de ADN QIAprep® Miniprep de QIAGEN® [37].

Tras la purificación del plásmido se cuantificó y se envió a secuenciar a Laragen® Sequencing para verificar el resultado de la ligación. El resultado de la secuencia del ADN junto con su traducción a aminoácidos se muestra en la figura 10, donde se puede observar que la ligación resultó satisfactoria.

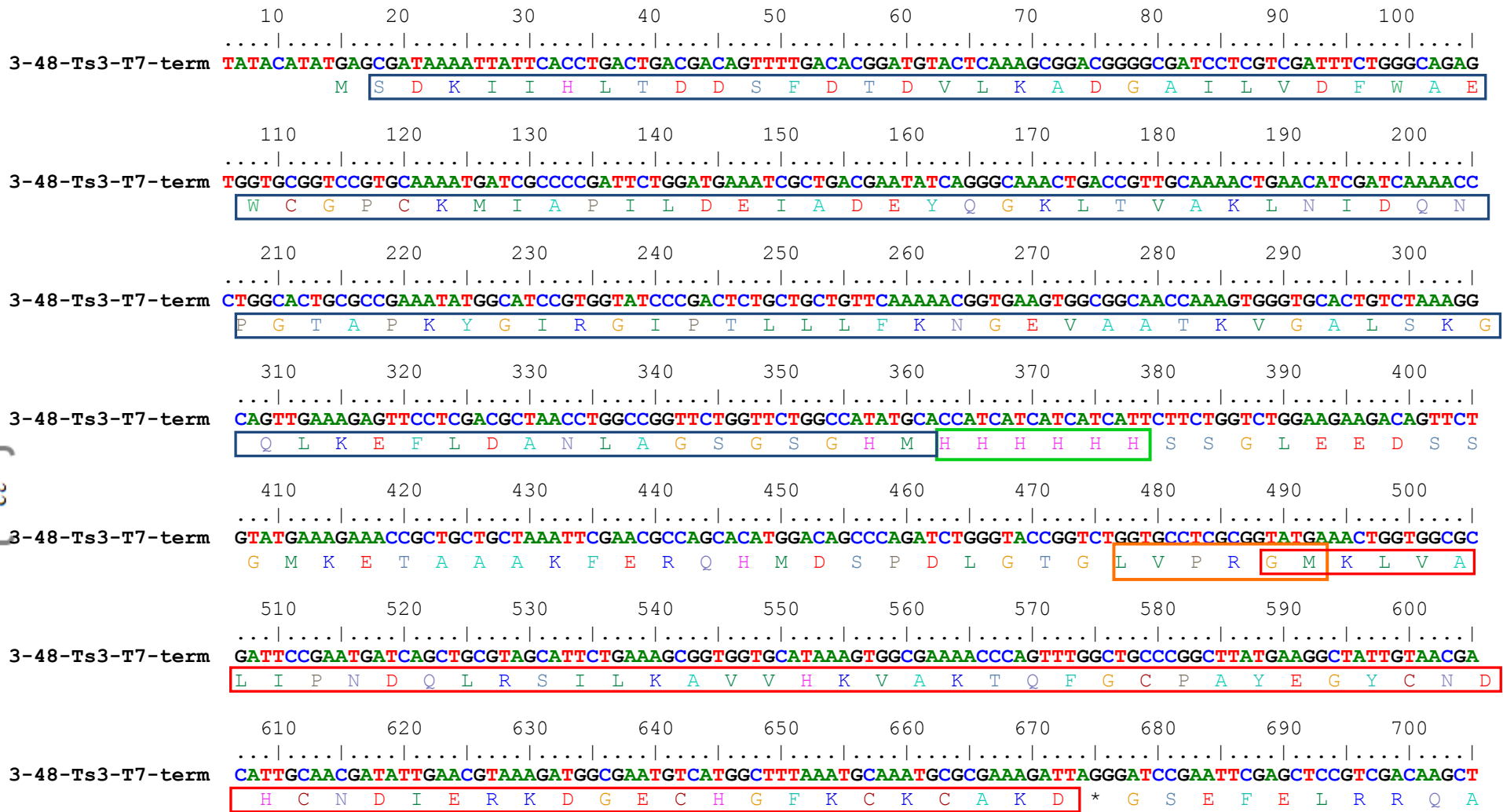


Figura 10. Resultados de la secuenciación del plásmido obtenido. Se muestran los nucleótidos (Negrita, arriba) y los aminoácidos (Normal, abajo), junto con los codones de inicio y paro. Se encuentra enmarcada con rojo la toxina, con azul la tiorredoxina, con púrpura el sitio de corte de trombina y con verde el sitio de poli-histidina.

6.2. Cinética de sobreexpresión de la proteína de fusión

Tras haber comprobado la secuencia de ADN, se procedió a transformar algunas de las cepas que se utilizan para la sobre expresión de proteínas: C41[®], Tuner[®], Rosetta[®] y BL21 (DE3) PyLys[®]. Tras 14 h de inducción a 37 °C, se centrifugó el cultivo, se lisó y se cargó un gel de poliacrilamida para observar la producción de proteína de fusión (Fig. 11). Puede observarse que la cepa con una mayor expresión de proteína es la C41[®], por lo cual se empleó para la producción de la proteína de fusión.

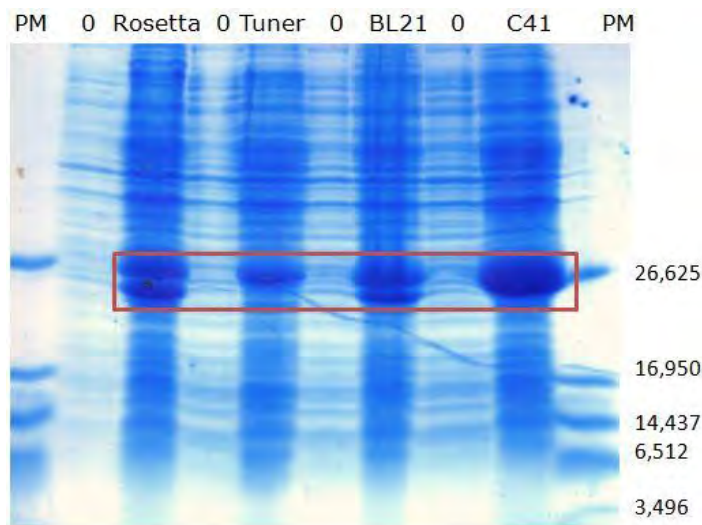


Figura 11. Gel de electroforesis con la expresión de 14 h de la proteína de fusión, indicada en el recuadro en rojo. La expresión se hizo en varias cepas, se observa que la de mayor producción es la cepa C41[®]

Para poder saber cuál es el tiempo que se empleará para obtener un máximo de expresión de la proteína de fusión, se realizó una cinética de producción. Se realizó a dos temperaturas: 30 °C y 37 °C y se monitoreó por 24 h, durante las cuales se obtuvieron muestras cada hora al principio y luego cada dos horas. Estas muestras posteriormente se lisaron y se separaron por centrifugado en sobrenadante y botón. Ambas fracciones se ordenaron y se cargaron en un gel de poliacrilamida cada uno (Fig. 12), en los cuales se observa que la proteína de fusión llega a una meseta a las 12 h de producción, además; la mayor parte de la

proteína de fusión es soluble, ya que se encuentra en el sobrenadante (geles no mostrados). Esto es imprescindible, ya que la purificación está diseñada para proteínas solubles.

Conociendo el tiempo de sobreexpresión, se trabajó con un volumen de producción de 6 L de cultivo, el cual se indujo por 12 h y se centrifugó a 6000 rpm para separar las bacterias del medio y posteriormente lisarlas. La purificación de éste lisado se llevó a cabo mediante CAMQ, y tras obtener la fracción que contiene a la proteína se desaló y cuantificó por la técnica de Bradford, obteniendo la grafica mostrada en la (Fig. 13). En la figura 13 se muestra que la concentración obtenida fue del orden de los 9 mg/mL de proteína de fusión.

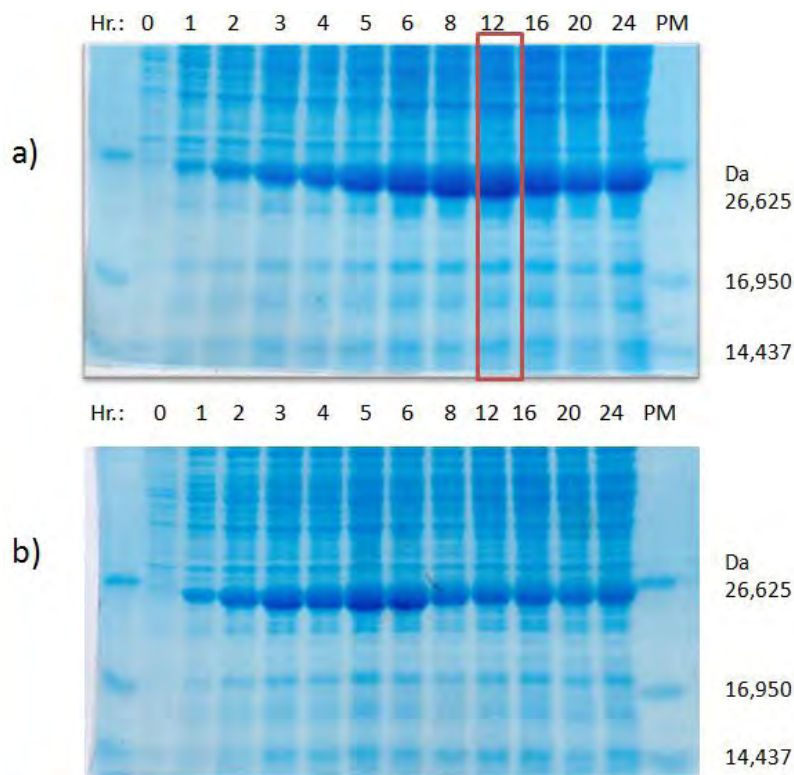


Figura 12. Geles de electroforesis para seguimiento de la cinética de expresión a dos temperaturas: (a) 30 y (b) 37°C respectivamente. Se puede apreciar que en el tiempo 12h de la inducción a 30°C hay una mayor sobreexpresión de la proteína de fusión.

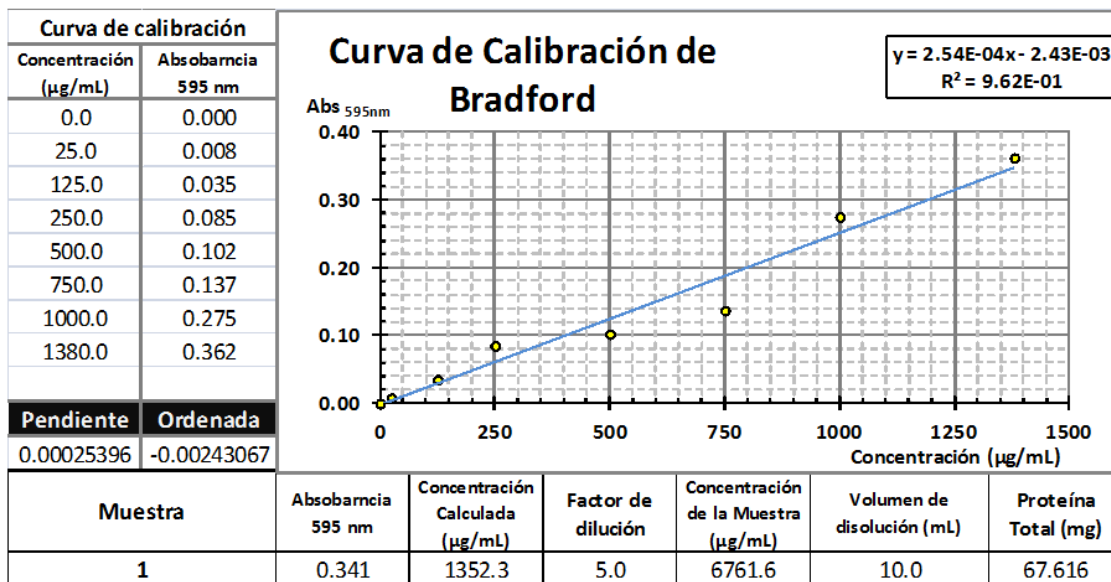


Figura 13. Gráfica y cálculo de la concentración por el método de Bradford de una de las producciones de proteína de fusión, después de ser purificada por CAMQ y desalada por diálisis.

Para seguir la purificación de la proteína de fusión, se tomaron muestras de cada paso de purificación y se corrieron geles de poliacrilamida, con los cuales se podía observar la pureza de la proteína de fusión, así como para corroborar si se sobreexpresa correctamente (Fig. 14).

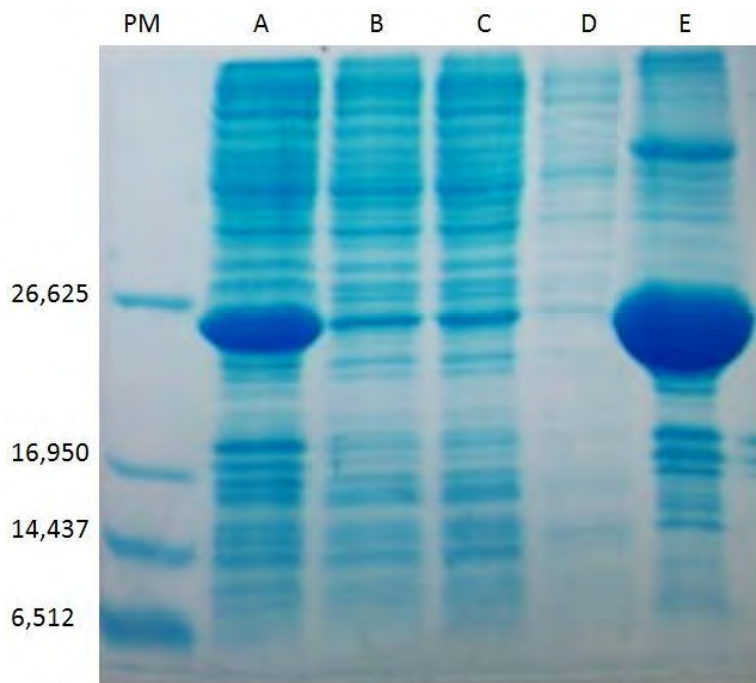


Figura 14. Purificación de la proteína de fusión por CAMQ. Se cargaron muestras: A) lisado; B) y C) lo que no se retuvo en la columna; D) lavado con 50mM de Imidazol; E) eluato con 500mM de Imidazol

6.3. Cinética de corte (Proteólisis)

Después de la cuantificación de la cantidad de proteína se realizó una cinética de corte (proteólisis), en la cual se colocaron 100 μL de trombina unida a esferas de agarosa en un volumen de 1 mL que contenía 1 mg/mL de proteína de fusión. Se monitoreó la proteólisis por 24 h y se obtuvieron muestras que se cargaron posteriormente en un gel de poliacrilamida que muestra el tiempo en el cual la proteólisis llega a una meseta alrededor de las 12 h de reacción (Fig. 15). Este tiempo se empleó para realizar la reacción de corte de cada lote de proteína de fusión producido.

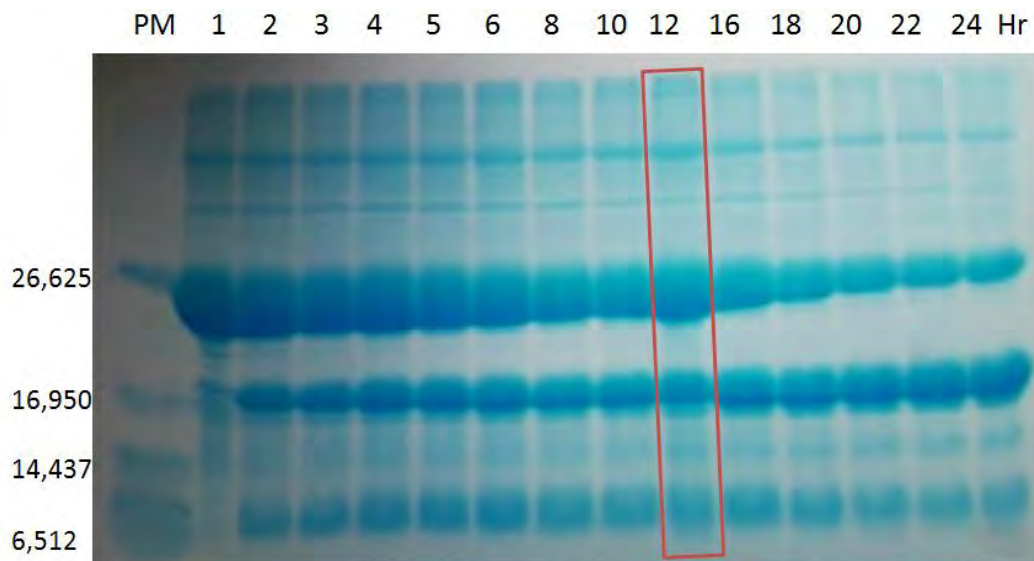


Figura 15. Cinética de corte de la proteína de fusión. A pesar de que el corte se sigue efectuando como se muestra, el tiempo 12h es donde se observa una eficiencia máxima de obtención de toxina.

Posteriormente, se tomó la cantidad suficiente de trombina necesaria para la concentración de proteína de fusión, la cual se diluyó de manera que se efectuara una proteólisis de manera eficiente. Al finalizar el tiempo de proteólisis se removieron las esferas de agarosa que contienen a la trombina; por medio de centrifugación para efectuar el siguiente paso de purificación y corroborar que la misma se llevó a cabo por medio de una purificación por CAMQ. Se observó un precipitado que corresponde a la proteína de fusión y la reacción se llevó a cabo con una eficiencia del 80%. El precipitado que se observa no afecta en el rendimiento de la reacción.

6.4. Purificación por CAMQ

Se realizó una segunda purificación por CAMQ para poder obtener la toxina sin el residuo de tiorredoxina. La purificación se monitoreó por medio de geles de acrilamida, obteniendo lo siguiente. (Fig. 16)

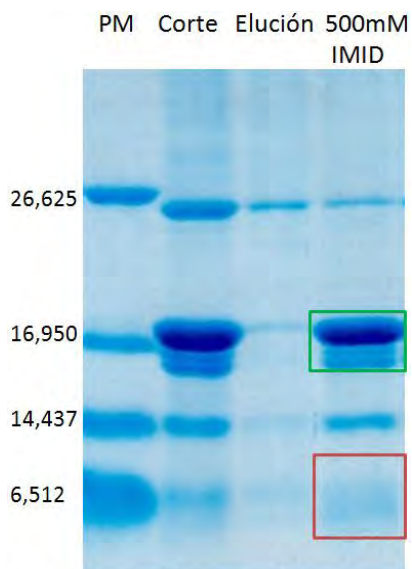


Figura 16. Purificación de la reacción de corte por CAMQ. Se puede apreciar en el cuarto carril como la toxina (rojo) es retenida por la columna de CAMQ y se eluye junto con el residuo de corte (verde).

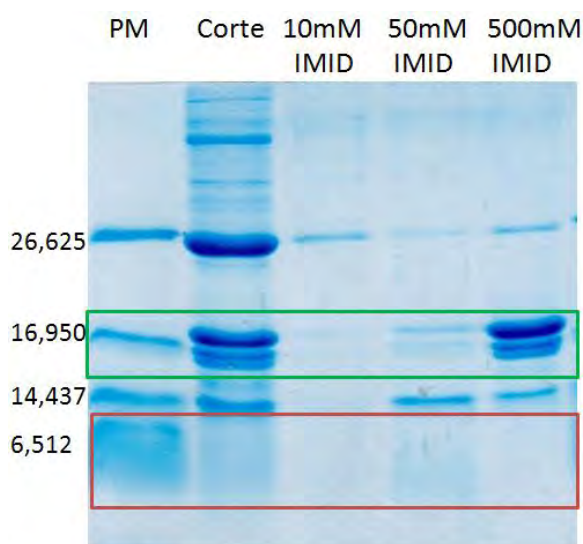


Figura 17. Purificación de la reacción de corte por CAMQ. Se puede apreciar en el recuadro rojo la zona donde eluye la toxina y en el recuadro verde el residuo de corte. A pesar del lavado efectuado, se puede apreciar que la toxina aun se encuentra impura.

En el gel de la figura 15 puede observarse que tanto el residuo del corte como la toxina se mantienen retenidas en la columna, por lo cual se realizó un lavado con 50mM de imidazol para eluir la toxina que se quedó retenida. El resultado de aplicar esta modificación se muestra en la Figura 17. En el gel se observa que si se eluye la toxina a esta concentración, a pesar de ser la toxina un poco retenida en la columna. Un factor que puede explicar ésta retención es que la toxina contiene en su secuencia tres histidinas, que si bien no se encuentran juntas en la secuencia de aminoácidos, es posible que se encuentren expuestas, y por lo tanto, la toxina se retenga.

Esta purificación es muy importante, ya que el siguiente paso requiere que la muestra este lo más pura posible para evitar problemas de purificación con la columna de HPLC.

6.5. Purificación por HPLC

La muestra se purificó en un último proceso mediante HPLC utilizando un equipo Varian® ProStar; con una columna C4 y, posteriormente, una columna C5. Ambas columnas están diseñadas para que se puedan purificar moléculas de una masa molecular superior a 10 kDa y además muy hidrofóbicas, ya que su matriz contiene una cadena corta que permite que las moléculas tengan poca interacción con la fase estacionaria y puedan eluir de la columna fácilmente.

Para poder optimizar un método de gradiente adecuado se inyectó primero una muestra de corte, para ver los tiempos de retención que presentaban en la columna y los porcentajes de acetonitrilo en los que se eluyeron las fracciones. Con base en los datos obtenidos se hicieron pruebas hasta obtener la mejor resolución posible.

Estas pruebas se realizaron para determinar las variaciones que se presentan en los tiempos de retención, y se encontró que el método que mejor se ajusta a la separación es el método que se muestra en la figura 18. En éste método se observa que se inicia con un 30% de ACN, subiendo gradualmente la concentración de ACN hasta 70%, se hace una pequeña variación de 1min, durante los cuales se mantiene la concentración de ACN entre 70 y 74%, para luego subir a 100% para un lavado de la columna, y al final se regresa a las condiciones iniciales.

Los resultados de la purificación de la toxina se presentan el cromatograma de la Figura 19. Básicamente, los tiempos de retención obtenidos con ésta columna fueron similares. En cada experimento se inyectaron 1000 µL, debido a que la concentración de la toxina después de la purificación por CAMQ disminuye al quitar de la disolución el imidazol que se utilizó para eluir, por medio de una columna de intercambio iónico, ya que éste método de desalado aumenta el volumen de la disolución de la toxina (Anexo I).

Por otra parte, en la columna C5 se hicieron algunas inyecciones inmediatamente después del corte, para poder optimizar la purificación y probar que la columna podía separar la mezcla de corte. Se obtuvieron separaciones de los dos

componentes de la mezcla; sin embargo, también se observó que la tiorredoxina se queda retenida en la columna. En la figura 20 se muestra uno de los cromatogramas obtenidos con ésta columna, en el cual se observa que la resolución mejora y la separación es más eficiente.

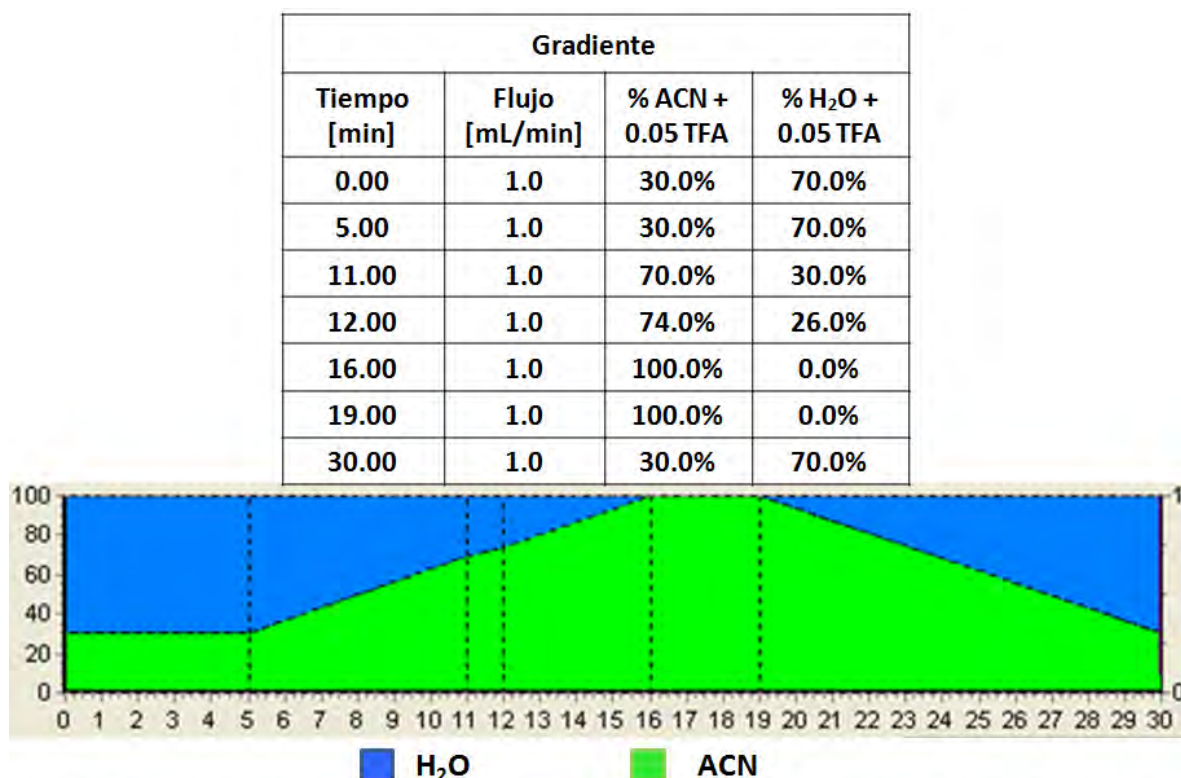


Figura 18. Gradiente de concentración de acetonitrilo utilizado en la separación por CLAR. Se muestra en la tabla el porcentaje y el tiempo correspondientes, y en la gráfica se puede apreciar como varía el gradiente con el tiempo.

Una vez purificada la toxina del residuo del corte y de la proteína de fusión, se liofilizó y se disolvió nuevamente en agua pura (MilliQ[®]), para hacer una prueba de retención en la columna C5. Se observa en la figura 21 que el tiempo de retención se conserva en 12 min, por lo que se procedió a seguir utilizando el gradiente ya descrito para las purificaciones posteriores. Cada fracción obtenida se separó y se mandaron a analizar por MALDI-TOF.

Inyección realizada en la Columna C4

Columna: YMC HPLC column, C4, 250 x 4.6 mm Tamaño de partícula 5µm
 Tamaño de poro 300Å
 Detección: UV-VIS a 280 nm
 Volumen inyectado: 1000 µL
 Fase móvil: H₂O + 0.05% TFA y ACN + 0.05% TFA
 Flujo: 1 mL/min

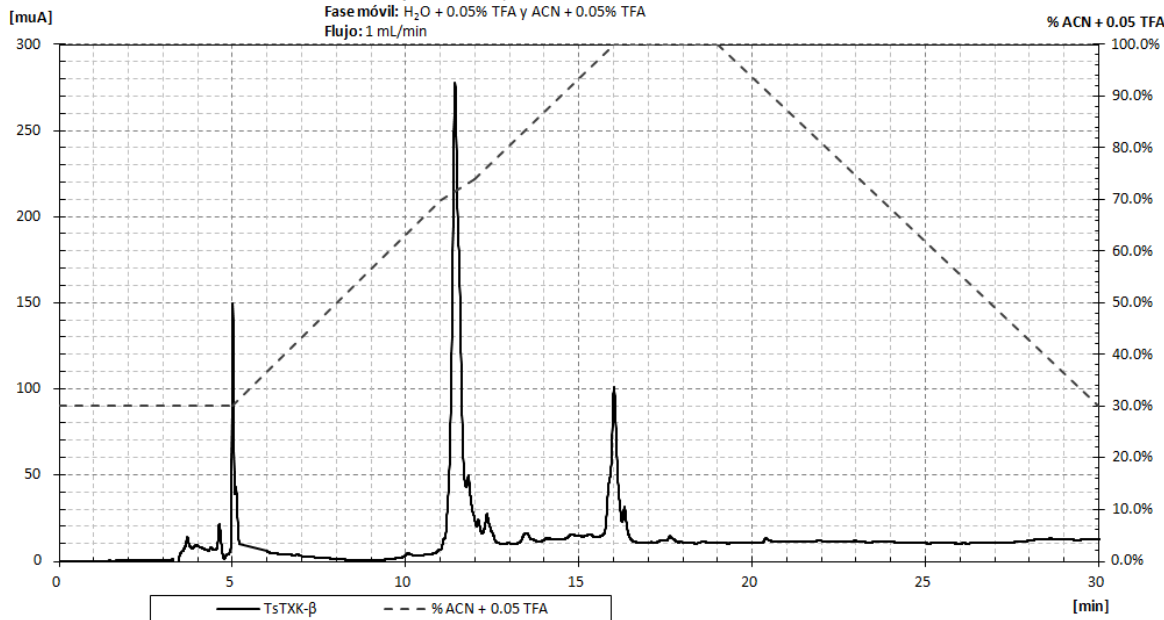


Figura 19. Cromatograma que presenta una inyección de la mezcla de corte en la columna C4. En él puede observarse en el min 12 la toxina, y en el min 16 un pico adicional. El pico observado en el min 5 corresponde a las sales presentes en la muestra inyectada

Inyección realizada en la Columna C5

Columna: Jupiter C5, 250 x 4.6 mm Tamaño de partícula 5µm Tamaño de poro 300Å
 Detección: UV-VIS a 280 nm
 Volumen inyectado: 1000 µL
 Fase móvil: H₂O + 0.05% TFA y ACN + 0.05% TFA
 Flujo: 1 mL/min

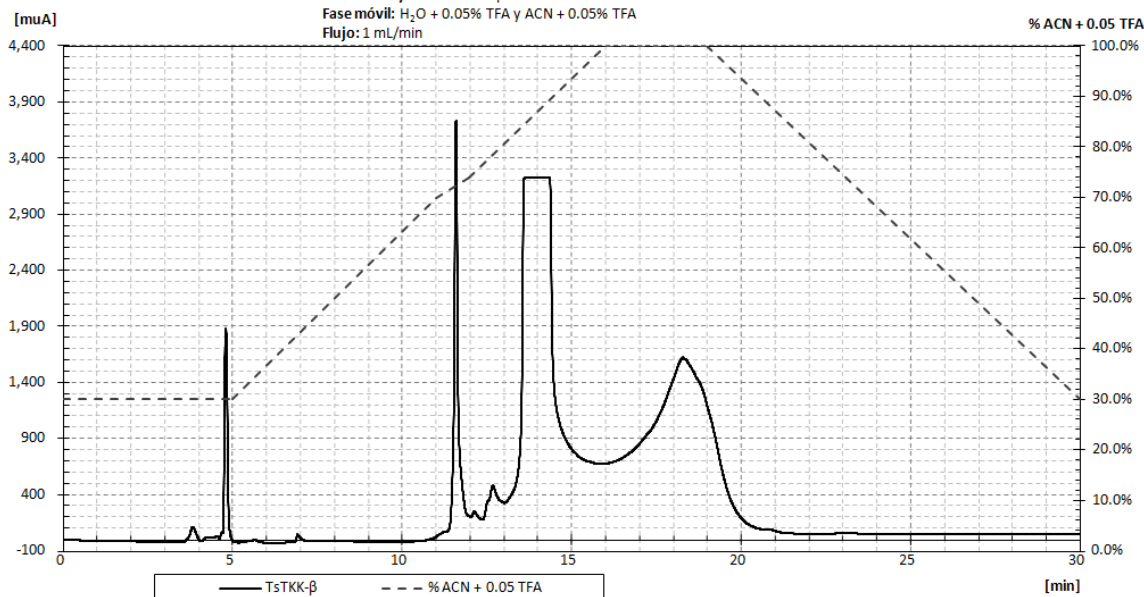


Figura 20. Cromatograma que presenta una inyección de la mezcla de corte en la columna C5. En él puede observarse en el min 11.5 la toxina, en el min 14 un pico adicional con un hombro, así como un pico en el min 17. El pico observado en el min 5 corresponde a las sales presentes en la muestra inyectada.

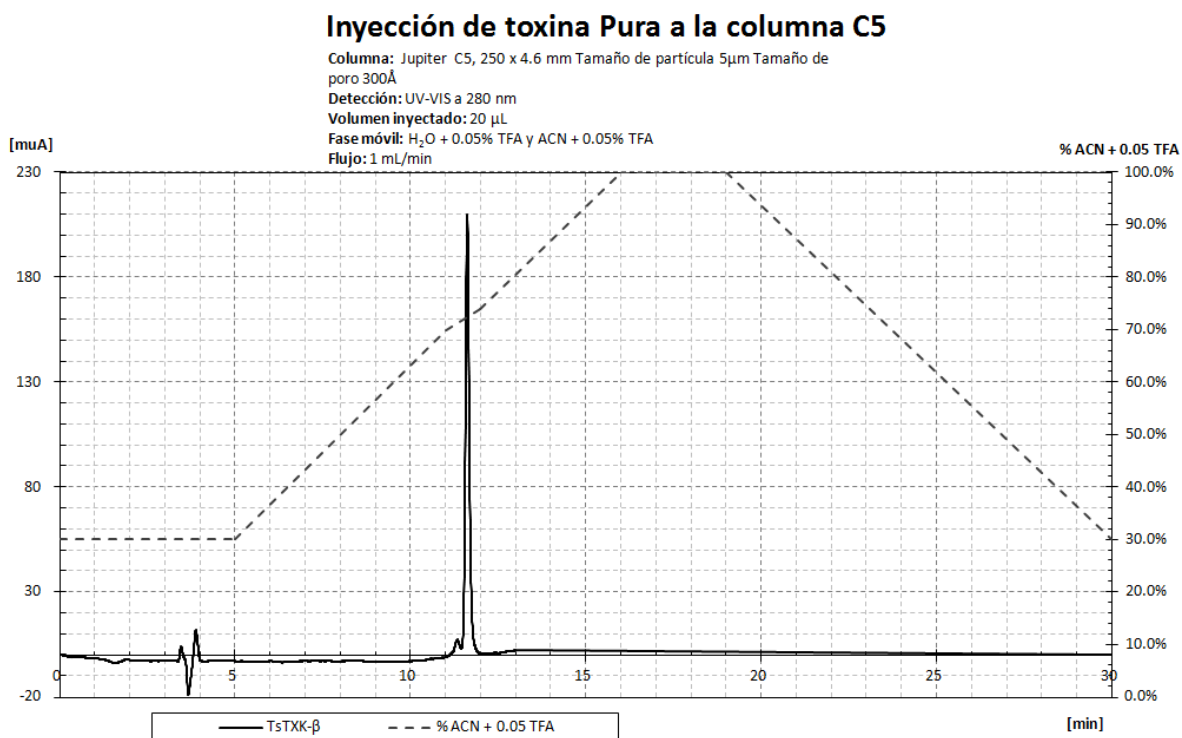


Figura 21. Cromatograma que presenta una inyección de la toxina pura en la columna C5. En él puede observarse en el min 12 la toxina, y en el min 5 el tiempo muerto, ya que esta muestra se diluyó en agua pura (MilliQ®)

Tras todo el procedimiento de purificación se juntó y pesó el producto. El peso total del producto fue de 3 mg. En total se realizaron seis producciones de 6 L cada una, y de cada una se obtuvieron 0.5 mg de toxina.

6.6. Obtención de masas por la técnica de MALDI-TOF

Cada fracción obtenida en la purificación por HPLC se liofilizó y se tomó una muestra para realizar una determinación de masas por medio de la técnica de MALDI-TOF. Se utilizaron dos matrices: ácido sinapínico (SA) y ácido α -ciano-4-hidroxicinámico. La masa teórica de la toxina, obtenida por el servidor ExPaSy® [38] es de 6911.02 g/mol, sin considerar puentes disulfuro. Considerándolos y calculado con el programa en línea de Innovagen® [39] se obtuvo que la proteína con puentes disulfuro debe tener una masa de 6905.02 g/mol (Fig.22). También se calculó la masa de la proteína de fusión y de la tiorredoxina, las cuales son 23,816.16 g/mol y 16,929.15 g/mol respectivamente. Esto es importante debido a que se tienen que reconocer las proteínas que eluyen en cada purificación.

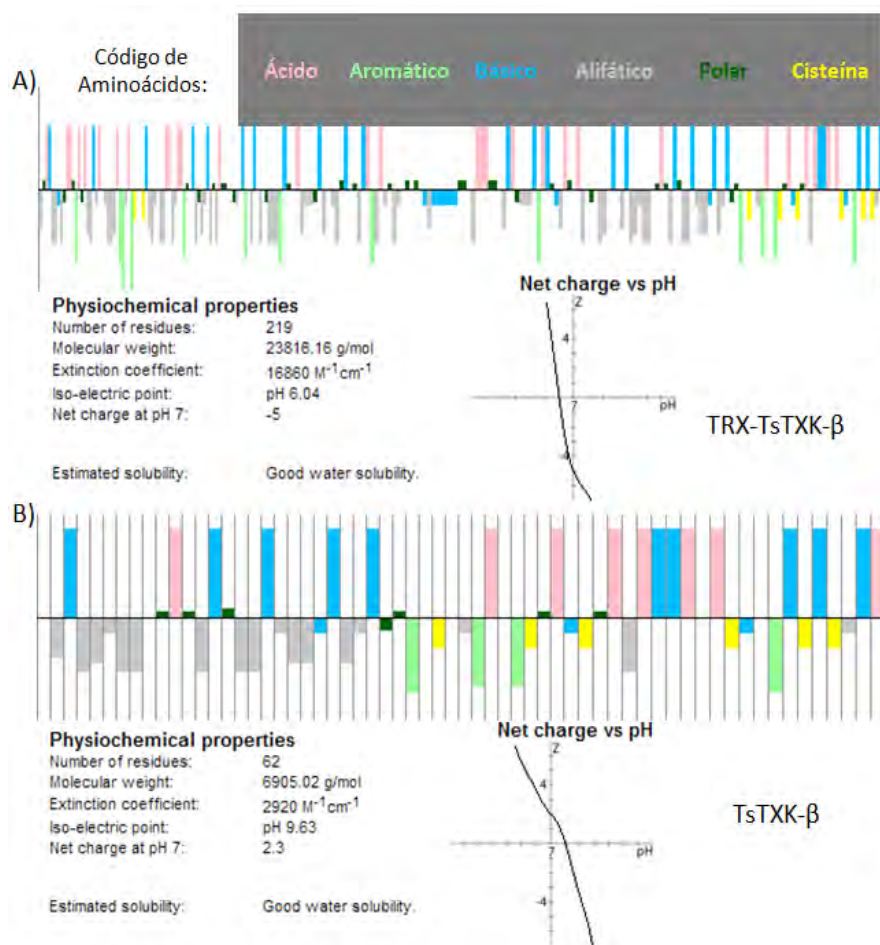


Figura 22.

Propiedades calculadas con el programa en línea: (39) “Property peptide Calculator®” de Innovagen® para la proteína de fusión (A) y la toxina TsTXK-β (B).

Se puede observar que ambas toxinas pueden presentar una buena solubilidad y se muestra el número de aminoácidos, así como el punto isoeléctrico y la masa molecular calculada.

Así mismo, se muestran las gráficas de hidropatía, con cada uno de los aminoácidos. El código de color representa a un tipo de aminoácido en la gráfica.

Dependiendo de la muestra obtenida de cada fracción de la separación en HPLC, se obtuvieron diferentes masas, ya sean correspondientes al residuo del corte o a la toxina. En algunos casos, como se mencionó anteriormente; se mejoró el método para optimizar la purificación de la toxina y separarla completamente de la tiorredoxina.

El espectro de la proteína de fusión, una vez purificada por CAMQ, se puede observar en la figura 23. La masa corresponde a la calculada por los servidores. La mezcla de reacción de corte se muestra en la figura 24, donde se pueden apreciar todos los fragmentos que se generan al finalizar la reacción. En el siguiente espectro (Fig. 25) se observa la masa del residuo de corte y la proteína de fusión, que en HPLC se colectó al minuto 18. En la figura 26 se aprecia la masa del pico colectado en 16 min, que corresponde al residuo del corte.

Una muestra purificada por HPLC se llevó directamente a masas y el resultado se muestra en la figura 27, misma que presenta una masa congruente a la toxina con tres puentes disulfuro. Se puede apreciar en el espectro de la figura 28 que la masa de la toxina varía en dos unidades de la masa de la toxina sin puentes disulfuro, calculada por los servidores. Ésta muestra es la que se mandó a RMN ^1H . Cada fracción que correspondió a la masa de la toxina calculada se reunió para así obtener una cantidad suficiente para la obtención de los espectros de RMN, la cual sumó un total de 3 mg de toxina, como se mencionó anteriormente.

Por otra parte, se separó un poco de la muestra para realizar una reacción de reducción de puentes disulfuro con DTT. Ésta reacción se realizó al disolver la toxina en agua pura (MilliQ[®]), con una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y se agregó una solución de DTT con una concentración de 100 mM. El DTT se debe añadir en exceso para garantizar que los puentes disulfuro se reduzcan y así poder determinar si es posible que la proteína se encuentre plegada.

El espectro de masas por MALDI-TOF se presenta en la figura 29b. En ella puede apreciarse que la toxina obtenida tiene tres puentes disulfuro, debido a que la masa aumenta en 6 Da comparada con la masa obtenida de la toxina antes de la reacción (Fig. 29a).

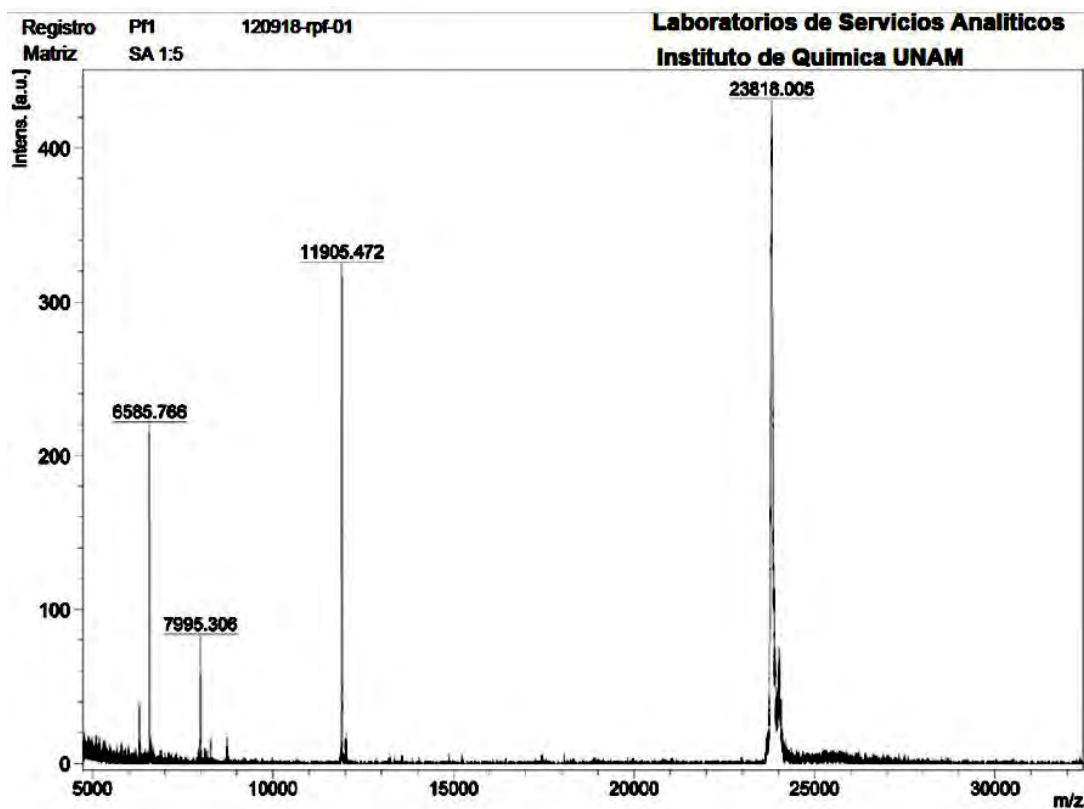


Figura 23. Espectro de masas que muestra la proteína de fusión, realizado a partir de la muestra purificada por CAMQ. Se realizó en matriz SA.

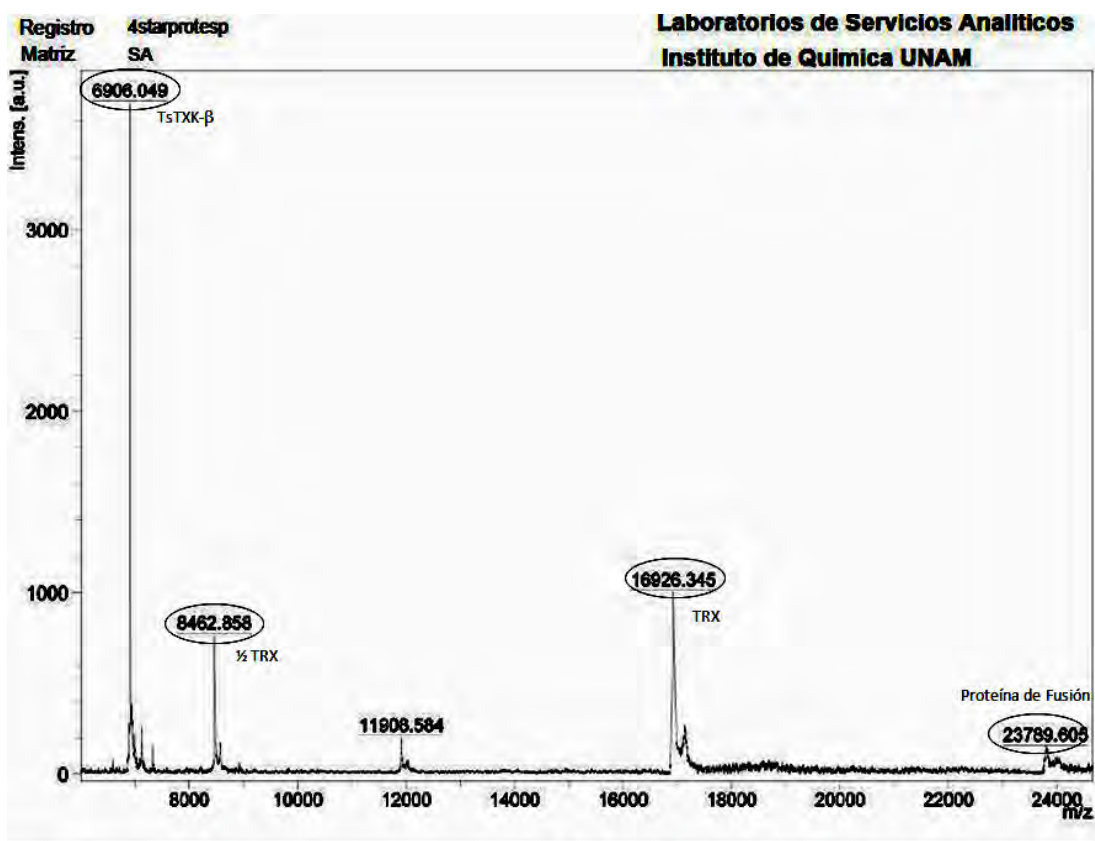


Figura 24. Espectro de masas que muestra la proteína de fusión, la tiorredoxina, y la toxina, realizado a partir de una muestra de corte. Se realizó en matriz SA.

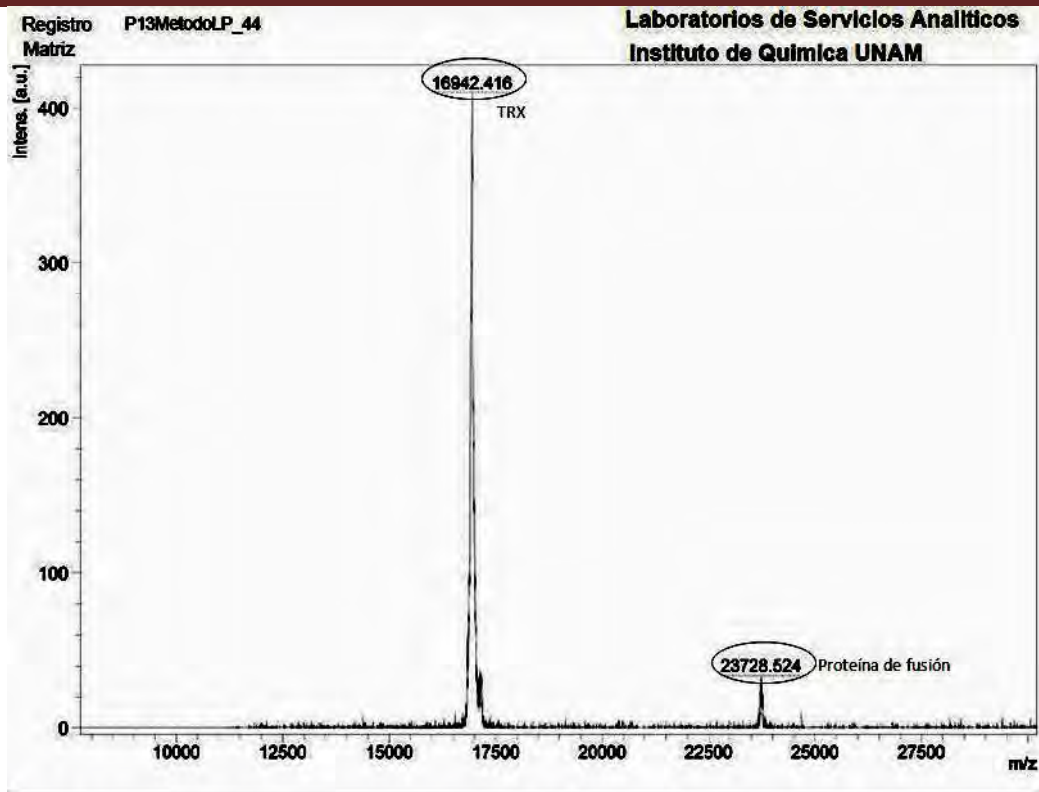


Figura 25. Espectro de masas que muestra la proteína de fusión y la tiorredoxina, realizado a partir del pico de 18 min de elución de la columna de HPLC. Se realizó en matriz SA.

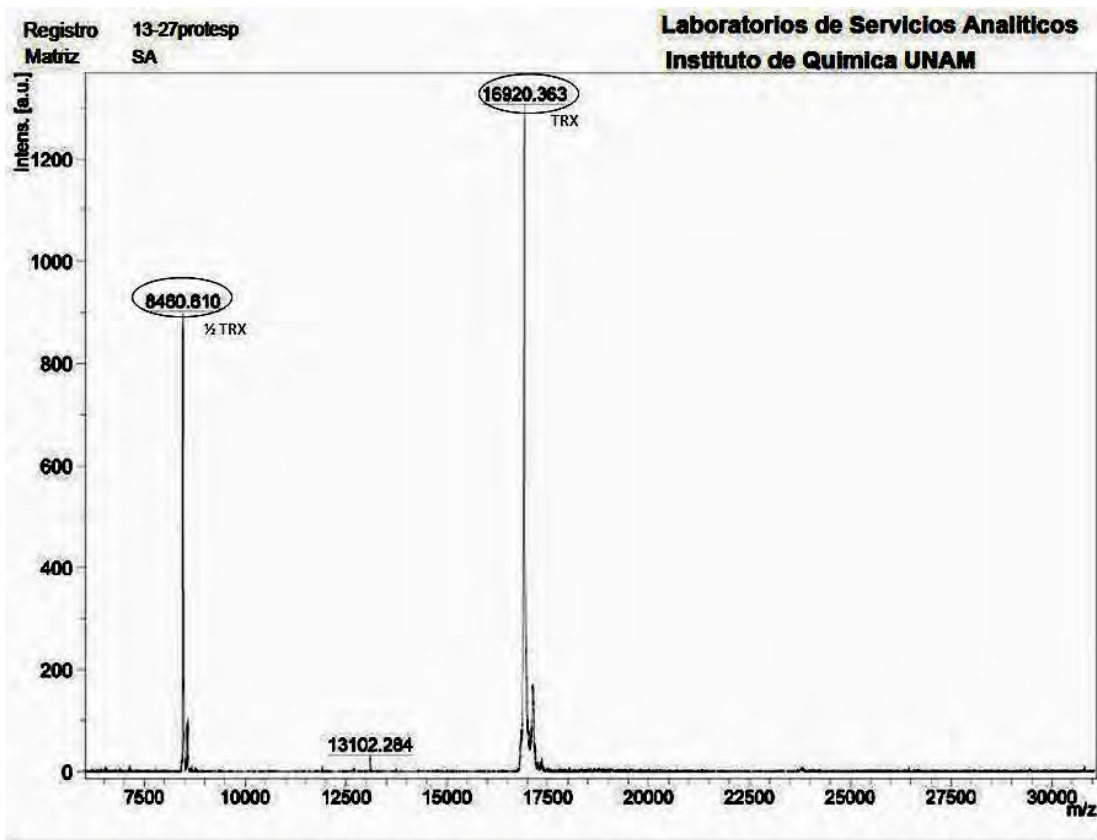


Figura 26. Espectro de masas que muestra la proteína de fusión, realizado a partir del pico de 18 min de elución de la columna de HPLC. Se realizó en matriz SA.

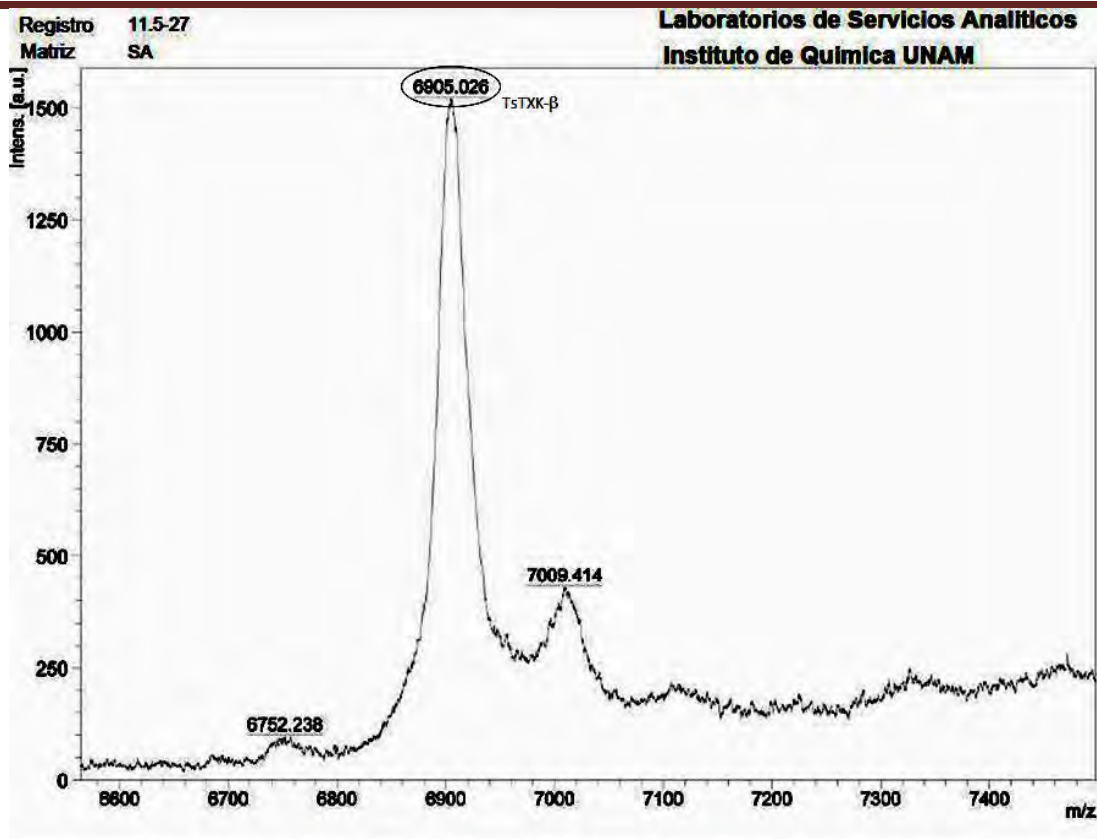


Figura 27. Espectro de masas que muestra la toxina, realizado a partir de la muestra purificada por CLAR. Se realizó en matriz SA.

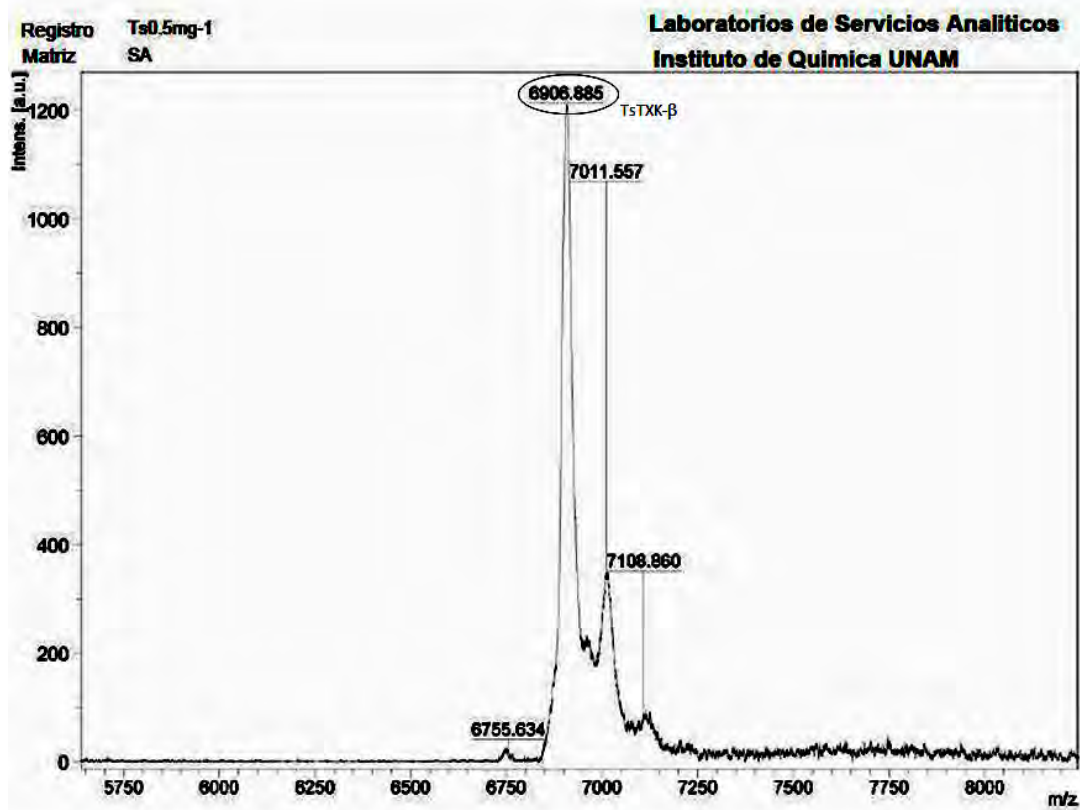


Figura 28. Espectro de masas que muestra la toxina realizado a partir de la muestra que se empleó para RMN. Se realizó en matriz SA.

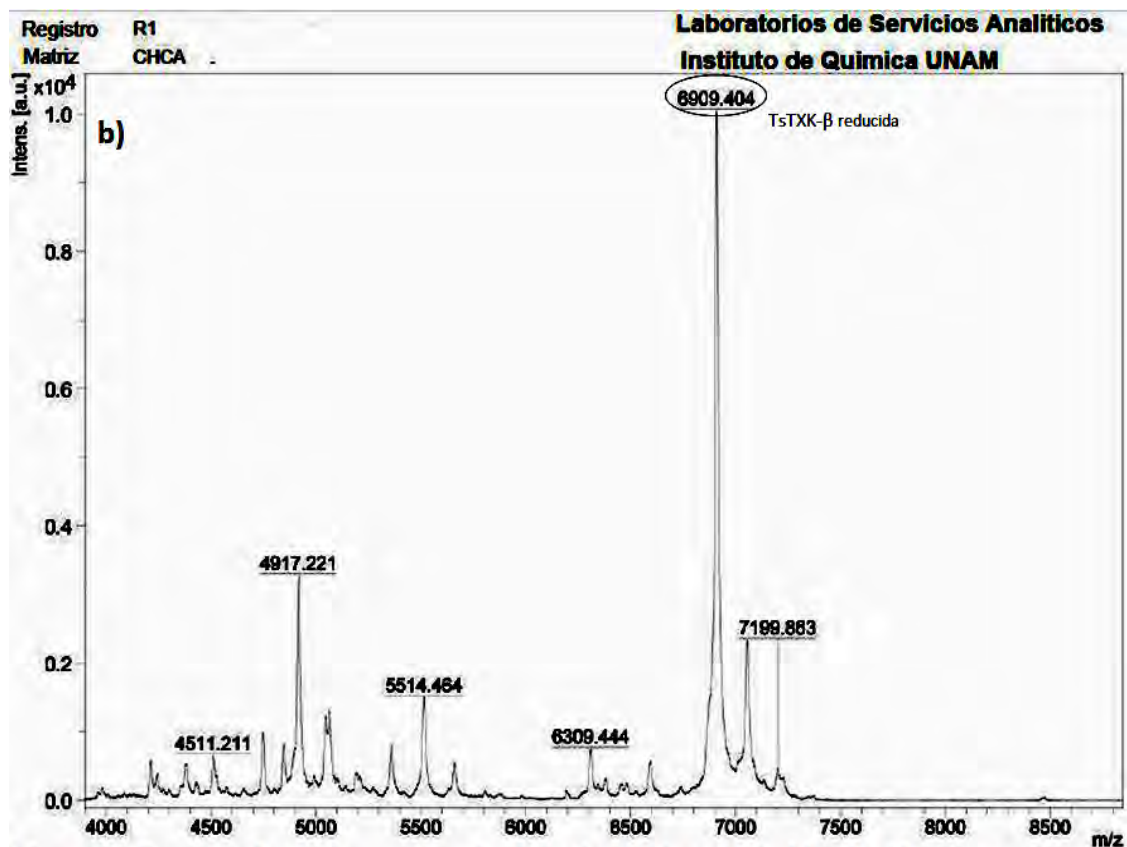
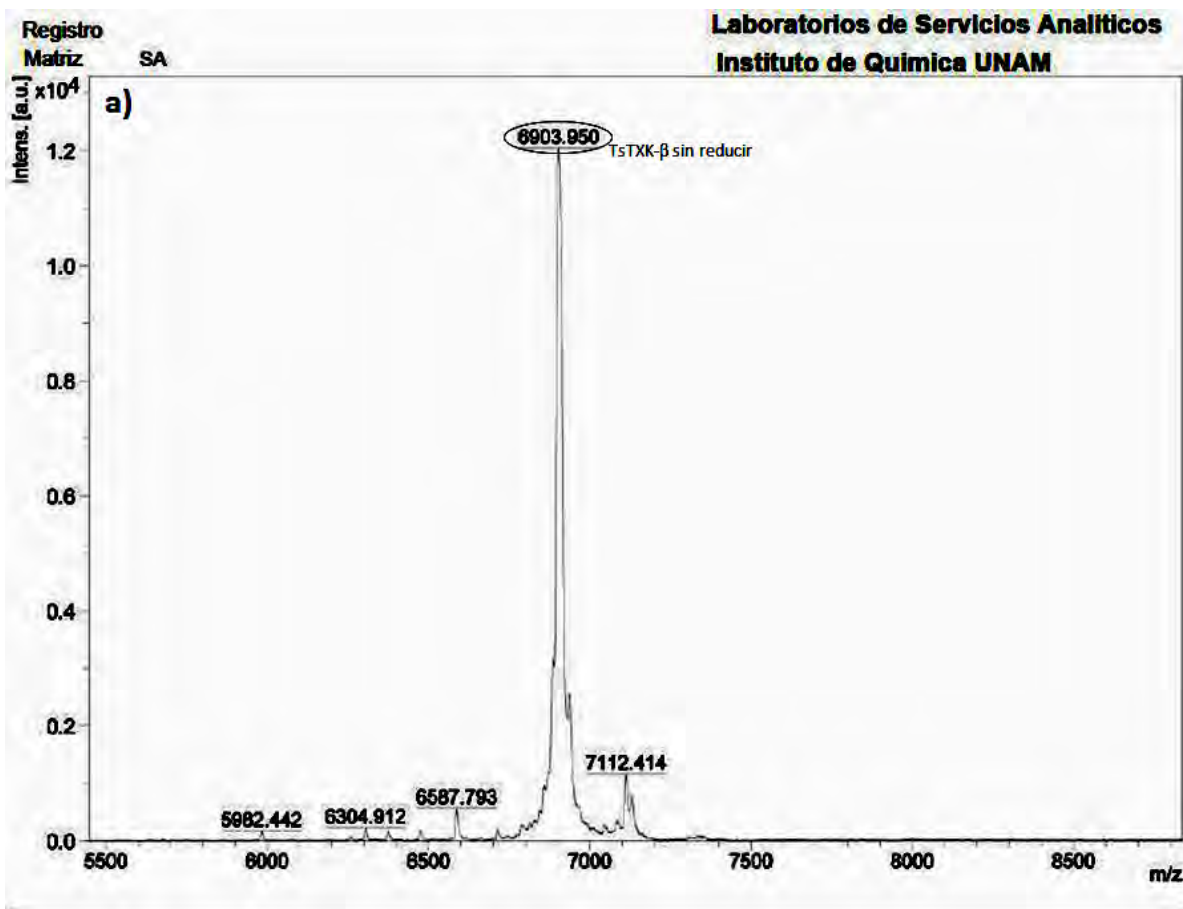


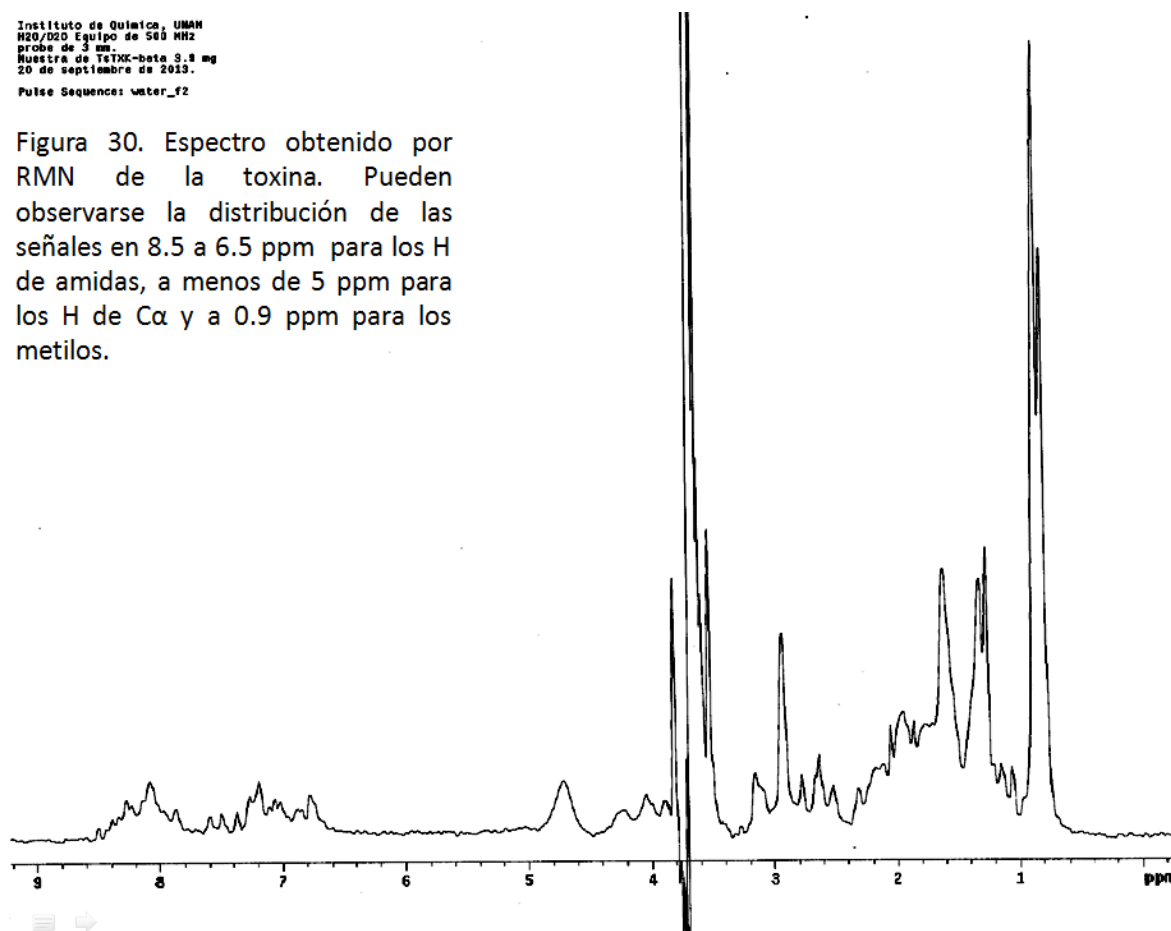
Figura 29. Espectro de masas que muestra la toxina a) sin reducir; b) reducida. Se aprecia una diferencia de 6Da entre cada una, lo que indica la presencia de puentes disulfuro. Se realizó en matriz SA y CHCA.

6.7. Obtención de espectros de ^1H -RMN

Una vez obtenida una muestra de 3 mg de toxina, se procedió a realizar un experimento de RMN de ^1H . Si la proteína se encuentra plegada las señales que corresponden a los H de los metilos, a los H de los $\text{C}\alpha$ y los H de los enlaces peptídicos (amida) se encuentran desplazados a mayor o menor campo.

Instituto de Química, UNAM
 H₂O/D₂O Equipo de 500 MHz
 proba de 3 mm.
 Muestra de TstXK-beta 3.3 mg
 20 de septiembre de 2013.
 Pulse Sequence: water_f2

Figura 30. Espectro obtenido por RMN de la toxina. Pueden observarse la distribución de las señales en 8.5 a 6.5 ppm para los H de amidas, a menos de 5 ppm para los H de $\text{C}\alpha$ y a 0.9 ppm para los metilos.

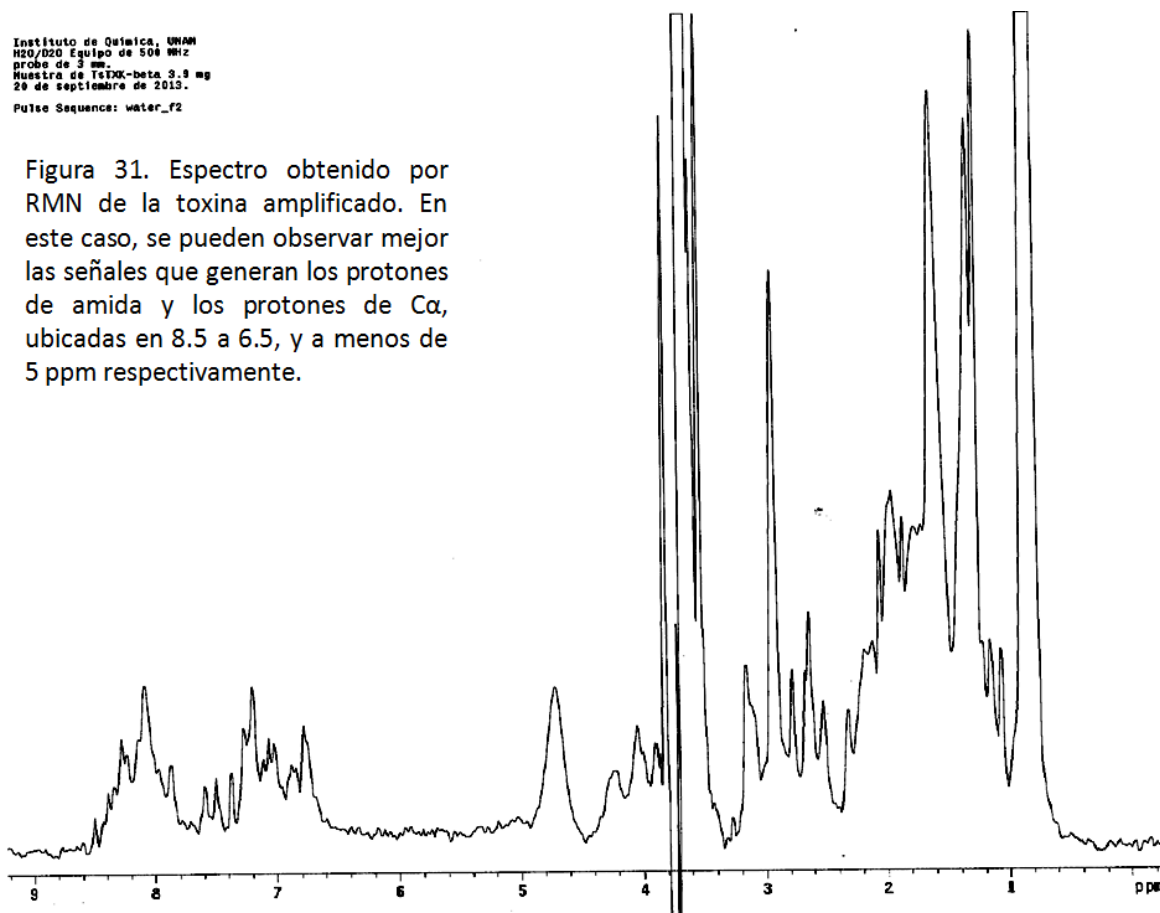


En el espectro de resonancia obtenido, mostrado en la Figura 30, pueden verse los desplazamientos que presenta la toxina. Para una toxina plegada, los metilos deben encontrarse a desplazamientos químicos inferiores a 0.9 ppm. En el espectro de la toxina se encuentran juntos en 1 ppm. Los hidrógenos que se encuentran enlazados a $\text{C}\alpha$ deben verse distribuidos a 5.5 ppm pero en el espectro de la toxina se localizan a menos de 5 ppm. Por último, las señales de amidas de los enlaces peptídicos deben de aparecer a un desplazamiento entre

12 y 6.5 ppm. Las que se observan en el espectro obtenido se encuentran entre 8.5 y 6.5 ppm. Esto puede apreciarse en la figura 31.

Además de esto, también se puede observar una señal de mayor magnitud en ~ 3.8 ppm, la cual es indicativa de que existe una cierta concentración de Tris presente en la muestra analizada por RMN.

El resultado derivado de realizar estos experimentos, y de acuerdo a las señales obtenidas es que la proteína no se encuentra plegada. Las señales que son características de plegamiento no aparecen en el desplazamiento correspondiente a una proteína que si se encuentra plegada.



6.8. Predicción de estructuras: I-TASSER[®] y Qwark[®]

Una de las formas de poder intuir como es la estructura de una proteína es mediante la realización de cálculos computacionales. Existen numerosos programas para realizar éste tipo de cálculos, muchos de ellos se encuentran disponibles en la internet con fines académicos de forma gratuita y, algunos otros, de manera comercial. Para proponer una estructura posible de la toxina se emplearon dos tipos de programas: I-TASSER[®] y Qwark[®].

I-TASSER[®] es una plataforma automatizada para la predicción de estructuras basada en la secuencia primaria de aminoácidos y en la posible similitud que puede tener su secuencia de aminoácidos con otras proteínas conocidas [40]. I-TASSER[®] genera un conjunto de modelos tridimensionales, los cuales funcionan como predicción de los que se pudiera obtener por medio de RMN. Estos modelos se calculan por homología con proteínas encontradas en la base de datos Protein Data Bank (PDB). Se comparan las secuencias primarias con secuencias similares que se encuentran reportadas permitiendo hacer la predicción de la estructura.

En éstos cálculos se emplea un factor denominado RMSD (siglas del término, en inglés, root-mean square derivation). Este factor es un indicador de la cercanía que tiene la estructura predicha con la que se usó como molde, tomada del PDB [40]. Otro factor empleado es el c-score, un valor de confiabilidad que indica cuan confiable es el cálculo efectuado; por lo tanto, es una medida de la calidad de la estructura. Un valor de c-score mayor indica un modelo de mayor confiabilidad.

Por otra parte, Qwark[®] es un cálculo de estructura secundaria basado en determinaciones *ab-initio*. En ellos se emplea a la estructura proteínica, no sólo como una cadena de C α , sino que considera todos los átomos que se encuentran en la cadena principal y simula los aminoácidos tomando en cuenta su centro de masa. Además, se incluyen interacciones entre átomos, como fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno y ángulos de torsión [41].

Éste cálculo determina la menor energía para fragmentos específicos de la proteína, mismos que va conformando hasta obtener una estructura completa. No requiere de utilizar moldes, simplemente se basa en datos estadísticos obtenidos

por medio del análisis de otras estructuras, que permiten restringir a las moléculas a un comportamiento y plegamiento que ya se encuentra establecido [41]. El valor que se obtiene al finalizar el cálculo es conocido como TM-score (siglas de Template Modeling score), el cual nos indica la similitud encontrada para el nuevo grupo de estructuras.

Se realizó el cálculo en ambos servidores. I-TASSER[®] determinó 5 estructuras, mostradas en la figura 32; y Qwark[®] determinó 10, que se encuentran en la figura 33.

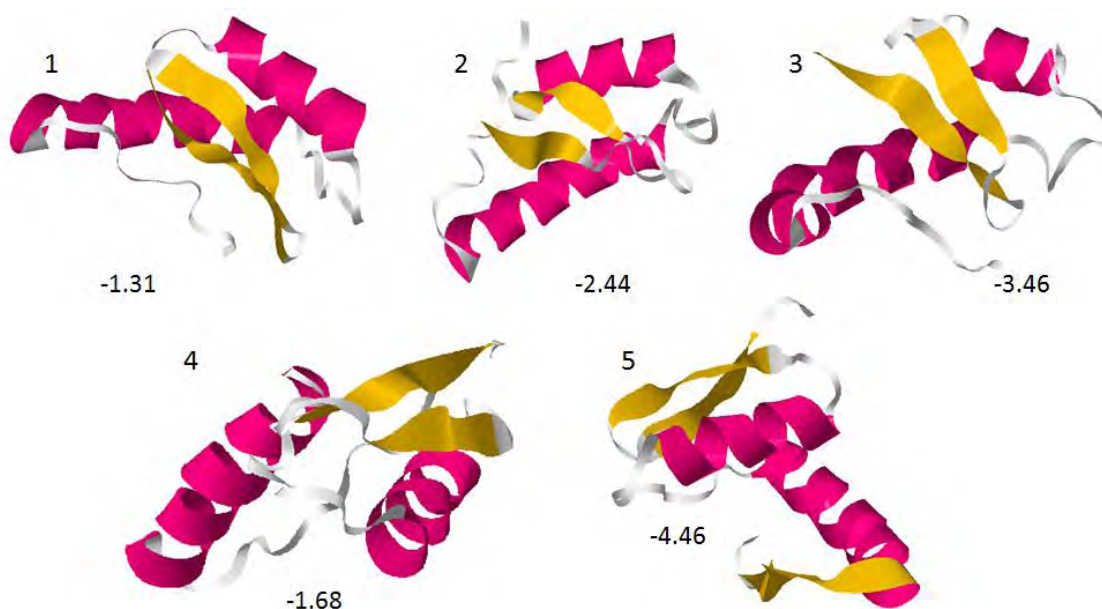


Figura 32. Estructuras obtenidas con el programa en línea I-TASSER[®]. Las cinco estructuras fueron calculadas por homología con proteínas existentes en el PDB, y el valor de c-score obtenido se encuentra al pie de cada imagen. El valor de RMSD obtenido entre las cinco estructuras es de -5.6 ± 3.5

Las estructuras se compararon por medio de un tercer servidor: Swiss-Model Workspace, Protein Structure & Model Assessment Tools[®]. Este servidor está conformado por un conjunto de herramientas diversas que verifican su confiabilidad, por medio de parámetros estadísticos y de probabilidad, interacción con disolvente, intramoleculares y la posición de los aminoácidos presentes [42]. Los parámetros utilizados para realizar la comparación fueron ANOLEA, QMean, DFIRE, GROMOS y Procheck.

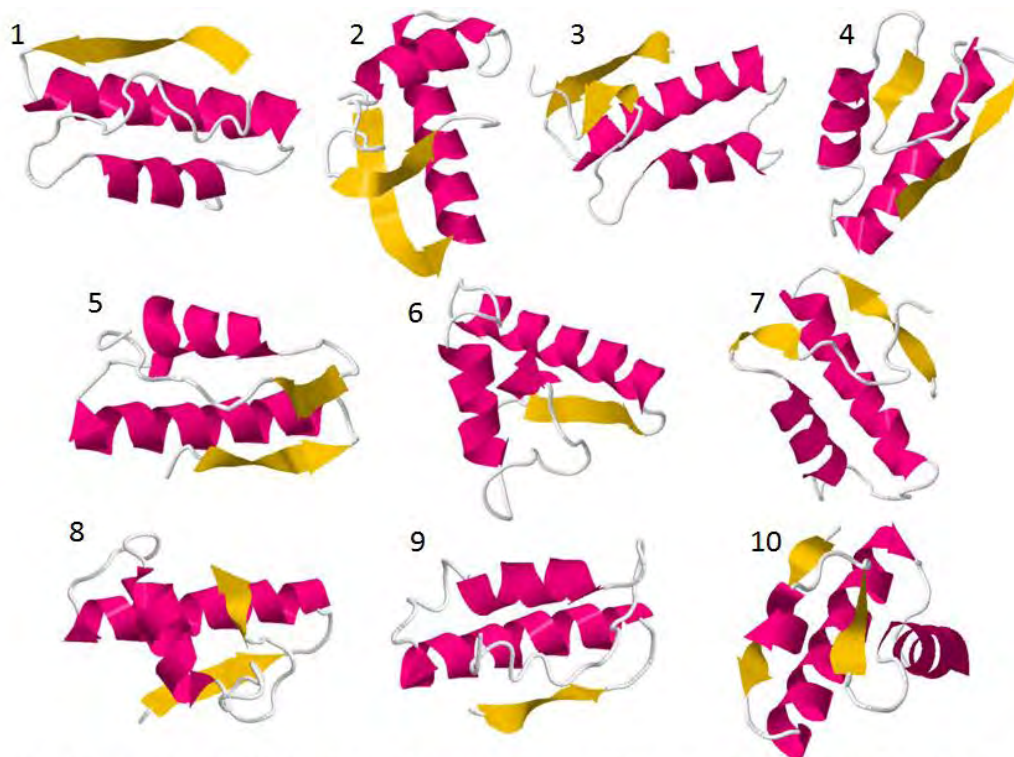


Figura 33. Estructuras obtenidas con el programa en línea Qwark®. Las 10 estructuras fueron calculadas por medio de ab-initio. El valor de TM-score obtenido entre las 10 proteínas es de 0.49 ± 0.08 .

Se seleccionó una estructura por cada cálculo, mismas que se muestran en la figura 34. En ella puede apreciarse que dependiendo del método utilizado se llega a una estructura distinta. En particular, la estructura seleccionada del servidor Qwark® es la que tiene una mejor calidad debido a que los parámetros empleados para comparar las diez estructuras coincidieron, en su mayoría, que tiene una mayor probabilidad de tener una menor energía (Fig. 35).



Figura 34. Estructuras elegidas como las mejores, tras su análisis por medio de Swiss-Model Workspace, Protein Structure & Model Assessment Tools®. Se compararon los resultados de cada parámetro aplicado a las 5 estructuras obtenidas por I-TASSER® y a las 10 obtenidas por Qwark®

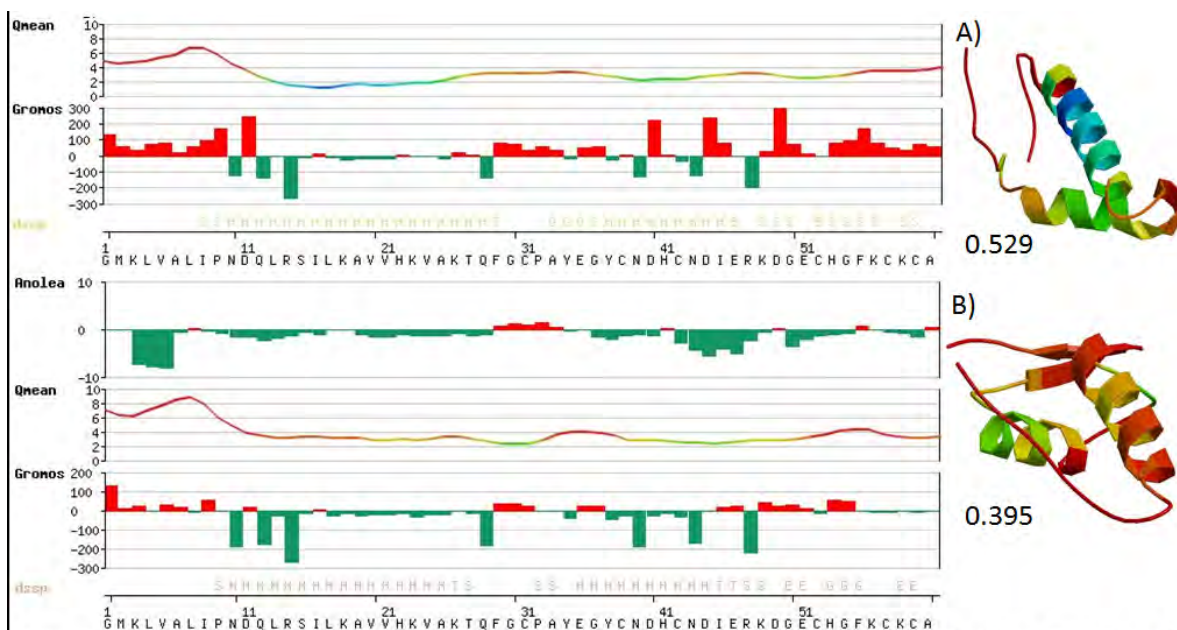


Figura 35. Resultados obtenidos con el programa Swiss-Model Workspace, Protein Structure & Model Assessment Tools[®]. Las graficas de Anolea (sólo para el modelo 4), Gromos y QMean muestran que las estructuras elegidas A) Modelo 3 de Qwark y B) Modelo 4 de I-TASSER son las de menor energía. Las estructuras mostradas son generadas por Qmean, y colorea los fragmentos desde el azul (menor energía) al rojo (mayor energía). QMean también genera un valor de energía, mostrado bajo cada estructura, que fue el menor para los modelos seleccionados.

Se espera que la toxina TsTXK- β tenga un motivo estructural CS- α/β y una o dos hélices α al inicio de la secuencia, ya que se han hecho alineamientos con algunas otras proteínas como las defensinas y las escorpinas [12]. Las estructuras obtenidas se compararon con dos defensinas: la defensina MGD-1 (PDB 1FJN) y la defensina Cg-Def (PDB 2B68), que tienen el motivo CS- α/β .

En las estructuras obtenidas se puede observar que se encuentran dos hélices α . Sin embargo, las hebras β no se distinguen en las posiciones esperadas, ya que se espera que se encuentren cerca de la hélice de dos giros y unida con puentes disulfuro. Las hebras β en la estructura obtenida por I-TASSER[®], a pesar de que se encuentran cercanas a la hélice, no se encuentran unidas por puentes disulfuro. Por otra parte, las hebras β que se observan en el modelo obtenido por Qwark[®], están en una posición distinta de la cadena, por lo tanto, tampoco cumple con la condición de tener el motivo CS- α/β .

Para finalizar, se buscó en las estructuras obtenidas si se habían generado puentes disulfuro. Se encontró que sólo la estructura 5 generada por Qwark[®] tiene dos puentes disulfuro, las demás con un solo puente.

7. Conclusiones

Tras la actividad experimental realizada para optimizar las condiciones de obtención de la toxina TsTXK- β y por medio del análisis de los resultados de la caracterización por RMN y MALDI-TOF, se llegó a la conclusión de que la proteína se expresa en el sistema propuesto, sin embargo, se tiene también que la toxina no se encuentra plegada, a pesar de determinar que cuenta con puentes disulfuro.

Como perspectiva de este trabajo se propone que la toxina se someta, una vez expresada, a un procedimiento para plegarla. De esta forma, se resolverá la estructura terciaria por medio de la adquisición de experimentos de RMN en dos dimensiones y se podrá comparar con las estructuras calculadas en éste trabajo.

8. Bibliografía

- [1] E. González Santillan, «Diversidad, taxonomía y hábitat de alacranes,» de *Artrópodos de Chamela*, México, Instituto de Biología. UNAM., 2004, pp. 25-35.
- [2] W. Dias Da Silva y T. Kipnis, «Venoms,» de *Encyclopedia of Life Sciences*, vol. I, John Wiley & Sons, Ltd., 2001.
- [3] C. Legros, B. Ceèard, P. E. Bougis y M. F. Martin-Eauclaire, «Evidence of a new class of scorpion toxins active against K⁺ channels.,» *FEBS Letters*, vol. 431, pp. 375-380, 1998.
- [4] R. S. Rogowski, B. K. Krueger, J. H. Collins y M. P. Blaustein, «Tityus toxin K-alpha blocks Voltage-Geted noninactivating k⁺ channels and unblocks inactivating K⁺ channels blocked by alpha-dendrotoxin in synaptosomes,» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA - Pharmacology*, vol. 91, pp. 375-380, 1994.
- [5] R. Rodriguez de la Vega, E. Schwartz y L. Possani, «Mining on scorpion venom biodiversity,» *Toxicon*, vol. 56, pp. 1155-1161, 2010.
- [6] M. Gurevitz, I. Karbata, L. Cohena, N. Ilana, R. Kahna, M. Turkova, M. Stankiewicz, W. Stuhmerc, K. Dongd y D. Gordona, «The insecticidal potential of scorpion beta-toxins.,» *Toxicon*, vol. 49, p. 473–489, 2009.
- [7] V. Quintero-Hernández, E. Ortiz, M. Rendón-Anaya, E. Schwartz, B. Becerril, G. Corzo y L. Possani, «Scorpion and spider venom peptides: Gene cloning and peptide expression.,» *Toxicon*, vol. 58, p. 644–663, 2011.
- [8] World Health Organization, Public health response to biological and chemical weapons. WHO Guidance, Suiza: World Health Organization, 2004.
- [9] J. Tytgat, K. G. Chandy, M. L. García, G. A. Gutman y M. F. Martin-Eauclarie, «A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms.,» *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 20, pp. 444-447, 1999.
- [10] C. Miller, «The Charybdotoxin Family of K⁺ Channel-Blocking Peptides,» *Neuron*, vol. 15, pp. 5-10, 1995.
- [11] UniProt, «UniProt Documents,» Septiembre 2013. [En línea]. Available: <http://www.uniprot.org/docs/scorpktx>. [Último acceso: octubre 2013].
- [12] S. Zhu, B. Gao, A. Aumelas, M. C. Rodriguez, H. Lanz-Mendoza, S. Peigneur, E. Diego-García, M. F. Martin-Eauclaire, T. J., Possani y L. D., «MeuTXK-Beta1, a scorpion venom-derived two domain potassium channel toxin-like peptide with cytolytic activity,» *Biochimica et Biophysica Acta*, n° 1804, pp. 872-883, 2010.
- [13] R. C. Rodriguez de la Vega y L. D. Possani, «Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels,» *Toxicon*, vol. 43, pp. 865 - 875, 2004.
- [14] C. Miller, «An overview of the potassium channel family,» *Genome Biology*, vol. 1, n° 4, 2000.
- [15] J. L. Sharman, H. E. Benson, A. J. Pawson, V. Lukito, C. P. Mpamhanga, V. Bombail, A. P. Davenport, J. Peters, M. Spedding, A. J. Harmar y NC-IUPHAR., «IUPHAR-DB: updated database content and new features. (Database Issue): D1083-8.,» *Nucleic Acids Research*, vol. 41, pp. D1083-D1088, 2013.

- [16] W. A. Catterall, S. Cestèle, V. Yarov-Yarovoy, F. H. Yu, K. Konoki y T. Scheuer, «Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins,» *Toxicon*, vol. 49, pp. 124-141, 2007.
- [17] B. Rates, K. K. F. Ferraz, M. H. Borges, M. Richardson, M. E. De Lima y P. A. M.C., «Tityus serrulatus venom peptidomics: Assessing venom peptide diversity,» *Toxicon*, vol. 52, pp. 611-618, 2008.
- [18] A. M. C. Pimenta, F. De Marco Almeida, M. de Lima, M. F. Martin-Eauclaire y P. E. Bougis, «Individual variability in Tityus serrulatus (Scorpiones, Buthidae) venom elicited by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry,» *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 17, pp. 413-418, 2003.
- [19] A. M. C. Pimenta, R. Stöcklin, P. Favreau, P. E. Bougis y M.-E. M. F., «Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of Tityus serrulatus (Scorpiones, Buthidae),» *Rapid Communications Mass Spectrometry*, vol. 15, pp. 1562-1572, 2001.
- [20] M. P. Blaustein, R. S. Rogowski y M. J. K. B. K. Schneider, «Polypeptide Toxins from the Venoms of Old World and New World Scorpions Preferentially Block Different Potassium Channels,» *Molecular Pharmacology*, nº 40, pp. 932-942, 1991.
- [21] E. Kalapothakis, S. Jardim, A. C. Magalhaes, T. Mendes, L. De Marco, L. C. C. Afonso y C. Chávez-Olórtegui, «Screening of expression libraries using ELISA: identification of immunogenic proteins from Tityus bahiensis and Tityus serrulatus venom,» *Toxicon*, vol. 39, pp. 679 - 685, 2001.
- [22] G. F. King, M. C. Gentz, P. Escoubas y G. M. Nicholson, «A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals,» *Toxicon*, vol. 52, pp. 264-276, 2008.
- [23] D. A. Skoog, F. J. Holler y S. R. Crouch, Principios de Análisis Instrumental, Sexta Edición ed., México D.F.: Cengage Learning Editores, 2008.
- [24] A. E. Ferentz y G. Wagner, «NMR spectroscopy: a multifaceted approach to macromolecular structure,» *Quarterly Reviews of Biophysics*, vol. 33, nº 1, p. 32, 2000.
- [25] K. Wüthrich, «NMR studies of structure and function of biological macromolecules.,» *Nobel Lecture*, p. 238, 2002.
- [26] G. Wider y K. Wüthrich, «NMR spectroscopy of large molecules and multimolecular assemblies in solution.,» *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 9, pp. 594-601, 1999.
- [27] C. J. Puerta y C. P. Ureña, Practicas de Biología Molecular, Bogotá: Editorial Pontificia Universidad Javeriana, 2004, pp. 31-38.
- [28] R. C. Mierendorf, B. B. Morris, B. Hammer y R. E. Novy, «Expression and Purification of Recombinant Proteins Using the pET System,» de *Molecular Diagnosis of Infectious Diseases*, vol. 13, U. Reischl, Ed., Humana Press, 1998, pp. 257-292.
- [29] Novagen, «pET E. coli T7 expression vectors,» Merck Millipore, 2013. [En línea]. Available: <http://www.merckmillipore.com.mx/life-science-research/vector-table>

- novagen-pet-vector-table/c_HdSb.s1O77QAAAEhPqsLdcab?PortalCatalogID=merck4biosciences&CountryName=Mexico#pet32a. [Último acceso: Noviembre 2013].
- [30] QIAgen, «QIAquick Spin Handbook — May 2012 - (EN),» 2013. [En línea]. Available: <http://www.qiagen.com/knowledge-and-support/resource-center/resource-download.aspx?id=3987caa6-ef28-4abd-927e-d5759d986658&lang=en>. [Último acceso: Noviembre 2013].
- [31] C. K. Mathews, K. E. van Holde y K. G. Ahern, *Bioquímica*, Madrid: Pearson Educación, 2002, p. 141.
- [32] New England Biolabs, «T4 DNA Ligase,» 2013. [En línea]. Available: <https://www.neb.com/products/M0202-T4-DNA-Ligase>. [Último acceso: Noviembre 2013].
- [33] J. Sambrook y D. W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, vol. 1, New York: Cold Spring Harbor, 2001, pp. 51-53.
- [34] O. Johnsborg, V. Eldholm y L. S. Havarstein, «Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function,» *Research in microbiology*, vol. 158, pp. 767-778, 2007.
- [35] Lucigen, «OverExpress™ C41(DE3) and C43(DE3) Competent Cells,» 2013. [En línea]. Available: <http://lucigen.com/docs/manuals/MA031-OverExpress-Chemicallycompetent-Cells.pdf>. [Último acceso: Noviembre 2013].
- [36] B. Miroux y J. E. Walker, «Over-production of Proteins in Escherichia coli: Mutant Hosts that Allow Synthesis of some Membrane Proteins and Globular Proteins at High Levels,» *Journal of Molecular Biology*, vol. 260, pp. 289-298, 1996.
- [37] QIAGEN, «QIAquick Spin Handbook,» 2013. [En línea]. Available: <http://www.qiagen.com/knowledge-and-support/resource-center/resource-download.aspx?id=05356d52-ff29-4ac2-be49-48cba2381cfa&lang=en>. [Último acceso: Noviembre 2013].
- [38] P. Artimo, M. Jonnalagedda, K. Arnold, D. Baratin, C. G. y e. al., «ExpASY: SIB bioinformatics resource portal,» *Nucleic Acids Research*, vol. 40, nº W1, pp. W597-W603, 2012.
- [39] Innovagen AB, «Peptide property calculator,» 2012. [En línea]. Available: <http://www.innovagen.se/custom-peptide-synthesis/peptide-property-calculator/peptide-property-calculator.asp>. [Último acceso: 11 2013].
- [40] A. Roy, A. Kucukural y Y. Zhang, «I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction,» *Nature Protocols*, vol. 5, nº 4, pp. 725-738, 2010.
- [41] Y. Zhang y D. Xu, «Ab initio protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field,» *Proteins*, vol. 80, pp. 1715-1735, 2012.
- [42] K. Arnold, L. Bordoli, J. Kopp y T. Schwede, «The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling,» *Bioinformatics*, vol. 22, pp. 195-201, 2006.

Anexo I. Protocolo de producción de toxinas, desarrollado en el laboratorio de Química de biomacromoléculas 1. Instituto de Química. UNAM.

El presente protocolo se desarrolló de manera general para la producción de toxinas con el material y el equipo del laboratorio de Química de Biomacromoléculas 1. Las condiciones que se emplearon se especifican en cada apartado de la sección “Metodología”.

I. Transformación. Tiempo: de 2 a 2:30 h

Para la transformación de células se requiere:

- Células de la cepa requerida (de 50 a 100 μL)
 - Cajas petri de medio LB
 - Antibióticos de selectividad, indicados para cada cepa (1 $\mu\text{L}/\text{mL}$, en cada caja a utilizar)
 - Medio LB Líquido (de 300 a 500 μL)
 - Termoblock c/termómetro
 - Hielo
 - Plásmido requerido (10 ng por cada 50 μL de células)
1. Preparar las cajas petri necesarias para sembrar (una vez transformadas las células), cada una con los antibióticos necesarios para la selectividad del crecimiento bacteriano. Para ello se necesitan
 - 2 para controles positivo y negativo, sin transformar (pueden ser cajas chicas)
 - 2 para controles positivo y negativo, transformadas
 2. Dejar descongelar en hielo las células a emplear en la transformación, aproximadamente 20 min.
 3. Anadir a las células descongeladas 10 ng/50 μl del plásmido a utilizar.
 4. Dejar interaccionar por 30 min-1 h en hielo.
 5. Dar un choque térmico sumergiendo las células en el termoblock, con una temperatura de 42-45 $^{\circ}\text{C}$, de 45 seg-1 min
 6. Sacar las células del termoblock y colocarlas en hielo por 2 min.
 7. Agregar a las células de 300 a 500 μL de medio LB líquido. Incubar a 37 $^{\circ}\text{C}$ por una hora.
 8. Sembrar las células en sus respectivas cajas petri, y cuidar cuales son de blanco y los controles positivos y negativos. Incubar las cajas a 37 $^{\circ}\text{C}$, toda la noche.

II. Cinética de expresión. Tiempo: 8 h continuas (de preferencia) y 4 h del siguiente día. Tiempo total: 24 h

Para la cinética de expresión (toma de muestras) se requiere:

- Cajas petri con las células ya transformadas.
 - Tubos de cultivo estériles
 - Matraz Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de medio LB líquido, estéril
 - Antibióticos necesarios (1 uL/mL)
 - Puntas estériles de 200 μ L
 - Puntas estériles de 1000 μ L
 - Tubos de 0.5 mL
 - Espectrofotómetro para densidad óptica, con celda de 1 mL
1. De las cajas petri obtenidas en la transformación, picar una colonia con una punta estéril y dejar crecer en un tubo de cultivo estéril un preinóculo en medio LB toda la noche, con los antibióticos necesarios
 2. Al día siguiente, traspasar el preinóculo al matraz que contiene LB y antibióticos, dejar crecer a la temperatura que se necesite la cinética (usualmente de 37 °C, pero puede ser menor), con agitación y monitoreando la densidad óptica del inóculo.
 3. Ya llegando a la densidad óptica de 0.7, se induce a la producción de proteína con 0.5 mM de IPTG. Tomar una muestra a este tiempo, que será el tiempo cero.
 4. Tomar muestras de 500 μ L a la 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 y 24 h, traspasándolas en un tubo de 0.5 mL.
 5. Centrifugar las muestras a 13000 rpm (mínimo) por 60 s.
 6. Decantar el medio y agregar 50 μ L de buffer de lisis. Resuspender el pellet celular
 7. Congelar las muestras y guardar para su procesamiento (lisado y preparación para correr en geles de electroforesis)

Para lisar las muestras se requiere: (tiempo: 30 min)

- Muestras congeladas
 - Hielo
 - Sonicador con vaso
1. Se descongelan las células en hielo, de manera que puedan lisarse.
 2. Se ajusta la programación del sonicador a la siguiente:
 - i. 20 s de tiempo del pulso
 - ii. 10 s de tiempo en reposo
 - iii. 10 min de tiempo total (dependiendo del número de tubos a sonicar, generalmente es el tiempo para 9 o 10)

3. En cada choque sónico se cambia la muestra y se mete en hielo, por otra que este fría.
4. Ya sonicadas, puede optarse por solo agregar el buffer de carga y correr geles, o bien centrifugar y separar la fracción soluble del pellet, y agregar el buffer de carga.

Para correr los geles se requiere: (Tiempo: 2:30 h)

- Muestras
 - Geles de poliacrilamida 14% para electroforesis (de 10 pozos para menos de 9 muestras y de 15 pozos para más de 9)
 - Buffer de Tanque
 - Caja electroforética
 - Puntas para geles
 - Marcadores de pesos moleculares
 - Fuente de poder
1. Se hierven las muestras ya sonicadas y con 30µL de buffer de carga por 10min.
 2. Se montan los geles en la caja electroforética, llenando esta última con buffer de tanque; verificar si el nivel es adecuado.
 3. Cargar los pozos de los geles con 8-10 µL de muestra, con la ayuda de las puntas para geles.
 4. Programar la fuente de poder para correr las muestra de la manera siguiente:
 - i. 20 min a 80 V para concentrar
 - ii. ~2 h a 120 V para separar
 - a) Nota: estar al pendiente de los geles, el tiempo puede variar
 5. Una vez concluido el tiempo, retirar los geles, fijarlos y teñirlos. El tiempo donde se observa un máximo de expresión, será el tiempo que se tendrá el cultivo de producción.

III. Expresión de Proteína (tiempo: marcado por la cinética + 1 h de centrifugado)

Para expresar la proteína de fusión se requiere:

- Matraces de 3 L con 1.5 L de medio LB; estériles
- Antibióticos necesarios. (1 µL/mL de medio)
- Matraz de 125 mL con medio LB, estéril
- Cajas petri con células transformadas
- Puntas estériles de 200 y 1000 µL
- Espectrofotómetro para densidad óptica, con celda de 1 mL
- Tubos para centrifuga
- Buffer de lisis
- Solución de IPTG 100 mM

1. Poner a crecer toda la noche un preinóculo de las células transformadas
2. Distribuir el preinóculo entre los matraces de 1.5 L. Dejar alcanzar una densidad óptica de ~0.7, e inducir con 0.5 mM de IPTG
3. Dejar crecer y producir por el tiempo adecuado, obtenido por los geles
4. Una vez alcanzado el tiempo de máxima expresión, centrifugar el cultivo a 6000 rpm, quitar el excedente de medio y resuspender el pellet en buffer de lisis
5. Congelar las muestras resuspendidas, para su lisis posterior

IV. Lisado

Para lisar las células de producción se necesita: (tiempo: 30 min-1 h)

- Células congeladas
 - Hielo
 - Sonicador con punta
 - Recipiente de HDPE
1. Dejar que se descongelen las células en hielo
 2. Traspasar las células a un recipiente de HDPE
 3. Programar el sonicador con los siguientes tiempos:
 - i. 40 seg de pulso sónico
 - ii. 2 min de tiempo muerto
 - iii. 4 min de tiempo total
- a) Nota: cuidar que no se sobrecaliente la muestra y que la punta no toque el recipiente donde se encuentran las células, ya que esto provoca la formación de espuma, lo cual es difícil de sonicar y de tratar; y puede provocar precipitación de proteínas
4. Centrifugar el sonicado por 40 min-1 h a 16500 rpm.
 5. Decantar el sobrenadante del pellet, guardarlo para su purificación. Desechar el pellet.

V. Purificación por columnas Hi-Trap

Para purificar se necesita: (tiempo: 2:30-3:30h)

- Columna Hi-Trap de 5 o 1 mL
- Filtros Millipore® de 0.22 µm para disoluciones con y sin proteínas
- Porta filtros
- Jeringa de 10 mL
- Tubos Falcon de 50 mL
- Agua destilada
- Buffer de lisis
 - Solo
 - Con 10 mM de Imidazol
 - Con 500 mM de imidazol
- Etanol 20%
- Bomba peristáltica
- Manguera con entrada para Hi-Trap

1. Todas las disoluciones deben filtrarse con Millipore® de 0.22 µm de poro. Las disoluciones con proteínas se filtran con filtros de PDVF y las que no contienen proteínas con filtros de nitrocelulosa.
2. Se ajusta la bomba peristáltica a 5 mL/min o 1 mL/min, dependiendo de la columna a utilizar
3. La columna se lava de la solución de etanol de guardado con 5 volúmenes de agua.
4. Se equilibra con 5 volúmenes de buffer de lisis
5. Se hace pasar el sobrenadante del lisado celular, tomando muestras del lisado sin pasar y del flujo que cae de la columna. Separar la elución y etiquetar.
6. Se lava lo retenido por la columna con 5 volúmenes de buffer de lisis con 10mM de imidazol. Se toma una muestra de la elución, se separa y se etiqueta
7. Se eluye la muestra retenida, que es la que contiene la proteína de fusión, con 5 volúmenes de buffer de lisis con 500 mM de imidazol. Se toma una muestra de la elución, se separa y se etiqueta.
8. Al terminar de eluir con el imidazol, volver a equilibrar la columna con 5 volúmenes de buffer de lisis
9. Limpiar la columna con 5 volúmenes de agua
10. Pasar 3 volúmenes de etanol para guardar la columna.

Para verificar la optima purificación y la presencia de la proteína de fusión se necesita: (tiempo: 2:30-3:30 hrs)

- Muestras obtenidas de la purificación.
- Geles de poliacrilamida 14% para electroforesis (de 10 pozos para menos de 9 muestras y de 15 pozos para más de 9)
- Caja electroforética
- Puntas para geles
- Marcadores de pesos moleculares
- Fuente de poder

1. Cargar los geles con las muestras preparadas.
2. Teñir los geles y verificar la presencia de la proteína de fusión

VI. Desalado

a) Para desalar la muestra purificada por la columna HiTrap[®] por medio de columnas PD10[®] se requiere: (Tiempo: 1:30 h)

- Proteína a desalar
- Columna PD10[®]
- Buffer de lisis filtrado
- Agua destilada
- Etanol 20%
- Pipeta de 10 mL
- Puntas de 10 mL
- Tubos falcon

1. Quitar el etanol de guardado de la columna con 25 mL de agua
2. Equilibrar la columna con 25 mL de buffer de lisis filtrado
3. Agregar 2.5 mL de la muestra a desalar. Desechar la elución
4. Eluir con 3.5 mL de buffer de lisis. Colectar la elución
5. Volver a equilibrar la columna con 25 mL de buffer de lisis
6. Repetir de 3 a 5 hasta que se haya pasado toda la muestra
7. Al termino, enjuagar la columna con 25 mL de agua y guardarla en etanol 20%

b) Para desalar la muestra purificada por la columna HiTrap[®] por medio de diálisis se requiere: (Tiempo: 3:30 h)

- Proteína a desalar
- Membranas de intercambio iónico equilibradas con el buffer que se utilizará
- Buffer de lisis filtrado
- Agua destilada
- Etanol 20%
- Pipeta de 10 mL
- Puntas de 10 mL
- Tubos falcon
- Probetas o Tubos para diálisis
- Pinzas para membranas de diálisis

1. Las membranas, previamente equilibradas, se sellan por un lado por medio de las pinzas y se llenan con la disolución de proteína a desalar. Se sellan por el otro extremo
2. Se llena la pipeta o el tubo con el buffer que se empleara para el desalado, y se introduce la membrana que se encuentra llena de la disolución de proteínas. Se pone en agitación. El volumen que se debe emplear debe ser, como mínimo, 5 veces mayor al volumen de la disolución de proteína que se va a desalar.
3. Se cambia el buffer cada media hora, para evitar que la proteína precipite.
4. Al realizar un mínimo de tres cambios de buffer, se vacía de la membrana en un tubo falcon.

VII. Cuantificación de proteína por el método de Bradford

Para cuantificar se necesita: (Tiempo: 2 h)

- Muestra desalada
 - Reactivo de Bradford
 - Estándares de concentración conocida
 - Tubos de 1.5 mL
 - Pipeta de 1000 μ L
 - Shaker
 - Espectrofotómetro a 595 nm
 - Celda para UV-Visible
1. Se toman de los estándares y de la muestra a cuantificar 50 μ L, se colocan en tubos de 1.5 mL y se añade 1 mL de reactivo de Bradford
 2. Se ponen a reaccionar las muestras en agitación por una hora
 3. Se hace una curva de calibración con los estándares de proteínas conocidos, midiendo la absorbancia de cada uno en el espectrofotómetro
 4. Se mide la absorbancia de la muestra a cuantificar y se ubica en la curva de calibración, tomar en cuenta la dilución hecha al desalar.

VIII. Cinética de corte

Para la cinética de corte se necesita: (Tiempo: Hasta 8 h)

- Trombina
 - Muestra desalada
 - Buffer de lisis
1. Se lava la trombina de la solución de guardado con buffer de lisis
 2. Se reparte la proteína a cortar en los tubos necesarios de trombina, poniendo la reacción en agitación
 3. Se toma una muestra cada hora de la reacción para hacer una cinética de corte, la cual se correrá en un gel de electroforesis.
 4. Ya efectuada la cinética se procede a dejar la reacción con el tiempo necesario, indicado por la cinética de corte; en agitación
 5. Para separar la trombina de la proteína cortada, se centrifuga a 2500rpm, se pipetea cuidando no tomar las esferas de agarosa. Guardar la trombina en disolución buffer.

IX. Purificación del producto de corte en columnas HiTrap[®]

Para purificar el corte se necesita:

- Columna Hi-Trap de 5 o 1 mL
- Filtros Millipore[®] de 0.22 μ m para disoluciones con y sin proteínas
- Porta filtros
- Jeringa de 10 mL
- Tubos Falcon de 50 y 15 mL
- Agua destilada
- Buffer de lisis
 - Solo

- Con 500mM de imidazol
 - Etanol 20%
 - Bomba peristáltica
 - Manguera con entrada para Hi-Trap
1. Todas las disoluciones deben filtrarse con Millipore® de 0.22 µm de poro. Las disoluciones con proteínas se filtran con filtros de PDVF y las que no contienen proteínas con filtros de nitrocelulosa
 2. Se ajusta la bomba peristáltica a 5 mL/min o 1 mL/min, dependiendo de la columna a utilizar
 3. La columna se lava de la solución de etanol de guardado con 5 volúmenes de agua.
 4. Se equilibra con 5 volúmenes de buffer de lisis
 5. Se pasa la proteína cortada por la columna, colectando la elución.
 6. Las partes restantes de la proteína de fusión y los residuos de corte se lavan con 5 volúmenes de buffer de lisis con 500 mM y se desechan.
 7. Al terminar de eluir con el imidazol, volver a equilibrar la columna con 5 volúmenes de buffer de lisis
 8. Limpiar la columna con 5 volúmenes de agua. Pasar 3 volúmenes de etanol para guardar la columna.

X. Purificación por HPLC

- Medición del tiempo de retención
- Purificación

Para purificar por medio de HPLC se requiere (El tiempo depende de la cantidad de muestra y del tipo de columna a utilizar, así como del método y de la equilibración de la columna) se necesita:

- Disoluciones de proteína, filtradas
 - Agua Milli-Q y Acetonitrilo, filtrados:
 - Con TFA
 - Sin TFA
 - Viales limpios y secos
 - Jeringa con punta roma para inyección de muestra
 - Loops de diferentes capacidades
 - Columnas de fase reversa proteo analítica (para tiempo de retención) y preparativa (para purificación)
1. Prender el equipo de HPLC manualmente: Lámpara, Bombas y Degasificador
 2. Dejar que el degasificador se estabilice por 20 min

3. Comprobar que las bombas funcionen correctamente purgando las líneas y verificando la ausencia de burbujas. Para purgar las líneas se debe de abrir la válvula de paso externo, para evitar la entrada de presiones altas en la columna, oprimir el botón “Prime” y purgar las cuatro líneas. (Agua con y sin TFA, y acetonitrilo con y sin TFA). Después de estabilizado el sistema, cerrar la válvula de purga.
4. Antes de inyectar proteína, se recomienda correr un programa de blanco, para verificar el óptimo estado de la columna, así como para limpiarla. Este blanco también servirá para equilibrar la columna de la solución de guarda a la de separación (Disolventes con TFA)
5. Lavar el loop con un poco de la disolución saliente del programa de lavado, esto para evitar picos falsos y contaminación de la muestra a inyectar. Para lavarlo, mantener el inyector en posición de carga.
6. Escoger el programa adecuado para la separación de la proteína (ya sea para saber el tiempo de retención o para purificación). Para ello:
 - i. Abrir el programa Galaxie® en Windows®
 - ii. Iniciar sesión con nombre de usuario y contraseña
 - iii. Una vez abierto, en la casilla Systems, activar el botón HPLC_UV
 - iv. Activar el botón *OVERVIEW* (panel inferior derecho)
 - v. Encender la lámpara con los botones UV y Vis
 - vi. En el menú File, seleccionar *Open...*, y de ese menú seleccionar *Open Method...*
 - vii. Seleccionar el método a emplear, según las necesidades de separación. Abrirlo y verificar las especificaciones. También puede crearse un nuevo método, especificando los porcentajes de disolventes que se emplearan, el tiempo de corrida y el tamaño de la inyección, entre otras características.
7. Verificar el tiempo de corrida del método a emplear; de ser correcto, seleccionar el botón “inyectar”. Aparecerá una pantalla que corroborara los datos de la inyección. Dar clic en aceptar.
8. El sistema esperará que se inyecte la muestra. La inyección debe hacerse manualmente para que el programa comience a correr.

9. Si se espera un cromatograma para obtener el tiempo de retención, dejar que el programa corra. En caso de ya separar la proteína, estar al pendiente del tiempo de retención (obtenido en un análisis anterior) para coleccionar en un vial limpio y seco.
10. Al finalizar, regresar la columna a las condiciones de guarda (Agua y Acetonitrilo **SIN TFA**). Recordar que en el programa debe de reducirse lentamente el flujo hasta llegar a cero.
11. Apagar la lámpara con el programa, después apagar manualmente los tres dispositivos y el degasificador.

XI. Liofilizado

Para liofilizar las muestras se requiere:

- Muestra a liofilizar contenida en un matraz pera (de preferencia)
 - Hielo seco
 - Desecador con entrada de vacío
 - Trampa para vacío
 - Bomba de vacío con mangueras y barómetro
 - Membrana Millipore®
1. Cubrir la boca del matraz con un trozo suficiente de membrana Millipore®
 2. Congelar la muestra con hielo seco, para garantizar que el acetonitrilo contenido en la disolución también se congele
 3. Insertar la trampa en un termo con hielo seco alrededor, para recuperar el agua y el acetonitrilo que se liofilicen. Tapar el borde con una franela para conservar la temperatura.
 4. Insertar el matraz con la muestra congelada en el desecador, cuidando que quede bien colocada para evitar pérdidas. Conectar a la trampa y de ahí a la bomba de vacío.
 5. Encender la bomba de vacío y cerrar el paso de aire. Dejar el sistema funcionando por el tiempo necesario, verificando que la trampa no se llene con la liofilización.

Anexo II. Disoluciones empleadas en los procedimientos descritos

a) Buffer de Lisis

Componente	Concentración
NaCl	300 mM
Tris	50 mM
pH	9.0

b) Medio de Cultivo Lysogeny Broth (LB)

Componente	Concentración
NaCl	10 g/L
Tripsina	10 g/L
Extracto de Levadura	5 g/L
Agar (para Cajas Petri)	10 g/L

c) Antibióticos

Antibiótico	Concentración
Ampicilina	100 mg/mL
Kanamicina	15 mg/mL
Tetraciclina	6.25 mg/mL
Cloramfenicol	34 mg/mL

d) Buffer de tanque (Para PAGE)

Componente	Concentración
SDS	0.1% w/v
Tris	25 mM
Glicina	192 mM

e) Buffer de Carga (Para muestras de PAGE)

Componente	Concentración
Tris	50 mM
SDS	2% w/v
Glicerol	10% w/w
B-Mercaptoetanol	12.5 mM
Azul de Bromofenol	0.02% w/v

f) Disolventes para el cromatógrafo

Componente	Concentración
H₂O	0.05% TFA
Acetonitrilo	0.05% TFA

Anexo III. Protocolo de Obtención de Células Competentes

1. Seleccionar de una caja petri que contenga la cepa de interés una colonia aislada e inocular de 50 a 100 mL de medio LB en un matraz Erlenmeyer. Inocular a 37 °C con agitación hasta obtener una densidad óptica de 0.400 a 600 nm
2. Transferir el cultivo a tubos Falcon estériles y dejar reposar en hielo por 5 min
3. Centrifugar los tubos a 6000 rpm por 10 min a T = 4°C
4. Decantar y descartar el medio.
5. Resuspender cada botón celular con 10 mL de CaCl₂ 0.1 M estéril. Incubar en hielo por 10 min. Después de la incubación, centrifugar a 2500 rpm por 5 min
6. Repetir el paso anterior dos veces más
7. Resuspender el botón celular en 2 mL de CaCl₂ 0.1 M frío y estéril
8. Agregar a cada tubo 0.5 mL de glicerol al 50% m/v
9. Alicuotar la solución anterior en tubos de microcentrifuga estériles. Congelar en nitrógeno líquido o en una mezcla Hielo seco-Acetona y guardar a -70 °C.