



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Expresión de la alfa-neurotoxina MlatA1 de *Micrurus laticollaris* en *Pichia pastoris*  
y evaluación de su uso como inmunógeno

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Ulises Barrón Castillo

TUTOR PRINCIPAL  
Dr. Alejandro Alagón Cano  
[Instituto de Biotecnología UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dr. Gerardo Corzo Burguete  
[Instituto de Biotecnología UNAM](#)  
Dr. Mauricio Trujillo Roldán  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM](#)  
Dra. Norma Adriana Valdez Cruz  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM](#)

México, D. F. agosto, 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.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Alejandro Alagón Cano. Se agradece el apoyo financiero para la realización del presente trabajo a DGAPA a través del proyecto IN205214, a CONACyT a través del proyecto INFR-2014 #224494, a CONACyT por la beca #303433 otorgada para estudios de posgrado y al Tecnológico de Monterrey a través del premio Luis Elizondo 2014 por haber proporcionado el apoyo económico para la escritura de la tesis.

## DEDICATORIA

Dedicado a mis padres Gustavo y Guadalupe, que siempre me han enseñado que el trabajo duro tiene su recompensa. A mi hermano Osvaldo que siempre ha estado conmigo y me ha enseñado a levantarme en cada tropiezo. A mi hermano Mauricio por su apoyo y por contagiarme el amor por la biotecnología.

Arely, gracias por hacerme ver el mundo de otra manera y dejar huella en mi vida.

A mis amigos y compañeros, Arely, Crysele, Nancy, Nico, Miguel, Mafer, Gigio, Pichón, Chaparris, Dany, Rich, Felipon, Memo, Hilda, Raúl, Felipe Jr., Irving, Ray, Irene, Daya, Yeli, Maracucha, Herli, Francia, Vianey, Fany, Selma, Arlene, Belem, Mariel, Meli, Checo, Neri, Luis y Carlitos, por hacerme inmensamente feliz en mi paso por el IBT.

A mis entrañables amigos de UPIBI 20/17.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alejandro Alagón Cano por su asesoría durante todo el desarrollo del presente trabajo, por permitirme formar parte de su grupo de investigación, por su apoyo incondicional y confianza.

A los miembros de mi comité tutorial por su guía durante el desarrollo del presente proyecto:

Dr. Gerardo Corzo Burguete

Dr. Mauricio Trujillo Roldán

Dra. Norma Adriana Valdez Cruz

A los miembros del jurado por su tiempo, dedicación y sugerencias:

Dra. Clarita Olvera Carranza

Dra. Claudia Martínez Anaya

Dra. Yvonne Rosentein Azoulay

Dr. Lourival Domingos Possani Postay

Dr. Jaime Ortega López

A Angélica Linares, M. en C. Alejandro Olvera, Biol. Héctor Cardozo, Biol. Felipe Olvera, Ing. Carlos Olvera y M. en C. Herlinda Clement por el apoyo técnico y logístico brindado

Al Dr. Jaime Ortega López y a la Dra. Clarita Olvera Carranza por los plásmidos y cepas de *Pichia pastoris* donadas.

# ÍNDICE

ÍNDICE .....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xx
ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
NOMENCLATURA.....	xii
I. RESUMEN .....	1
II. INTRODUCCIÓN .....	3
II.1 Serpientes de coral o coralillo .....	3
II.2 <i>Micrurus laticollaris</i> .....	3
II.3 Péptidos de tres dedos .....	4
II.4 Anticuerpos neutralizantes contra alfa neurotoxinas de <i>Micrurus laticollaris</i> .....	5
II.5 Expresión heteróloga de proteínas en <i>E. coli</i> .....	6
II.6 <i>Pichia pastoris</i> como sistema heterólogo .....	7
II.7 Modificaciones post-traduccionales en <i>Pichia pastoris</i> .....	8

III.	ANTECEDENTES .....	11
III.1	Veneno de <i>Micrurus laticollaris</i> .....	11
III.2	Caracterización del veneno de <i>M. laticollaris</i> .....	11
III.3	Potencia neutralizante de Coralmyn contra los componentes del veneno de <i>M. laticollaris</i> .....	12
III.4	<i>Pichia pastoris</i> como sistema de expresión de péptidos o proteínas de veneno .....	13
IV.	JUSTIFICACIÓN .....	14
V.	HIPÓTESIS.....	14
VI.	OBJETIVOS.....	15
VI.1	General .....	15
VI.2	Particulares .....	15
VII.	METODOLOGÍA .....	16
VII.1	Obtención del plásmido pPICZalfaA-sMlatA1 .....	16
VII.1.1	Células calcio competentes .....	16
VII.1.2	Transformación de <i>E. coli</i> XL1blue con pPICZalfa-A y pUC57-sMlatA1.....	17
VII.1.3	Obtención de los plásmidos.....	17

VII.1.5 Ligación y transformación de <i>E. coli</i> XL1blue .....	17
VII.2 Transformación de <i>P. pastoris</i> X33 y SM5.....	18
VII.3 Selección de candidatos multicopia.....	19
VII.4 Confirmación de la recombinación homóloga mediante PCR .....	20
VII.5 Expresión de las proteínas HsMlatA1 y LsMlatA1 utilizando metanol como inductor ... .....	21
VII.6 Purificación de HsMlatA1 y LsMlatA1 mediante cromatografía de afinidad a Ni-NTA .. .....	22
VII.7 Cuantificación de sMlatA1 mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) .....	22
VII.8 Detección de HsMlatA1 y LsMlatA1 recombinante mediante SDS-PAGE y <i>Western- blot</i> .....	23
VII.9 Caracterización de proteína glicosilada .....	23
VII.10 Neurotoxicidad de las proteínas HsMlatA1 y LsMlatA1 en ratones .....	24
VII.11 Inmunización de conejos con las proteínas recombinantes de sMlatA1 .....	25
VII.12 Obtención de MlatA1 del veneno de <i>M. laticollaris</i> mediante RP-HPLC.....	255
VII.13 Título de anticuerpos determinado mediante ELISA .....	26
VII.14 Potencia neutralizante de los sueros en ratones.....	277

VIII.	RESULTADOS.....	29
VIII.1	Obtención de transformantes <i>Pichia pastoris</i> X33 y SM5 con pPICZalfaA-sMlatA1	29
VIII.2	Expresión de sMlatA1 en <i>Pichia pastoris</i> X33 y SM5.....	36
VIII.3	Purificación y detección de LsMlatA1 y HsMlatA1 .....	37
VIII.4	Unión específica de HsMlatA1 en cromatografía de afinidad a Concanavalina-A ...	38
VIII.5	Corte enzimático con Endoglicosidasa F1 .....	39
VIII.6	Neurotoxicidad de las recombinantes en ratones .....	40
VIII.7	Reconocimiento de MlatA1 por los sueros de conejo inmunizados.....	40
VIII.8	Potencia neutralizante de los sueros de conejo.....	42
IX.	DISCUSIÓN.....	44
IX.1	Alfa-neurotoxina sMlatA1 glicosilada .....	44
IX.2	Neurotoxicidad de las recombinantes en ratones CD1 .....	45
IX.3	Evaluación de títulos de anticuerpos por ELISA y capacidad neutralizante de los sueros obtenidos .....	46
IX.4	Neutralización.....	47
X.	CONCLUSIONES .....	49

XI.	PERSPECTIVAS.....	49
XII.	LITERATURA CITADA.....	50
XIII.	ANEXOS .....	57
XIV.	MEDIOS Y SOLUCIONES .....	62

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Fig. 1.** Distribución de *Micrurus laticollaris* en México (Campbell JA., and Lamar WL., 2004).
- Fig. 2.** Ejemplo de three finger toxin de cadena corta, estructura NMR de la Neurotoxina tipo II de *Naja oxiana* (Tsetlin, V.,1999).
- Fig. 3.** N-glicosilación en *Pichia pastoris*
- Fig. 4.** O-glicosilación en *Pichia pastoris*
- Fig. 5.** Recombinación homóloga y eventos de inserción en el genoma de *Pichia pastoris*
- Fig. 6.** Organización de *sMlatA1*
- Fig. 7.** Obtención de plásmidos. A) Vector pUC57-*sMlatA1*; B) Vector pPICZalfa-A
- Fig. 8.** Digestiones con endonucleasas *EcoRI* y *KpnI*. A) Vector pUC57- *sMlatA1*; B) Vector pPICZalfa-A.
- Fig. 9.** A) Purificación del gen *sMlatA1* y del vector pPICZalfaA; B) Plásmidos de los candidatos con el vector pPICZalfaA-*sMlatA1*.
- Fig. 10.** Selección de candidatos mediante digestiones enzimáticas con *EcoRI* y *KpnI*
- Fig. 11.** Secuencia de pPICZalfaA-*sMlatA1*
- Fig. 12.** A) Vector pPICZalfaA-*sMlatA1*; B) vector pPICZalfaA-*sMlatA1* linealizado con *SacI*.
- Fig. 13.** Productos de PCR de los candidatos de *P. pastoris* X33 y SM5 con *sMlatA1*

**Fig. 14.** Banda purificada del producto de PCR obtenida de la clona 6-X33 y clona 13-SM5 para secuenciación

**Fig. 15.** Curva de crecimiento de *P. pastoris* X33-sMlatA1 y *P. pastoris* SM5-sMaltA1

**Fig. 16.** Detección de proteínas purificadas LsMlatA1 y HsMlaA1 de los cultivos de 144 horas. A) SDS-PAGE tinción con azul de coomassie G250; B) Western blot utilizando un suero de conejo anti-MlatA1 (dilución 1:3000).

**Fig. 17.** Figura 17. Unión específica de HsMlatA1 a Concanavalina-A.

**Fig. 18.** Tratamiento de HsMlatA1 con EndoF1

**Fig. 19.** SDS-PAGE de MlatA1 y Western blot de MlatA1 utilizando los sueros de conejo (dilución 1:5000)

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Primers 3' y 5' AOX

**Tabla 2.** Número de colonias transformantes de *P. pastoris* X33 y SM5 resistentes a diferentes concentraciones de Zeocina

**Tabla 3.** Comparación de las Dosis letal media de las proteínas HsMlatA1, LsMlatA1 y MlatA1.

**Tabla 4.** Títulos de anticuerpos de los sueros de conejos contra el inmunógeno utilizado y contra MlatA1.

**Tabla 5.** Potencias neutralizantes de los sueros de conejo

## NOMENCLATURA

BMGY	Medio complejo con buffer, glicerol y YNB (Buffer Medium Glicerol YNB)
BMMY	Medio complejo con buffer, metanol y YNB (Buffer Medium Metanol YNB)
°C	Grados centígrados
CaCl <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O	Cloruro de calcio dihidratado
DMSO	Dimetil sulfóxido
DL <sub>50</sub>	Dosis Letal media (Cantidad de proteína necesaria para matar la mitad de una población animal)
HsMlatA1	Proteína recombinante MlatA1 hiperglicosilada
LsMlatA1	Proteína recombinante MlatA1 de bajo contenido de manosas
nAChRs	Receptor nicotínico de acetilcolina
kDa	Kilodaltones
M	Molar
MMM	Marcador de masa molecular
MR	Receptor de Manosas
OD <sub>600</sub>	Densidad óptica a 600 nm
ORF	Open Reading Frame (Marco abierto de lectura)
rpm	Revoluciones por minuto
RE	Retículo endoplasmático
<i>sMlatA1</i>	Gene sintético de MlatA1 con codones preferenciales para <i>P. pastoris</i>
sMlatA1	Alfa neuroxina MlatA1 expresada en <i>P. pastoris</i>
α-Bgtx	alfa bungarotoxina
α-MSP	α-Manosilpiranosa

## I. RESUMEN

En México, los envenenamientos ocasionados por serpientes de coral pueden resultar en un riesgo de muerte para el accidentado, aún más cuando el antiveneno comercial no es tan eficaz contra algunas especies de coral mexicanas. El presente trabajo explora la posibilidad de mejorar los antivenenos contra serpientes de coral y particularmente contra las alfa-neurotoxinas que son pobremente neutralizadas por el antiveneno y que son parte importante de la sintomatología.

La obtención de grandes cantidades de alfa-neurotoxinas de manera natural es complicada por su baja proporción en los venenos (menor al 5%), por lo cual, optamos por la obtención de alfa-neurotoxinas de manera recombinante. La producción de alfa-neurotoxinas en *Pichia pastoris* es una plataforma atractiva, ya que es un sistema productor de bajo costo, capaz de expresar proteínas con la estructura correcta. Sin embargo, hasta la fecha, solo se han conseguido producir este tipo de proteínas para estudios de mecanismos de acción y no para su uso como inmunógeno. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue utilizar *Pichia pastoris* como sistema de expresión heteróloga para producir la alfa-neurotoxina MlatA1 de *Micrurus laticollaris* y evaluar su uso como inmunógeno para la producción de anticuerpos neutralizantes contra MlatA1.

Para ello, un gen sintético con codones preferenciales para *P. pastoris* fue diseñado y clonado en el vector pPICZalfaA para expresar la proteína en la misma célula. Se evaluó la expresión de transformantes de las cepas X33 y SM5 en cultivos inducidos con metanol durante seis días. El resultado de la expresión fue bueno, con rendimientos de hasta 17.6 mg/L para *P. pastoris* X33y 8.4 mg/L para *P. pastoris* SM5. Sin embargo, las proteínas producidas por las dos cepas de *P. pastoris*, están glicosiladas, lo que se comprobó mediante la unión específica a Concanavalina-A y el uso de endoglicosidasa F1, siendo que MlatA1 de manera natural no es una proteína glicosilada. La actividad tóxica de la proteína recombinante glicosilada HsMlatA1 expresada en *P. pastoris* X33 resulto ser considerablemente menor a la MlatA1 nativa (106.2 veces). En cambio, la proteína recombinante sintetizada por la cepa *P. pastoris* SM5, la cual solo deja cinco residuos de manosas en glicosilaciones del tipo N, es más tóxica, lo cual muestra la importancia de los residuos de carbohidratos en la toxicidad de la proteína recombinante.

Las proteínas recombinantes HsMlatA1 (expresada en *P. pastoris* X33) y LsMlatA1 (expresada en *P. pastoris* SM5) fueron utilizadas como inmunógenos para la obtención de anticuerpos neutralizantes. Los resultados mostraron que los sueros de conejos inmunizados con LsMlatA1 tienen mayor capacidad neutralizante que los inmunizados con HsMlatA1.

Este trabajo presenta por primera vez el uso de proteínas recombinantes glicosiladas para la obtención de anticuerpos neutralizantes. El presente estudio muestra que *Pichia pastoris* es una plataforma adecuada para la expresión de alfa-neurotoxinas con altos rendimientos. La glicosilación influye en la capacidad toxica de las proteínas heterólogas y también en la obtención de anticuerpos con mayor capacidad neutralizante. Finalmente, este trabajo abre la puerta el desarrollo de nuevos antivenenos con mayor capacidad neutralizante sobre alfa-neurotoxinas.

## II. INTRODUCCIÓN

### II.1 Serpientes de coral o coralillo

Las serpientes de coral o coralillos son un tipo de serpientes venenosas que pueden ser encontradas desde el sur de E.U.A. hasta Argentina. Estas serpientes se caracterizan por su brillante coloración, generalmente en patrones de anillos rojos, negros y amarillos o blancos (Campbell JA., and Lamar WL., 2004). Son serpientes huidizas y relativamente pequeñas, rara vez superan un metro de longitud. En la mayoría de los casos, pasan gran parte del tiempo bajo troncos u hojarasca, cazando serpientes pequeñas o lagartijas, las cuales componen gran parte de su dieta (Bénard-Valle, M. 2009).

Debido a lo anterior, la frecuencia de envenenamiento por mordedura de coral no es tan alta en comparación a la ocasionada por la familia Viperidae (*Bothrops*, *Crotalus* y *Agkistrodon*), sin embargo, la alta toxicidad de los venenos de las serpientes de coral hace de estos accidentes un problema de salud pública relevante que requiere de tratamientos efectivos (Manock SR., *et al.*, 2008; Bénard-Valle, M., 2011).

Las personas que son envenenadas por mordedura de serpiente de coral presentan cuadros clínicos marcadamente neurotóxicos, cuya severidad varía de leve a muy grave e incluso fatal. Los casos leves se caracterizan por síntomas locales como enrojecimiento, inflamación y en algunos casos dolor. En casos moderados existe flacidez, caída de los párpados superiores, parálisis flácida de los músculos de la laringe, faringe y mandíbula, inmovilidad de los globos oculares, movimiento involuntario de los ojos y salivación excesiva; en casos severos puede presentarse parálisis flácida del cuello y extremidades, seguida de una parálisis del diafragma dando lugar a la muerte por parálisis respiratoria (Bénard-Valle, M., 2011).

### II.2 *Micrurus laticollaris*

Una de las especies de serpientes de coral de mayor distribución en México es *Micrurus laticollaris*, la cual se encuentra en los estados de Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Morelos, Puebla y Oaxaca (Fig. 1) (Campbell JA., and Lamar WL., 2004).

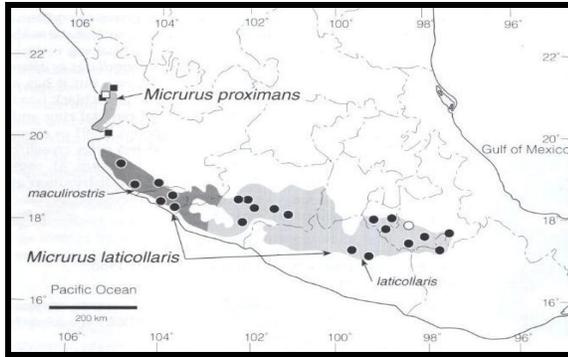


Figura 1. Distribución de *Micrurus laticollaris* en México (Campbell JA., y Lamar WL., 2004).

El veneno de *Micrurus laticollaris* está compuesto de una gran variedad de proteínas (Carbajal-Saucedo A., 2004). Las de mayor relevancia son las beta-neurotoxinas y alfa-neurotoxinas, responsables de la parálisis muscular.

Las beta neurotoxinas bloquean la liberación de acetilcolina en la región pre-sináptica en la unión neuromuscular y poseen actividad de fosfolipasa; representan el componente mayoritario en el veneno y tiene un peso molecular aproximado de 14 kDa. Por otro lado, las alfa-neurotoxinas actúan bloqueando el receptor nicotínico de acetilcolina (nAChRs) de la región post-sináptica en la unión neuromuscular (Phui, JS., *et al.*, 2003), son antagonistas del neurotransmisor, evitando la apertura del canal iónico y por lo tanto la transmisión del impulso nervioso. Tienen un peso molecular aproximado de 7 kDa (de Oliveira, JS., *et al.*, 2002).

### II.3 Péptidos de tres dedos

Las alfa-neurotoxinas pertenecen a la familia de péptidos conocida como de tres dedos, debido a que su estructura se caracteriza por tres loops estabilizados por puentes disulfuro, que asemejan la forma de tres dedos de una mano (Fig. 2) (de Oliveira, JS., *et al.*, 2002, Osipov, AV., *et al.*, 2004). Las  $\alpha$ -neurotoxinas, impiden la contracción muscular mediante la unión a las subunidades  $\alpha/\gamma$  ó  $\alpha/\epsilon$  del nAChRs, son toxinas con una letalidad muy alta en ratones con valores de dosis letal media (DL<sub>50</sub>) de 0.04-0.3 mg/Kg (Carbajal-Saucedo, A., 2014).



Figura 2. Ejemplo de péptido de tres dedos de cadena corta, estructura NMR de la Neurotoxina tipo II de *Naja oxiana* (Tsetlin, V., *et al.*, 1999).

Las alfa-neurotoxinas están clasificadas en dos grupos, las de cadena corta cuya composición consta de 60-62 aminoácidos y se encuentran estabilizadas por cuatro puentes disulfuro, y proteínas de cadena larga las cuales tienen 66-74 aminoácidos y están estabilizadas por cinco puentes disulfuro (Kini, RM. and Doley, R., 2010). Actualmente, se conocen los aminoácidos de algunas alfa neurotoxinas que están involucrados en la unión al nAChRs, como por ejemplo la erabutoxina b (un ejemplo clásico de alfa-neurotoxina de cadena corta). Mediante mutaciones sitio-dirigidas de la erabutoxina b se identificaron los residuos involucrados en la unión al nAChRs de la anguila eléctrica. La erabutoxina b contacta con el receptor mayormente a través de los siguientes residuos: Lys27, Trp29, Asp31, Phe32, Arg33 y Lys47; secundariamente también participan los siguientes aminoácidos: His6, Gln7, Ser8, Ser9, Gln10, Tyr25, Gly34, Ile36 y Glu38 (Pillet, L., *et al.*, 1992, Nirthanan, S., and Gwee, M., 2004).

#### II.4 Anticuerpos neutralizantes contra alfa neurotoxinas de *Micrurus laticollaris*

Las alfa neurotoxinas que se encuentran en el veneno de *M. laticollaris* únicamente representan el 2 % del total de proteínas (Carbajal-Saucedo A., *et al.*, 2013). Se ha visto que los sueros de animales inmunizados con el veneno tienen bajos títulos de anticuerpos neutralizantes contra las alfa neurotoxinas, pero no así contra las beta neurotoxinas, lo que quizás se deba a la baja proporción de alfa neurotoxina en el veneno (Chotwiwatthanakun, C., *et al.*, 2001; Carbajal- Saucedo A., 2014). Sin embargo, se ha visto que los sueros de animales inmunizados únicamente con alfa neurotoxinas si presentan altos títulos (Carbajal-Saucedo, A., *et al.*, 2013).

Una de las opciones para obtener anticuerpos neutralizantes contra los componentes principales, es enriquecer el veneno para inmunizar con alfa neurotoxinas con actividad tóxica, sin embargo, es difícil obtener cantidades suficientes de este componente de manera nativa, por dos razones principales, primero, la proporción en los venenos de corales mexicanas y norteamericanas es baja (menor al 5 por ciento; Carbajal-Saucedo A., 2014) y segundo, resulta muy difícil encontrar y mantener ejemplares de serpientes de coral para obtener el veneno necesario para purificar alfa neurotoxinas.

## **II.5 Expresión heteróloga de proteínas en *E. coli***

Una opción para producir proteínas difíciles de obtener de manera natural es el uso de la ingeniería genética. Las proteínas recombinantes pueden servir para explorar mecanismos de acción y determinar estructuras (Quintero, V., *et al.*, 2011); además, pueden ser utilizadas en la inmunización de animales para la generación de sueros experimentales (Olvera, A., *et al.*, 2006).

*Escherichia coli* es el sistema de expresión heteróloga más utilizado debido a su capacidad de producir grandes cantidades de proteína en tiempos cortos; la facilidad en el manejo, los bajos costos de cultivo y el gran número de herramientas moleculares disponibles para este organismo. Sin embargo, tiene la desventaja de no realizar modificaciones post-traduccionales como glicosilaciones, y frecuentemente el sistema de expresión *E. coli* forma cuerpos de inclusión (agregación de proteínas mal plegadas y sin actividad) (Sorensen, H., and Mortensen, K., 2005). Existen factores que provocan la agregación de proteínas como lo son: la terminación prematura de la traducción, el ambiente reductor del citoplasma y la pérdida de estructura provocada por estrés ambiental (Siurkus, J. and Neubaue P., 2011; Brondyk, WH., 2009). La producción de la proteína de interés en cuerpos de inclusión generalmente involucra su solubilización con agentes desnaturizantes y su posterior plegamiento *in vitro*.

La solubilización de los cuerpos de inclusión con agentes caotrópicos y el plegamiento *in vitro* de las proteínas recombinantes si bien se logra en algunos casos, falla en la mayoría. Los obstáculos más grandes para el plegamiento *in vitro* son: la

optimización de las condiciones para cada proteína, el bajo rendimiento de plegado y la posibilidad de que la re-solubilización afecte la integridad de la proteína (Sorensen, H. and Mortensen, K., 2005).

Existen diferentes métodos y condiciones para la obtención de proteínas solubles en *E. coli*, como lo son: la variación de la temperatura de cultivo, la utilización de diferentes cepas, uso de diferentes medios de cultivo y expresión como proteínas de fusión que les permite incrementar la solubilidad. Las proteínas de fusión se consiguen uniendo dos o más genes que codifican para las proteínas originalmente separadas y la traducción de este gen de fusión se traduce en un único polipéptido. Entre las proteínas más utilizadas para fusionar esta la Glutathion S-transferasa, Tiorredoxina, MBL y NusA (Sorensen, H. and Mortensen, K., 2005).

El uso de proteínas de fusión, facilita la subsecuente purificación y aumenta la solubilidad, sin embargo, el corte de proteínas de fusión por parte de proteasas específicas es a menudo incompleta o inespecífica, llevando a la fragmentación de las proteínas de interés (Sorensen, H. and Mortensen, K., 2005).

## **II.6 *Pichia pastoris* como sistema heterólogo**

La opción para evitar la incorrecta estructuración tridimensional es el uso de células eucariotas como sistema de expresión. Las células eucariotas tienen proteínas (chaperonas) que interactúan transitoriamente con las proteínas durante su síntesis para asistirles en el correcto plegamiento en el retículo endoplasmático (RE), además, el RE tiene un ambiente oxidante que favorece a la formación de los puentes disulfuro (Brodsky, JL. and William, RS., 2011).

Entre las células eucariotas más utilizadas para expresar proteínas heterólogas están las levaduras, empleadas tanto a nivel académico como industrial. Las ventajas que ofrece este sistema de expresión sobre otros eucariotes son: crecimiento rápido, fácil manipulación, costos bajos de cultivo y niveles de expresión altos (Quintero, V., 2011).

Una de las levaduras más utilizadas en la actualidad es *Pichia pastoris*, una levadura metilotrófica (puede utilizar metanol como única fuente de carbono), que tiene la ventaja

de tener bajos niveles de expresión de proteínas endógenas al medio de cultivo, lo cual facilita la purificación de la proteína de interés si la proteína se expresa extracelularmente (Celik, E. and Calik, P., 2011, Ezzine, A., *et al.*, 2012). *Pichia pastoris* puede ser crecida en metanol como única fuente de carbono, a concentraciones que no permitirían el crecimiento de otros microorganismos en casos de contaminación, además de tener mejores rendimientos en comparación con otras levaduras (Quintero V., 2011). Otra de las ventajas que ofrece el sistema *P. pastoris* es la obtención de cultivos con alta densidad celular sin la acumulación de niveles tóxicos de etanol descritos en el caso de *S. cerevisiae* (Ezzine, A., *et al.*, 2012).

Los vectores de expresión de *P. pastoris* se integran en el genoma vía recombinación homóloga (los vectores tienen regiones homólogas al genoma de *P. pastoris*), en comparación con los vectores episomales (extracromosomales) de otras levaduras. La integración al genoma proporciona transformantes más estables y eficientes (Daly, R. and Hearn, MT., 2005; Brondyk, WH., *et al.*, 2009; Li, P., *et al.*, 2007). Existen una gran variedad de vectores comerciales para *P. pastoris*, con genes que le confieren resistencia a diferentes antibióticos (zeocina, blasticidina, ampicilina y kanamicina), que pueden ser inducibles o constitutivos y pueden tener o no una señal de secreción. Actualmente, uno de los vectores más utilizados por su fácil manejo (otros vectores tienen un tamaño superior y llegan a ser problemáticos en la clonación -Daly, R. and Hearn, MT., 2005-) es el vector pPICZalfa, que contiene un promotor inducible por metanol, un sitio múltiple de clonación, un gen de resistencia al antibiótico zeocina, un origen de replicación para *E. coli* y un gen que codifica para un péptido señal de secreción del Mat- $\alpha$ , el cuál proviene de *Saccharomyces cerevisiae* (ANEXO 1).

## **II.7 Modificaciones post-traduccionales en *Pichia pastoris***

*P. pastoris* es capaz de realizar tanto O- como N-glicosilaciones en proteínas que son secretadas (Cregg, JM, *et al.*, 2000, Lin-Cereghino, GP., *et al.*, 2002, Damasceno, LM., *et al.*, 2012).

Las levaduras y eucariotes superiores utilizan una ruta de biosíntesis de oligosacáridos tipo N- que involucra la formación del precursor Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PP-dolicol lípido, que es transferido por oligosacariltransferasas en el lado luminal del RE y

que se une al grupo amida de los residuos Asn que tengan la secuencia primaria Asn-X-Ser/Thr, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina (Li, P., *et al.*, 2007). Posteriormente, las glucosidasas I y II remueven las glucosas y una manosiltransferasa remueve un residuo de manosa alfa 1,2. Estos pasos secuenciales llevan a la formación de una estructura de Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub>. El proceso de transferencia de los demás azúcares se realiza en el aparato de Golgi (Hamilton, SR., *et al.*, 2003, Li, P., *et al.*, 2007). En las N-glicosilaciones la cadena de oligosacáridos de glicoproteínas expresadas en *P. pastoris* son más cortas que las de *S. cerevisiae*. En promedio la longitud de la cadena es de 8-20 residuos de manosas, mientras que en *S. cerevisiae* es de 40-150 (Fig. 3) (Li, P., *et al.*, 2007).

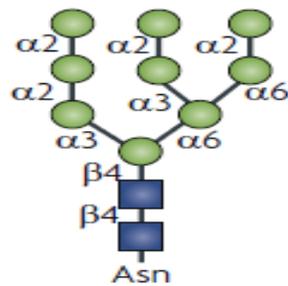


Figura 3. N-glicosilación en *Pichia pastoris*. ■ *N-Acetilglucosamina*  
● *Manosa*, (Daly, R. and Hearn, MT., 2005).

En levaduras la O-glicosilación comienza en el RE por una familia de O-manosiltransferasas que transfieren la primer manosa al grupo hidroxilo de las serinas o treoninas de la proteína expresada, utilizando como donador dolicol fosfato manosa (Dol-P-Man). Subsecuentemente en el aparato de Golgi, las manosiltransferasas adicionan las siguientes manosas con enlaces alfa 1-2 con GDP-manosa como donador (Fig. 4) (Nett, JH., *et al.*, 2013). La cadena de oligosacáridos en las O-glicosilación de levaduras típicamente contiene entre 1 y 5 residuos de manosas unidos por enlaces alfa 1-2 (Fig. 4). Si bien no hay secuencias consenso para la O-glicosilación, la probabilidad de O-glicosilación aumenta cuando hay una inusual abundancia de serinas/treoninas o cuando residuos de prolina están cerca de Ser o Thr (Hamilton, SR., *et al.*, 2013, Nett, JH., *et al.*, 2013).

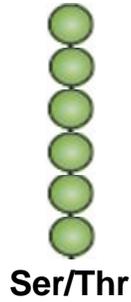


Figura 4. O-glicosilación en *Pichia pastoris*. ● Manosa (Nett, JH, et al., 2013)

El resultado de la glicosilación puede ser heterogéneo en la población de proteínas. Es decir, una proteína dada puede tener diferente número de oligosacáridos, aunque haya sido expuesta a las mismas enzimas y a la misma maquinaria de glicosilación. Habrá poblaciones de proteína donde puede estar o no estar glicosilada (Ozturk, SS. *et al.*, 2006, Magnus-Sjöblom, 2008).

### III. ANTECEDENTES

#### III.1 Veneno de *Micrurus laticollaris*

Se han descrito alrededor de 80 especies de serpientes de coral para el continente Americano, todas ellas de importancia médica. En México, *M. diastema* y *M. laticollaris* son las especies más importantes en términos médicos, debido a su alta toxicidad (Bolaños, R., *et al.*, 1978).

Actualmente los envenenamientos por serpiente de coral son tratados con el antiveneno comercial Coralmyx®, generado mediante la inmunización de caballos con el veneno de *Micrurus nigrocintus*, una especie de coral centroamericana que también es encontrada en los estados de Oaxaca y Chiapas (Campbell, JA. *et al.*, 2004). Coralmyx® ha probado ser eficaz en casos clínicos, sin embargo, rara vez se conoce la especie que ocasionó el envenenamiento. Este antiveneno tiene baja capacidad neutralizante contra algunas especies mexicanas como *M. laticollaris*.

#### III.2 Caracterización del veneno de *M. laticollaris*

Nuestro grupo de trabajo ya ha caracterizado los componentes del veneno de *M. laticollaris*. Mediante cromatografía de intercambio catiónico (con una columna MonoS R/5/5, Pharmacia) se lograron obtener 12 fracciones a las cuales se les determinó su DL<sub>50</sub> y actividad fosfolipasa. Hemos demostrado que únicamente siete fracciones son letales en ratones y que tienen actividad fosfolipasa, a excepción de la fracción 2, evidencia de que se trata de una alfa-neurotoxina y no una beta-neurotoxina, ya que las alfa-neurotoxinas no tienen actividad fosfolipasa. Además, utilizando SDS-PAGE observamos que la masa molecular correspondía a la reportada para las alfa-neurotoxinas. La fracción 2 mostró una DL<sub>50</sub> de 2 µg/ratón y un peso molecular que corresponde a los reportados para alfa-neurotoxinas. Esta fracción fue nuevamente fraccionada por RP-HPLC en una columna C18 y únicamente la fracción 2.1 (nombrada MlatA1), la más abundante, fue sujeta a estudios. MlatA1 tiene una DL<sub>50</sub> de 63.5 µg/kg de ratón con un intervalo de confianza de ± 2.5, y representa alrededor del 2% del total de proteínas del veneno. La proteína purificada (fracción 2.1) del RP-HPLC fue digerida con las endopeptidasas proteolíticas Glu-C y Asp-N, los fragmentos resultantes fueron secuenciados por degradación de

Edman automática, usando un LF 3000 Protein Sequencer de Beckman. La secuencia de aminoácidos que se obtuvo fue la siguiente:

RICYNQQSSQPPTTKTCSEGQCYKKTWRDHRGTIIERGACAP NVKPGIQISCCTSDKCNG
--

Al igual que la fracción 2 (MlatA1) de la cromatografía de intercambio iónico, las demás fracciones fueron nuevamente separadas por cromatografía RP-HPLC. La toxicidad de cada una de ellas fue evaluada y se observó que solo algunas eran capaces de matar ratones (Carbajal-Saucedo, A., *et al.*, 2013).

### **III.3 Potencia neutralizante de Coralmyn contra los componentes del veneno de *M. laticollaris***

La potencia neutralizante del antiveneno Coralmyn® fue determinada utilizando las fracciones provenientes del fraccionamiento por RP-HPLC y que fueron letales. Los resultados demostraron que la neutralización del antiveneno Coralmyn® contra MlatA1 es hasta 7.5 veces más baja en comparación con las otras fracciones, lo que nos hace hipotetizar que MlatA1 es responsable de la baja potencia neutralizante contra el veneno completo de *M. laticollaris*.

Por otro lado, la secuencia nucleotídica de MlatA1 fue clonada en el vector de expresión pQE60, posteriormente, se expresó el gen utilizando células de *E. coli* BL21 Gold DE3 (Carbajal-Saucedo, A., *et al.*, 2013). Se logró obtener una proteína soluble, sin embargo, no mostró actividad letal, probablemente por un plegamiento incorrecto. Aun así la proteína fue utilizada para inmunizar conejos. Los anticuerpos generados en los conejos inmunizados con la proteína proveniente de *E. coli* reconocen la recombinante y la proteína nativa pero no son neutralizantes (Carbajal-Saucedo, A., *et al.*, 2013), por lo que sería deseable tener otras fuentes de proteína recombinante, que indujesen la producción de anticuerpos neutralizantes.

### III.4 *Pichia pastoris* como sistema de expresión de péptidos o proteínas de veneno

Se han expresado exitosamente péptidos o proteínas de venenos (con diversos tamaños y número de puentes disulfuro) en el sistema de expresión *Pichia pastoris*. Por mencionar algunos, el péptido analgésico BmK AngM1 del escorpión chino *Buthusmartensii karsch* de 7.9 kDa y cuatro puentes disulfuro, donde obtuvieron rendimientos de hasta 9 mg/L (Yang, J.L., *et al.*, 2009); las neurotoxinas específicas del escorpión de Israel de 9.4 kDa y cuatro puentes disulfuro, donde obtuvieron rendimientos de hasta 500 mg/L (Li, H. *et al.*, 2008); la batroxobina, una enzima similar a trombina que proviene de la serpiente brasileña *Bothrops atrox* con un peso molecular de 30.5 kDa y con seis puentes disulfuro donde obtuvieron rendimientos de hasta 7 mg/L (You, W.K., *et al.*, 2004), y por último una metaloproteínasa proveniente de una serpiente del sureste de Asia, *Trimeresurus albolabris* que tiene un peso molecular de 11 kDa y seis puentes disulfuro, donde se obtuvieron rendimientos de hasta 3.3 mg/L (Pon, S. *et al.*, 2007). Además, ya se han expresado péptidos de la familia de los tres dedos en *P. pastoris*, como lo son la dendroaspina, erabutoxina b,  $\alpha$ -bungarotoxina,  $\gamma$ -bungarotoxina y  $\kappa$ -bungarotoxina con rendimientos de hasta 18 mg/L y con actividades similares a los péptidos nativos (Anangi, R., *et al.*, 2007; Cheng, C.H., *et al.*, en el 2009). Cheng, C.H., *et al.*, 2009, realizaron un análisis de resonancia magnética nuclear y demostraron que las recombinantes de dendroaspina y erabutoxina b tienen la misma estructura que las proteínas nativas. Estos resultados demostraron que toxinas de tres dedos pueden ser expresadas en *P. pastoris* con un correcto plegamiento. Para la expresión de dendroaspina construyeron un gene sintético con codones preferenciales para *P. pastoris* (Chen, C.Y., *et al.*, 2006).

Así, el presente proyecto tiene como finalidad la producción de la alfa-neurotoxina MlatA1 de *Micrurus laticollaris* en *Pichia pastoris*, utilizando el gen que codifica para la proteína MlatA1 con codones preferenciales para dicho organismo y clonado en el vector de expresión pPICZalfa, así como la expresión de la proteína recombinante inducida con metanol. Adicionalmente a ello, el presente estudio evalúa el uso de las proteínas recombinantes como inmunógeno para la obtención de anticuerpos neutralizantes.

#### **IV. JUSTIFICACIÓN**

El antiveneno comercial Coralmyn® ha mostrado baja eficiencia contra algunos venenos de serpientes mexicanas. Estudios anteriores demostraron que Coralmyn® tiene una baja potencia neutralizante contra las alfa-neurotoxinas del veneno de *Micrurus laticollaris*. Por lo tanto, es necesario mejorar los antivenenos para serpientes de coral ya existentes, contra el efecto tóxico de alfa neurotoxinas: Una alternativa posible es el enriquecimiento del veneno a inmunizar con alfa-neurotoxina recombinante activa (tóxica) y la plataforma de expresión *Pichia pastoris* ha demostrado ser viable, para producir proteínas de la familia de las alfa-neurotoxinas, lo cual permitirá cubrir las necesidades de alfa-neurotoxina para el enriquecimiento de los venenos a inmunizar.

#### **V. HIPÓTESIS**

Utilizando *Pichia pastoris* como sistema de expresión heteróloga, se obtendrá la alfa neurotoxina (MlatA1) de *Micrurus laticollaris* recombinante con estructura nativa que podrá ser utilizada como inmunógeno para la obtención de anticuerpos neutralizantes.

## VI. OBJETIVOS

### VI.1 General

Producir MlatA1 de *Micrurus laticollaris* funcional en el sistema de expresión *Pichia pastoris* y utilizarla como inmunógeno para obtener anticuerpos neutralizantes.

### VI.2 Particulares

- Obtener levaduras transformantes de *P. pastoris* X33 y SM5 con el vector pPICZalfaA-sMlatA1
- Expresar el gen de sMlatA1 recombinante utilizando metanol como inductor.
- Purificar la proteína sMlatA1 mediante cromatografía de afinidad a Ni-NTA.
- Comprobar la neurotoxicidad de las recombinantes en ratones CD1
- Inmunizar conejos con la proteína recombinante.
- Evaluar títulos de anticuerpos por ELISA y capacidad neutralizante de los sueros obtenidos.

## VII. METODOLOGÍA

El diseño de genes sintéticos con el uso preferencial de codones para el organismo de expresión puede mejorar los niveles de expresión de proteínas heterólogas, además, en el diseño pueden adicionarse secuencias consenso, sitios de splicing, sitios de restricción y secuencias que codifiquen para proteínas de fusión; los genes sintéticos si bien conllevan un costo adicional en la obtención de recombinantes, al final, los beneficios pueden ser mayores (Gustafsson C., *et al.*, 2004).

Utilizando la secuencia de MlatA1 reportada en Genbank (#JQ247015.1), se diseñó un gen sintético de mlatA1 con los codones preferenciales para *P. pastoris*, al cual llamamos sMlatA1, el cual fue mandado a sintetizar a la compañía Genescript®. El gen sMlatA1 nos fue entregado dentro del vector pUC57 (pUC57-sMlatA1-Anexo1).

### VII.1 Obtención del plásmido pPICZalfaA-sMlatA1

#### VII.1.1 Células calcio competentes

Para obtener mayor cantidad de los plásmidos pUC57-sMlatA1 (Anexo1) y pPICZalfa-A (vector de expresión para *P. pastoris*-Anexo 2) y trabajar en la manipulación genética (clonación, digestiones enzimáticas, secuenciación, etc...) fue necesario transformar células calcio competentes de *E. coli* con ambos vectores pues tienen también un origen de replicación para la bacteria *E. coli*.

Se creció un cultivo de células *E. coli* XL1-blue en 3 mL de medio LB más 3 µL de tetraciclina (10 mg/mL) ya que las células son resistentes a este antibiótico, y se incubó a 37 °C a 250 rpm toda la noche. Posteriormente, se tomaron 1.6 mL del cultivo para inocular un matraz con 50 mL de medio LB y se incubó a 37 °C a 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (OD<sub>600</sub>) de 0.8. Después, se centrifugó el cultivo a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, el pellet fue recuperado y se resuspendió con 5 mL de CaCl<sub>2</sub> (0.1 M). En seguida, se incubó en hielo durante dos horas. Nuevamente, se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, el pellet fue recuperado y se resuspendió con 5 mL de CaCl<sub>2</sub> (0.1 M) estéril y se agregaron 88 µL de DMSO por cada mililitro de células en CaCl<sub>2</sub>. Se hicieron alícuotas de 100 µL de células calcio-competentes y se almacenaron a -70 °C hasta su uso (Sambrook, J., *et al.*, 1989).

### **VII.1.2 Transformación de *E. coli* XL1blue con pPICZalfa-A y pUC57-sMlatA1**

Para transformar *E. coli* XL1-blue se colocaron 100  $\mu$ L de bacterias calcio-competentes en 2 tubos para microcentrífuga, en el primero se añadió 50 ng del vector pPICZalfa-A y en el segundo 50 ng del vector pUC57-sMlatA1. A las células se les aplicó un choque térmico, primero incubando en hielo por 5 minutos y después en baño maría a 42 °C por 45 segundos; por último, se incubaron en hielo por 5 minutos. Después, las células transformantes con pUC57-sMlatA1 se extendieron en placas con medio LB más ampicilina, y para el caso de pPICZalfa-A se extendieron en placas con medio LB (bajo en sales) más zeocina (25  $\mu$ g/mL). Por último, se incubaron a 37 °C durante 16 horas.

### **VII.1.3 Obtención de los plásmidos**

Para la obtención de pUC57-sMlatA1, se inocularon tubos con medio LB más ampicilina (75  $\mu$ g/mL) con *E.coli*-pUC57-sMlatA1. Para el caso de pPICZalfa-A se inocularon tubos con medio LB (bajo en sales) más zeocina (25  $\mu$ g/mL) con *E. coli* pPICZalfa-A; los tubos se incubaron durante 15 horas a 37°C y 250 rpm. Posteriormente los plásmidos fueron purificados utilizando el kit High Pure Plasmid Isolation de ROCHE siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Para extraer el gen del vector pUC57-sMlatA1 y clonarlo en el vector de expresión pPICZalfa-A, se utilizaron las enzimas de restricción *EcoRI* y *KpnI* de New England Biolabs, utilizando el protocolo descrito por el proveedor.

### **VII.1.5 Ligación y transformación de *E. coli* XL1blue**

Para ligar el gen *sMlatA1*, primero se digirió el vector pPICZalfa-A con las enzimas de restricción *EcoRI* y *KpnI*, y se corrió en un gel de agarosa al 1%. Después, se purificó la banda de 222 pb con el kit High Pure PCR Product Purification de ROCHE y se desfosforiló con la enzima CIAP (Calf Intestin Alkaline Phosphatase, de ROCHE) de acuerdo al protocolo descrito por el proveedor. Posteriormente, se colocaron 0.02 pmoles del vector linealizado (pPICZalfa-A) y desforforilado en un tubo de 1.5 mL, se adicionaron 0.12 pmoles del inserto (gene *sMlatA1*), 20 UI de T4 DNA ligasa, buffer de ligasa 5X y se llevó a un volumen final de 10  $\mu$ L con agua, por último, se incubó a 16 °C por 2 horas. Con

la mezcla de ligación se transformaron células *E. coli* XL1-blue calcio competentes para generar más plásmido (sección VII.1.3). Las colonias resultantes fueron crecidas en 3 mL de medio LB bajo en sales más zeocina (25 µg/mL), después, se obtuvo el plásmido utilizando el kit High Pure Plasmid Isolation de ROCHE. Después, se hicieron ensayos con las enzimas de restricción para dar certeza de la inserción del gen *sMlatA1*. Y por último el plásmido se mandó a secuenciar para confirmar la secuencia nucleotídica.

## VII.2 Transformación de *P. pastoris* X33 y SM5

El siguiente método se utilizó tanto para la cepa *P. pastoris* X33 como para la cepa *P. pastoris* SM5:

Antes de transformar fue necesario la obtención de células *P. pastoris* electrocompetentes. Se inoculó un tubo con medio YPD con una colonia de *P. pastoris* y se incubó a 30 °C a 200 rpm toda la noche (preinoculo). Se colocaron 0.5 mL del preinoculo en un matraz de 500 mL bafleado con 125 mL de medio YPD, se incubó a 30 °C a 200 rpm hasta llegar a una OD<sub>600</sub> de 1.5, posteriormente, se siguieron los siguientes pasos:

1. Centrifugar el cultivo a 1500 g durante cinco minutos a 4°C y eliminar el sobrenadante.
2. Resuspender el botón celular con 125 mL de agua estéril previamente enfriada; después, centrifugar a 1500 g por cinco minutos a 4 °C y eliminar el sobrenadante.
3. Resuspender el botón celular con 62.5 mL de agua destilada estéril previamente enfriada; después, centrifugar a 1500 g por cinco minutos a 4°C y eliminar el sobrenadante.
4. Resuspender el botón celular con cinco mL de Sorbitol-D 1 M estéril previamente enfriado; después, centrifugar a 1500 g por cinco minutos a 4 °C y eliminar el sobrenadante.
5. Resuspender el botón celular en 250 µL de Sorbitol-D 1M y almacenar a -70° C.

Por otro lado, el vector pPICZalfaA-*sMlatA1* se digirió con la enzima de restricción *SacI*, incubando a 37 °C por tres horas. Posteriormente, se corrió en un gel de agarosa al 1% para verificar la eficiencia del corte y se inactivó la enzima a 65 °C por 15 minutos. El plásmido digerido fue precipitado con N-butanol y posteriormente se centrifugó por 5 minutos a 13,600 rpm. Después, al precipitado se le adicionó etanol al 100% y nuevamente se centrifugó a 13,600 rpm por cinco minutos, al precipitado se le adicionó etanol al 70% y se centrifugó a 13,600 rpm durante cinco minutos, por último, pellet se resuspendió en agua.

Para transformar las levaduras se utilizó la electroporación, que es una técnica que consiste en la administración de pulsos rápidos de una corriente eléctrica de gran voltaje a fin de producir poros transitorios en la membrana y volverla permeable para el ingreso del DNA. La electroporación se realizó colocando en una celda para electroporar de dos mm (estéril) 80 µL de células *P. pastoris* electrocompetentes y 1 µL (0.5 µg) del vector pPICZalfaA-*sMlatA1* linealizado, y se incubó en hielo por cinco minutos. Posteriormente, se colocó la celda en un electroporador BTX ECM-600 y se le aplicó un choque eléctrico con 1.5 KV, 186 Ω y 25 µF, inmediatamente se le adicionó 1 mL de Sorbitol (1M) frío. Por último, se transfirió toda la mezcla en tubos estériles de 13 mm X 100 mm y se incubaron dos horas a 30 °C sin agitación. Se sembraron 100 µL de las células transformadas en placas con medio YPDS más zeocina (100 µg/mL) y se incubaron a 30 °C por cuatro días (Higgins, DR., y Cregg, JM., 1998, Weidner, M, *et al.*, 2010).

### **VII.3 Selección de candidatos multicopia**

La transformación de *P. pastoris* sucede mediante recombinación homóloga, donde los eventos de inserción pueden ocurrir más de una vez en un mismo locus AOX1 de la levadura (Fig. 5) . Las colonias con más de 1 cassette (vector con el gen de interés) se les denomina multicopia y el beneficio que provoca esta multi-inserción es un posible aumento en los niveles de expresión. La manera más fácil de seleccionar estas transformantes es aumentando la concentración del antibiótico, ya que en el cassette también se encuentra el gen de resistencia al antibiótico zeocina.

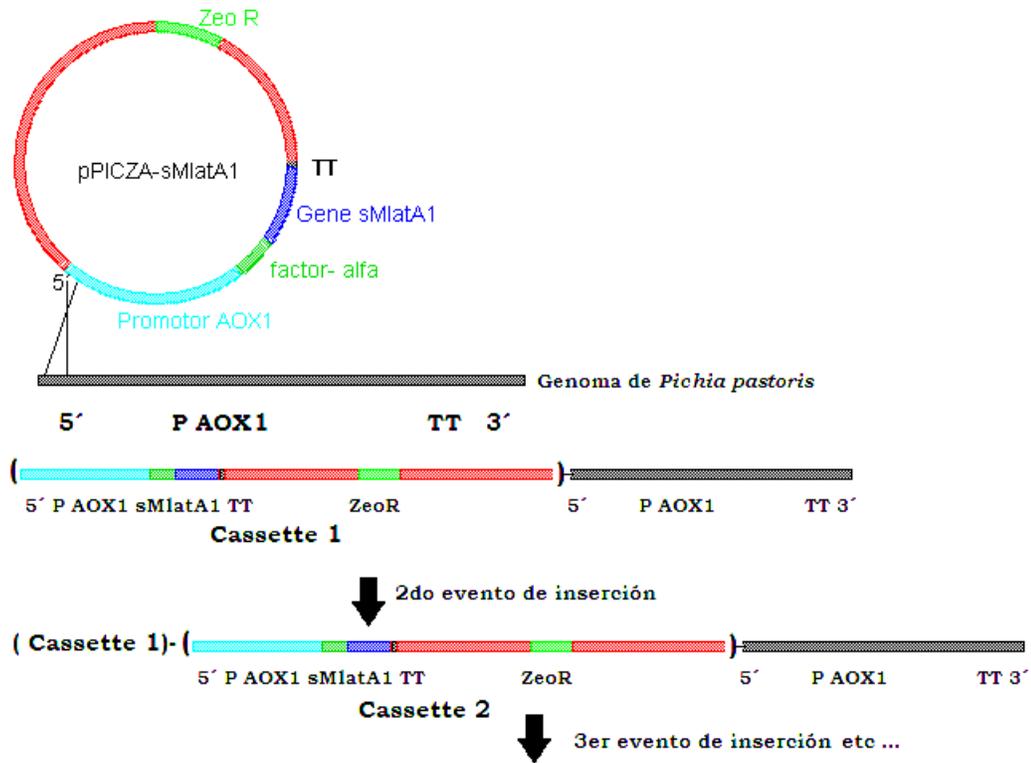


Figura 5. Recombinación homóloga y eventos de inserción en el genoma de *Pichia pastoris*

Se tomaron colonias de *P. pastoris* X33 y SM5 transformantes con el vector pPICZalfaA-sMlatA1 y se extendieron placas con medio YPD con 500 µg/mL y 1000 µg/mL de zeocina y se incubaron a 30 °C durante dos días.

#### VII.4 Confirmación de la recombinación homóloga mediante PCR

Se hizo una PCR de colonia para confirmar que las transformantes de *P. pastoris* X33 y SM5 tuvieran integrado el cassette que contiene el gen sMlatA1. Los primers que se utilizaron fueron el 3'AOX y 5'AOX descritos por Higgins, DR., y Cregg, JM., en 1998 (Tabla 1) los cuales se sintetizaron en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología-UNAM,

Tabla 1. Primers 3' y 5' AOX

Primers	Secuencia (5'- 3')
Forward 5' AOX	GACTGGTTCCAATTGACAAGC
Reverse 3' AOX	GGCAAATGGCATTCTGACATCC

Para poder realizar la PCR se tomó una asada de cada colonia transformante y se disolvió en 10 µL de agua, posteriormente, se adicionaron 25 UI de liticasa y se incubaron 10 minutos a 30 °C y luego a -80 °C durante 10 minutos (Linder, S., Schliwa, M., *et al.*, 1996).

Una vez rotas las células, se colocó 1 µL del lisado celular en un tubo para PCR y se adicionaron los siguientes componentes:

Buffer PCR (10X)	5 µL
dNTPS (2.0 mM)	4 µL
5´AOX primer (10 pmol/µL)	1 µL
3´AOX primer (10 pmol/µL)	1 µL
Agua	37.5 µL
Lisado celular	1 µL
Total	50 µL

La mezcla se incubó a 95 °C durante 5 minutos e inmediatamente se le adicionó 0.5 µL de enzima Taq DNA polimerasa (5 UI/ µL). Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

30 X	{	95 °C	1 minuto
		58 °C	1 minuto
		72 °C	1 minuto
		72 °C	7 minutos

Los productos de PCR de 771 pb fueron purificados utilizando el KIT de ROCHE High Pure PCR Product Purification y se secuenciaron en la unidad de secuenciación del IBT-UNAM.

### VII.5 Expresión de las proteínas HsMlatA1 y LsMlatA1 utilizando metanol como inductor

El siguiente método se utilizó tanto para la cepa *P. pastoris* X33 como para la cepa *P. pastoris* SM5:

Un matraz baffleado de 3 L con 500 mL de medio BMGY fue inoculado con una de las colonias multicopia de *P. pastoris* a una densidad óptica ( $OD_{600}$ ) de 0.1, y se incubó a 30°C hasta llegar a un  $OD_{600}$  de aproximadamente seis (entre 14-16 horas de incubación). Después de la incubación, el cultivo se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue desechado y el botón celular se resuspendió en medio BMMY. Las células resuspendidas se colocaron en un matraz con 500 mL de medio BMMY. El matraz se incubó a 24 °C, a una velocidad de agitación de 250 rpm durante seis días. Después de transcurrido el tiempo, el cultivo se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante se guardó a -20 °C hasta su análisis.

#### **VII.6 Purificación de HsMlatA1 y LsMlatA1 mediante cromatografía de afinidad a Ni-NTA**

Las proteínas HsMlatA1 y LsMlatA1 expresadas en *P. pastoris X33* y *P. pastoris SM5* respectivamente tienen un *tag* de seis histidinas en el extremo carboxilo, el cual sirvió para purificar mediante cromatografía de afinidad a níquel, con una resina Ni-NTA de Quiagen. Se empacó la resina Ni-NTA en una columna y se equilibró con PBS 1X. Los sobrenadantes de los cultivos se pasaron a través de las columnas con un flujo de 0.5 mL/min, los eluidos se pasaron nuevamente por la columna con un flujo de 1mL/min. Después, se lavaron las columnas con PBS 1X hasta que la absorbancia a 280 nm del eluido fuera cero. Posteriormente, se realizó un lavado con PBS1X + 25 mM de Imidazol, esto con el fin de eliminar proteínas provenientes del hospedero con menor afinidad. Por último, las proteínas de interés se eluyeron con PBS1X + 250 mM de Imidazol.

#### **VII.7 Cuantificación de sMlatA1 mediante el método del ácido bicinonínico (BCA)**

Las proteínas purificadas fueron dializadas utilizando una membrana de 1 kDa marca Spectrum con 10 volúmenes de PBS 1X como diluyente. Se realizaron 3 cambios del diluyente cada 45 minutos.

Se cuantificó la proteína purificada y dializada utilizando el método del ácido bicinonínico (BCA), que se fundamenta en la formación de complejos de color púrpura con iones  $Cu^{+1}$  resultado de la reacción de la proteína con el  $Cu^{+2}$  en un medio alcalino.

Los residuos que contribuyen la reducción del  $\text{Cu}^{2+}$  son cisteínas, triptofano, tirosina y el enlace peptídico. Para este método se utilizó el kit de Pierce™ BCA Protein Assay y se siguió el protocolo descrito por el fabricante.

### **VII.8 Detección de HsMlatA1 y LsMlatA1 recombinante mediante SDS-PAGE y Western-blot**

Para observar la expresión de las proteínas recombinantes se realizó una separación electroforética mediante el método descrito por Laemmli UK., (1970), utilizando una matriz de acrilamida/bis-acrilamida al 15% para el gel separador y 4% para el gel concentrador. Las muestras obtenidas de la purificación se prepararon con buffer de muestra 5X en condiciones reductoras y se calentaron en baño maría en ebullición durante cinco minutos. Después, 12  $\mu\text{g}$  de las proteínas HsMlatA1 y LsMlatA1 se cargaron en los pozos del gel y se corrieron a 90 V constantes para el gel concentrador y 110 V para el espaciador, el gel se tiñó con azul brillante de coomassie G-250 durante 20 minutos y fue desteñido con solución desteñidora durante 30 minutos realizando tres cambios de solución.

Por otro lado, se realizó una inmunodetección de las proteínas HsMlatA1 y LsMlatA1 mediante western blot. El primer paso fue una separación electroforética de las proteínas en un gel SDS-PAGE al 15% y después se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 400 mA durante una hora en una cámara semi húmeda (OWL). La membrana se bloqueó con una solución de leche al 5% en TBST durante dos horas; posteriormente, se lavó tres veces con TBST 1X durante tres minutos en agitación. Después, se incubó con un anticuerpo policlonal de conejo anti-MlatA1 (previamente obtenido el laboratorio) durante una hora y se lavó tres veces con TBST 1X durante cinco minutos. Como anticuerpo secundario se utilizó un monoclonal anti-conejo acoplado a fosfatasa alcalina, se incubó durante una hora y después se lavó con TBST 1X tres veces durante cinco minutos. Para revelar se utilizó BCIP-NBT (Invitrogen).

### **VII.9 Caracterización de proteína glicosilada**

Mediante análisis bioinformático se predijo un posible sitio de N-glicosilación para sMlatA1. Para probar que la proteína estuviera glicosilada se realizaron dos pruebas (para

estos ensayos únicamente se utilizó la proteína HsMlatA1). En la primera se utilizó una resina de Sepharosa 4B acoplada a Conavalina-A (ConA), una lectina que se une a glicoproteínas, específicamente las que tienen N-glicosilación. Se empacó la resina a una columna y después se equilibró con solución amortiguadora de Tris 20mM, NaCl 0.5M a pH 7.4. Posteriormente, la proteína HsMlatA1 se pasó a través de la columna a un flujo de 0.5 mL/min, después, el eluido se pasó nuevamente a través de la columna a un flujo de 1mL/min. Se lavó la columna con solución amortiguadora de equilibrio hasta que la absorbancia a 280 nm del eluido fuera cero. Posteriormente, se eluyó la proteína pegada a la resina con buffer de equilibrio con  $\alpha$ -MSP [ $\alpha$ -manosilpiranosa (0.6M)], colectando fracciones de 0.5 mL hasta que la absorbancia a 280 nm fuera cero. Las fracciones fueron corridas en un gel SDS-PAGE, para observar las proteínas glicosiladas que se unieron a ConA.

En la segunda prueba se utilizó una endoglicosidasa F1 que corta glicosilaciones del tipo N-. Para este propósito, se colocaron 25  $\mu$ g de proteína HsMlatA1 en un tubo de 0.5 mL con 2.5  $\mu$ L de buffer de desnaturalización (SDS 2%, beta-mercaptoetanol 1M) y se calentó cinco minutos a 100 °C. Posteriormente, se adicionaron 5  $\mu$ L de buffer de reacción (solución amortiguadora de fosfato de sodio, pH 5.5), 2  $\mu$ L de la enzima Endo F1 (Merck-millipore), se llevó a un volumen de 50  $\mu$ L con agua destilada y se incubó a 37 °C durante 18 horas. Después la muestra se corrió en un gel SDS-PAGE al 15% para evaluar el corte enzimático.

#### **VII.10 Neurotoxicidad de las proteínas HsMlatA1 y LsMlatA1 en ratones**

Para conocer la cantidad de proteína necesaria para matar el 50% de una población animal ( $DL_{50}$ ) se utilizaron cinco grupos de tres ratones CD1 (18-20 g). En cada grupo se utilizaron diferentes cantidades de proteína en un volumen final de 500  $\mu$ L de solución salina (0.9 %). La administración fue realizada por vía intravenosa en la cola del ratón. La lectura del porcentaje de mortalidad fue tomado 24 h después de la inyección de la proteína. El análisis de los datos fue realizado por regresión no lineal a través de una curva sigmoidea de dosis-respuesta usando el programa GraphPad Prism 4.03 (San Diego, CA) para determinar la  $DL_{50}$ .

### **VII.11 Inmunización de conejos con las proteínas recombinantes de sMlatA1**

Para evaluar si los inmunógenos HsMlatA1 y LsMlatA1 eran capaces de producir anticuerpos neutralizantes se inmunizaron dos conejos Nueva Zelanda blancos con las proteínas de cada tipo.

Se utilizaron 50, 100, 200, 400, 500, 800 1000 y 1500 µg de los dos tipos de proteínas recombinantes, durante un periodo de 4 meses, inmunizando cada 15 días. En la primer inmunización la proteína se mezcló con adyuvante completo de Freud en proporciones iguales de proteína-adyuvante; las inmunizaciones siguientes se alternaron en combinación con adyuvante incompleto de Freud y alumina (hidróxido de aluminio) en proporciones iguales de proteína-adyuvante.

Se sangraron los conejos de la oreja en la semana 8 y 14 post-inmunización, para evaluar los títulos. Al final del periodo de inmunización los conejos se sangraron a blanco mediante punción cardiaca. La sangre se dejó reposar a temperatura ambiente para permitir la formación del coaguló; se decantó el suero y se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos para remover las células sanguíneas remanentes, y se guardó a -20 °C hasta su uso.

### **VII.12 Obtención de MlatA1 del veneno de *M. laticollaris* mediante RP-HPLC**

Para medir los títulos de anticuerpos y evaluar la capacidad neutralizante de los sueros de los conejos fue necesario obtener MlatA1 nativa. Se utilizó el veneno de *M. laticollaris* para obtener la proteína MlatA1 mediante RP-HPLC, se utilizó una columna C18 semipreparativa (GraceVydac 250 x 10 mm, tamaño de partícula 5 µm) estabilizada con H<sub>2</sub>O + 0.1% ácido trifluoroacético (TFA). La elución se realizó utilizando un gradiente lineal de 0 a 60% de acetonitrilo + 0.1% TFA en 60 minutos. Se cargaron 4 mg de veneno resuspendido en agua + 0.1% de TFA.

MlatA1 es el componente mayoritario alfa neurotóxico, (Carbajal-Saucedo, A., *et al.*, 2013) y se sabe que utilizando un gradiente de acetonitrilo 0-60% en 60 min, las primeras proteínas en eluir son las alfa neurotoxinas (Bénard-Valle, M, 2011), por lo tanto, se recuperó la fracción más grande de los primeros picos. Las muestras se secaron

utilizando un concentrador de vacío Savant®, se resuspendieron con PBS 1X y se colocaron en un único tubo, por último se midió la concentración de proteína utilizando el método del BCA antes descrito.

### **VII.13 Título de anticuerpos determinado mediante ELISA**

Para medir los títulos de anticuerpos se usó un ensayo tipo ELISA indirecto, utilizando diluciones seriadas de los sueros. El título de anticuerpo es definido como la dilución donde se obtiene el 50% de la señal máxima de absorbancia. Se midieron los títulos tanto para la MlatA1 como para la HsMlatA1 y LsMlatA1.

El ensayo de ELISA se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. En los pozos de la placa de ELISA se colocaron 100  $\mu$ L del antígeno correspondiente a una concentración de 5  $\mu$ g/mL, en buffer de carbonato-bicarbonato (pH 9.5, 100mM), es decir, 500 ng de MlatA1/pozo. La última columna de la placa fue utilizada como blanco y únicamente se colocó buffer. Se incubó a 37°C durante 2h para permitir el pegado de los antígenos a las placas.
2. La placa se lavó con 200  $\mu$ L/pozo de solución de lavado (50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM de NaCl y 0.05% Tween 20) por triplicado.
3. Los pozos se bloquearon con 200  $\mu$ L de solución de bloqueo (0.5% de gelatina, 0.2% Tween 20 y 50 mM Tris/HCl pH 8) incubandos a 37°C durante 2h.
4. La placa se lavó con 200  $\mu$ L/pozo de solución de lavado (50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM de NaCl y 0.05% Tween 20) por triplicado.
5. En los pozos de la primera columna de la placa se colocaron por duplicado 150  $\mu$ L de las muestras de antisuero en una dilución 1:30 (cuando el título fue muy alto se comenzó en 1:90, 1:270, 1:810 o 1:2430, según fuera el caso) en solución de reacción (50 mM Tris/HCl pH 8, 500 Mm NaCl, 1 mg de

gelatina/mL y 0.05% Tween 20); posteriormente, se hicieron diluciones seriadas en una relación 1:3, directamente sobre la placa, tomando 50  $\mu$ L de la primer columna y depositándolos en el pozo de la segunda columna (el cual ya contenía 100  $\mu$ L de solución de reacción), mezclando tres veces, y así sucesivamente hasta la columna 10. Finalmente se descartaron los últimos 50  $\mu$ L de la dilución de antisuero y por último la placa se incubó a 37° C durante 1h.

6. La placa se lavó con 200  $\mu$ L/pozo de solución de lavado por triplicado.
7. En cada pozo se colocaron 100  $\mu$ L de un anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a HRP (peroxidasa de rábano). La dilución del anticuerpo conjugado fue 1:3000 en solución de reacción, finalmente se incubó la placa a 37° C durante 1 h.
8. Se lavó la placa con 200  $\mu$ L/pozo de solución de lavado por triplicado.
9. Se colocó a cada pozo 100 $\mu$ L de una solución de revelado ABTS (75  $\mu$ L de ABTS (1mg/mL), 1 mL de Buffer ABTS y 9 mL de agua). El ABTS actúa como sustrato de la HRP y da como resultado una reacción colorida. Se dejó reaccionar durante 10 minutos. Para detener la reacción se adicionaron 25  $\mu$ L de SDS 20% por pozo.
10. Finalmente, las absorbancias de cada pozo fueron medidas en un lector de ELISA (Tecan Sunrise) a una longitud de onda de 405 nm y los resultados se analizaron en el programa GraphPad Prism 4.

#### **VII.14 Potencia neutralizante de los sueros en ratones**

Para conocer la potencia neutralizante de los sueros *in vivo* se realizaron pruebas de dosis efectiva media ( $DE_{50}$ ); la cual define como el volumen de suero necesario para salvar a la mitad de una población animal a los que se les administra una cantidad elevada de veneno. Cantidades equivalentes a  $3DL_{50}$  de MlatA1 fueron incubadas con diferentes volúmenes de los sueros obtenidos de los conejos inmunizados con HsMlatA1

como LsMlatA1. La incubación se hizo a 37°C durante 30 minutos y, posteriormente, se inyectaron en ratones CD1 vía intravenosa.

La lectura de mortandad se realizó a las 24 horas posteriores a la inoculación de los ratones. Los resultados fueron analizados graficando el porcentaje de sobrevivencia en función del logaritmo del volumen de suero utilizando el método de regresión lineal tipo dosis-respuesta por el software GraphPad Prism Version 4.0b.

## VIII. RESULTADOS

### VIII.1 Obtención de transformantes *Pichia pastoris* X33 y SM5 con pPICZalfaA-*sMlatA1*

Con la finalidad de obtener un rendimiento alto utilizando *P. pastoris* como sistema de expresión, se diseñó un gen *MlatA1* con codones preferenciales para *P. pastoris* (*sMlatA1*). Utilizando la secuencia de *MlatA1* reportada en Genbank JQ247015.1 y la tabla de codones preferenciales que se encuentra en la página <http://www.kazusa.or.jp/codon> se modificaron los codones de tal manera que todos fueran los preferenciales para este organismo. Al gen sintético se le añadió un sitio de restricción *EcoRI* en el extremo 5' y un sitio de restricción *KpnI* en el extremo 3', los cuales coinciden con los sitios de restricción presentes en el vector pPICZalfaA (Anexo 1), lo que facilitó la clonación dirigida en el vector. La construcción sintética, nombrada *sMlatA1*, contiene además un *tag* de seis histidinas en el extremo carboxilo (Fig. 6). En principio, el *tag* de histidinas no debe de afectar la actividad tóxica ya que, como se mencionó anteriormente, los residuos de unión al receptor de otras neurotoxinas de la familia de los tres dedos de cadena corta están en la parte central de la proteína (Pillet, L., 1992, Nirthanan, S., and Gwee, M., 2004). El gen fue sintetizado por a la compañía Genscript® y ésta, lo entregó clonado en el vector pUC57.



Figura 6. Organización de *sMlatA1*

Para clonar el gen *sMlatA1* en el vector de expresión se obtuvieron los plásmidos pUC57-*sMlatA1* y pPICZalfa-A a partir de cultivos de colonias transformantes con estos

vectores. En la figura 7 se observa que los vectores tienen el tamaño correcto, una buena integridad y pureza para ser linealizados.

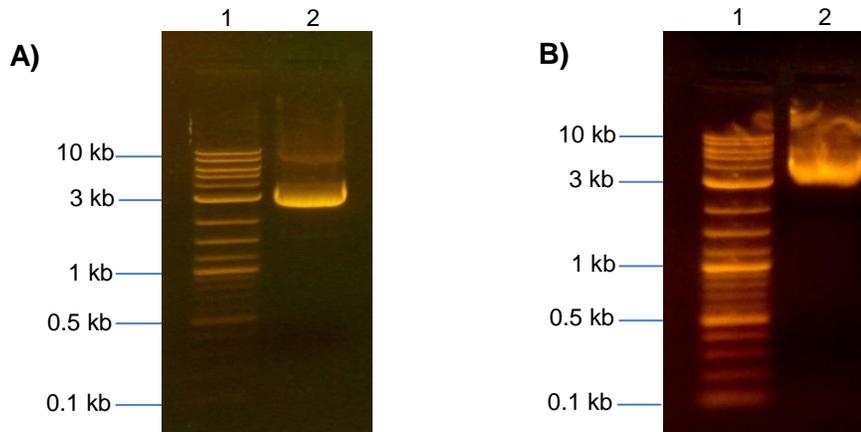


Figura 7. Obtención de plásmidos A) Vector pUC57-*sMlatA1*. Carril 1: Marcador de masa molecular; Carril 2: Vector pUC57-*sMlatA1*; B) Vector pPICZalfa-A. Carril 1: Marcador de masa molecular; Carril 2: Vector pPICZalfa-A.

Para liberar el gen *sMlatA1* de pUC57 y abrir el vector pPICZalfa-A se realizó una digestión doble con las enzimas de restricción *EcoRI* y *KpnI*, como controles se realizaron digestiones sencillas con las mismas enzimas (Anexo 4.1). En la figura 8A se puede observar la liberación del inserto del vector pUC57, el cual tiene un peso de 222 pb. En el caso del vector pPICZalfa-A, se observa una banda de aproximadamente 3.6 kb (Fig 8B), que concuerda con la el tamaño del vector.

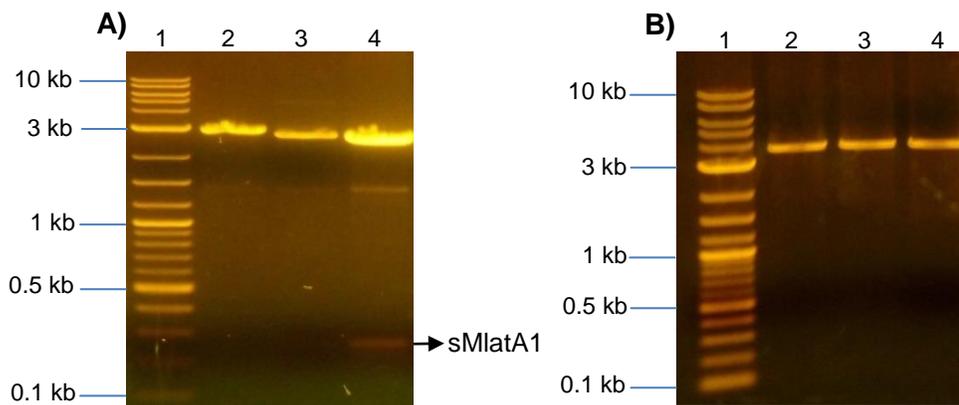


Figura 8. Digestiones con endonucleasas *EcoRI* y *KpnI*. A) Vector pUC57-*sMlatA1*. Carril 1: Marcador de masa molecular; Carril 2: Vector pUC57-*sMlatA1* digestión con *EcoRI*; Carril 3: Vector pUC57-*sMlatA1* digestión con *KpnI*; Carril 4: Vector pUC57-*sMlatA1* digestión con *EcoRI* y *KpnI*. B.) Vector pPICZalfa-A. Carril 1: Marcador de masa molecular Carril 2: Vector pPICZalfa-A digestión con *EcoRI*; Carril 3: Vector pPICZalfa-A digestión con *KpnI*; Carril 4: Vector pPICZalfaA-*sMlatA1* digestión con *EcoRI* y *KpnI*.

Para de clonar el gen *sMlatA1* en el vector de expresión, se cortaron y purificaron el gen *sMlatA1* liberado del vector pUC57 y el vector pPICZalfa-A digerido con las dos enzimas. En la figura 9A se observa que la pureza de los purificados es buena para poder ligarlos. En la figura 9B se observan los plásmidos de las colonias de *E. coli* XL1blue que fueron transformadas con la ligación de *sMlatA1* y pPICZalfaA. Únicamente se obtuvieron tres colonias transformantes. En el gel se puede observar que los plásmidos tienen el tamaño correcto, buena integridad y pureza.

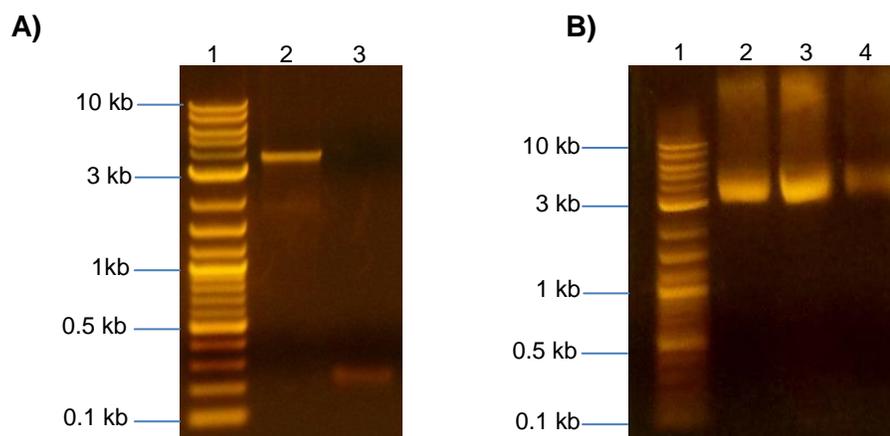


Figura 9. A) Purificación del gen *sMlatA1* y del vector pPICZalfaA. Carril 1: Marcador de masa molecular, Carril 2: pPICZalfa-A *EcoRI/KpnI*; Carril 3.) *sMlatA1 EcoRI* y *KpnI*. B) Plásmidos de los candidatos con el vector pPICZalfaA-*sMlatA1*. Carril 1: Marcador de masa molecular, Carriles 2-4: Vector pPICZalfaA-*sMlatA1*-C1, C2 y C3.

Para verificar la presencia del inserto en el plásmido, se cortaron estos con las enzimas de restricción *EcoRI* y *KpnI* (Anexo 4.2). Se realizaron digestiones con una sola enzima como control y digestiones dobles para liberar el inserto. En la figura 10 se puede observar que únicamente en el carril 7 se observa la liberación de una banda de aproximadamente 222 pb. En otras palabras, únicamente la colonia 2 contenía nuestro gen de interés.

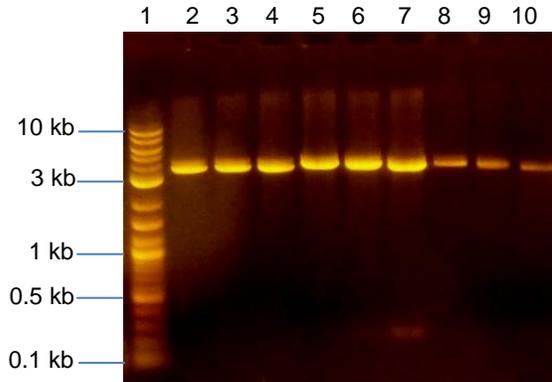


Figura 10. Selección de candidatos mediante digestiones enzimáticas con *EcoRI* y *KpnI*. Carril 1: Marcador de masa molecular, Carriles 2-4: pPICZalfaA-sMlatA1-C1 *EcoRI*, *KpnI*, y *EcoRI* con *KpnI*; Carriles 5-7: pPICZalfaA-sMlatA1-C2 *EcoRI*, *KpnI* y *EcoRI* con *KpnI*; Carriles 8-10: pPICZalfaA-sMlatA1-C3 *EcoRI* *KpnI* y *EcoRI*-*KpnI*.

Para verificar que el inserto del plásmido de la colonia 2 fuera el gen *sMlatA1* se mandó a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología, UNAM, utilizando el primer 5'AOX mencionado en la Tabla1, el cuál hibrida en el extremo 5' del promotor AOX. El resultado fue positivo, y no hubo cambio en el marco de lectura (Fig. 11).

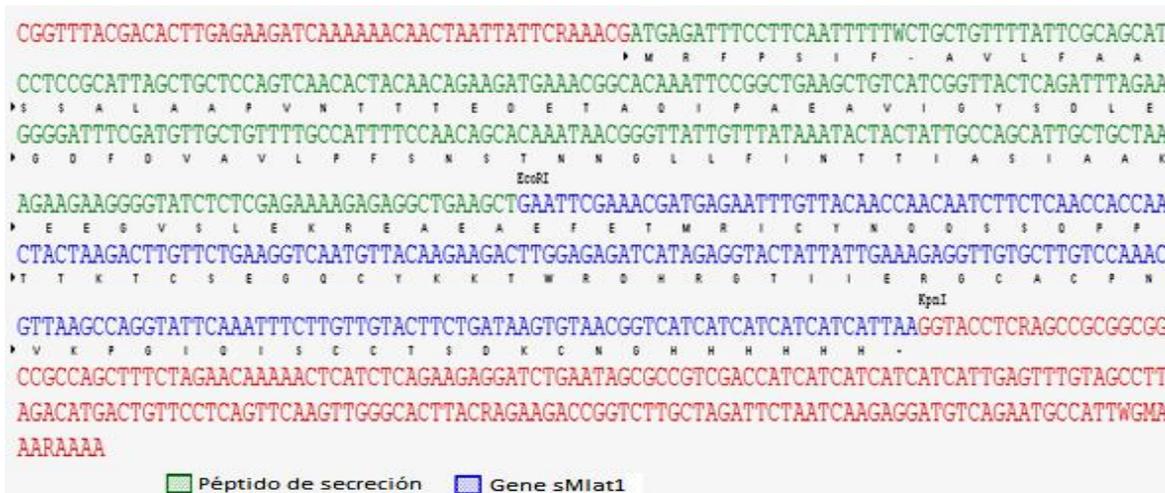


Figura 11. Secuencia de pPICZalfaA-*sMlatA1*

Para corroborar que el gen de interés se encontrará en el vector, se obtuvo mayor cantidad de plásmido para transformar las levaduras. En la figura 12A se puede observar el plásmido pPICZalfaA-*sMlatA1* el cual tiene el tamaño correcto, buena integridad y pureza. Posteriormente, el vector pPICZalfaA-*sMlatA1* se digirió con la enzima de restricción *SacI* (Anexo 4.3). En la figura 12B se puede observar que el vector está linealizado y tiene una masa molecular aproximada de 3.8 kb que corresponde al peso esperado.

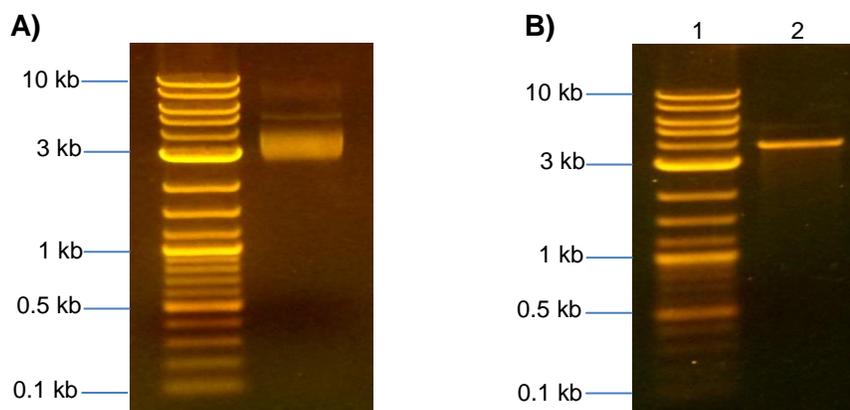


Figura 12. A) Vector pPICZalfaA-*sMlatA1*. Carril 1: Marcador de masa molecular, Carril 2: Vector pPICZalfaA-*sMlatA1*. B) Vector pPICZalfaA-*sMlatA1* linealizado con *SacI* Carril 1: Marcador de masa molecular, Carril 2: Vector pPICZalfaA-*sMlatA1* linealizado con *SacI*.

Una de las limitaciones de expresar proteínas heterólogas en *Pichia pastoris* es que proteínas que no son glicosiladas de manera natural *P. pastoris* las puede llegar expresar de manera glicosilada, sobre todo si las proteínas tiene motivos de glicosilación. Existen una gran variedad de herramientas bioinformáticas para lograr predecir sitios de glicosilación. Mediante análisis computacional en [www.expasy.com](http://www.expasy.com) se predijo un posible sitio de N-glicosilación en la Asparagina 5 y ninguna probabilidad de O-glicosilación para nuestra proteína de interés. Por lo que decidimos utilizar también la cepa *P. pastoris* SM5 (SuperMan<sub>5</sub>) que introduce únicamente 5 residuos de manosas en N-glicosilaciones (*Biogramatics*®), con la finalidad de que si la proteína se expresaba en *Pichia pastoris* X33 de manera glicosilada y si estas glicosilaciones afectaban la actividad tóxica, la actividad de la proteína expresada en SM5 fuera mayor al disminuir los residuos de oligosacáridos.

La manera en que se introduce el plásmido al genoma de *P. pastoris* es por recombinación homóloga. Se utilizó el vector de manera linealizada para introducirlo a las levaduras electrocompetentes de *Pichia pastoris* X33 y SM5, utilizando el protocolo propuesto por Higgins, DR., y Cregg, JM., 1998 y Weidner, M, *et al.*, 2010. Para el caso de *P. pastoris* X33 se obtuvieron once colonias transformantes. Las once colonias fueron resistentes a 500 µg/mL y solo seis de ellas fueron resistentes a 1000 µg/mL (clonas 1, 3, 6, 7, 9 y 10). Para el caso de SM5, se obtuvieron 16 colonias transformantes de las cuales 10 (1, 4, 5, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16) fueron resistentes a 500 µg/mL de zeocina y de éstas, 7 colonias (1, 5, 8, 11, 13, 15, 16) fueron resistentes a 1000 µg/mL. A pesar de que se

obtuvo mayor número de transformantes para *P. pastoris* SM5, el número de colonias multicopia (resistentes a 500 y 1000 µg/mL de zeocina) es muy similar al de *P. pastoris* X33 (Tabla 2). Se ha descrito que las transformantes resistentes a 1000 µg/mL de zeocina pueden llegar a tener de 15-25 copias del plásmido insertado (Sarramegna, V. *et al.*, 2002, Vassileva, A. *et al.*, 2001).

Tabla. 2 Número de colonias transformantes de *P. pastoris* X33 y SM5 resistentes a diferentes concentraciones de Zeocina

Resistentes a zeocina (µg/mL)	Número de transformantes de <i>Pichia pastoris</i> X33	Número de transformantes de <i>Pichia pastoris</i> SM5
100	11	16
500	11	10
1000	6	7

En la recombinación homóloga de *Pichia pastoris* se pueden esperar dos tipos de transformantes: Mut<sup>+</sup> (gen AOX1 nativo intacto) o Mut<sup>s</sup> (gen AOX1 deletado, debido a la inserción de la construcción en este sitio). La diferencia entre estas transformantes, es que Mut<sup>s</sup> crece más lento en presencia de metanol como única fuente de carbono ya que estas cepas carecen del gen que codifica para la enzima alcohol oxidasa, cosa que no ocurre en las cepas Mut<sup>+</sup>.

Para identificar las colonias transformantes que tuvieron el gen de interés se realizó una PCR a cada una de ellas, utilizando los primers 5' y 3' AOX. Si las transformantes son Mut<sup>+</sup> se espera un producto de PCR de 771 pb y otro de 2.2 kb (correspondiente al gen AOX1 de la levadura). Si las transformantes son Mut<sup>s</sup>, únicamente se espera un producto de 771 pb. Como control negativo se utilizó la cepa *P. pastoris* sin transformar y como control positivo el plásmido pPICZalfaA-*sMlatA1*.

En las Figuras 13A y B se puede observar que los productos de PCR de las clonas 2, 4, 5, 6, 7, 10 y 11 de *Pichia pastoris* X33 corresponden al gen *sMlatA1* y al gen AOX1 nativo. En las Figuras 13.C y D se puede observar que únicamente las clonas 13 y 16 de *Pichia pastoris* SM5 presentaron las dos bandas, correspondientes al gen AOX1 nativo y al gen *sMlatA1*. Las transformantes que se obtuvieron de X33 y SM5 son del tipo Mut<sup>+</sup>. Por otro lado, se puede observar que algunas clonas tanto de X33 como de SM5 tienen

una tercera banda de aproximadamente 500pb, que se debe, posiblemente, a una inespecificidad de los primers por la temperatura de alineamiento.

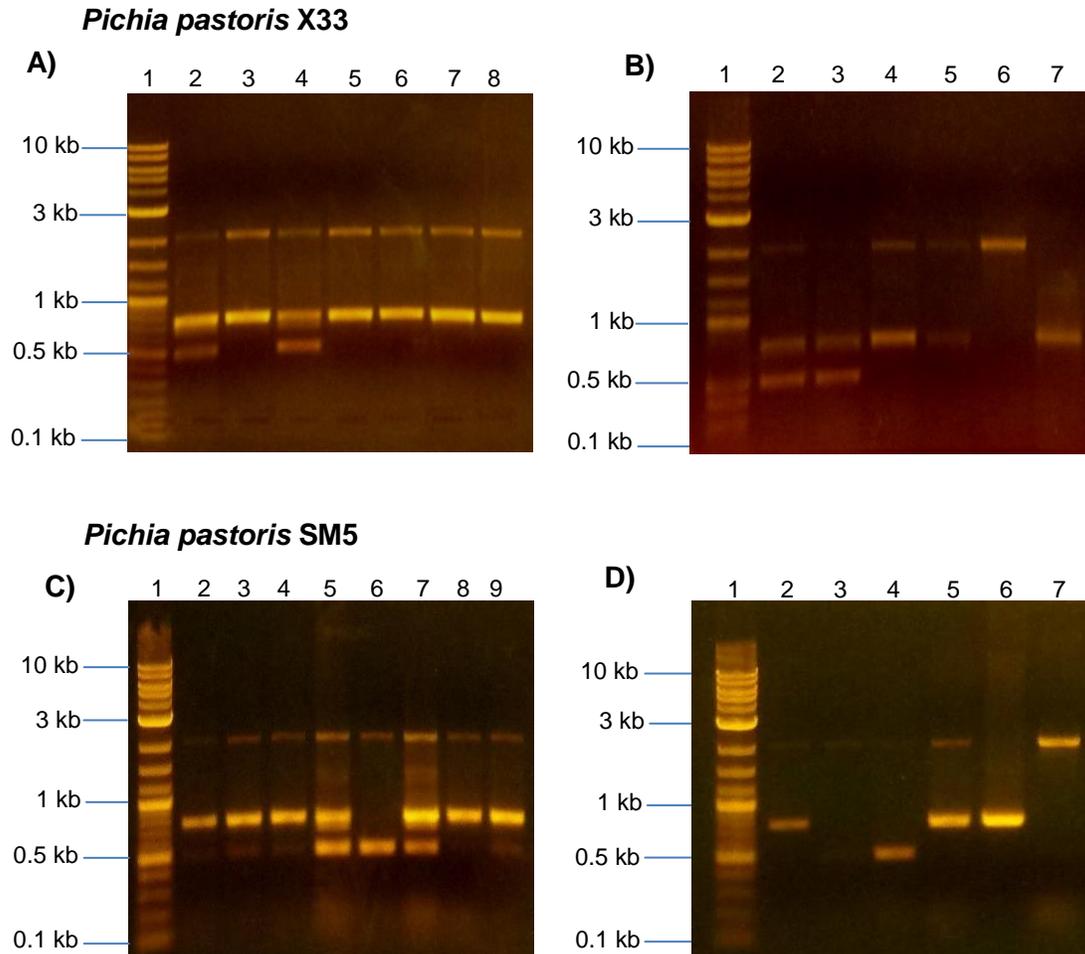


Figura 13. Productos de PCR de los candidatos de *P. pastoris* X33 y SM5 con *sMlatA1*. Carriles 1: Marcador de masa molecular, A) Carriles 2-8: *P. pastoris* X33- *sMlatA1*-C1, C2, C3, C4, C5, C6 y C7. B) Carril 1: Marcador de masa molecular, Carriles 2-5: *P. pastoris* X33- *sMlatA1*-C8, C9, C10, C11; Carril 6: *P. pastoris* X33 Wild Type; Carril 7: pPICZalfaA-*sMlatA1*. C) Carril 1: Marcador de masa molecular, Carriles 2-9: *P. pastoris* SM5- *sMlatA1*-C1, C4, C5, C7, C8, C9, C10, C11. D) Carril 1: Marcador de masa molecular, Carriles 2-5: *P. pastoris* SM5-*sMlatA1*-C13-C16; Carril 6: Control positivo pPICZalfaA-*sMlatA1*; Carril 7: Control negativo *P. pastoris* SM5 sin transformar.

Para confirmar que el gen *sMlatA1* estuviera insertado en el genoma de la levadura y con en el correcto marco de lectura, se purificaron los productos de PCR de 771pb de la clona 6 de *P. pastoris* X33 y de la clona 13 de *P. pastoris* SM5 para secuenciarlos. Las razones por la que se utilizaron estas colonias fue por ser multicopias

(resistente a 1000 µg/mL de zeocina) y dar positivo en los productos PCR esperados (*sMlatA1* y *AOX1*). En la figura 14.A se observa que la pureza e integridad de las bandas es buena, tanto para la clona6 de *P. pastoris* X33 (Fig. 14A) como para la clona13 de *P. pastoris* SM5 (Fig. 14B). Las secuencias confirmaron que en ambos casos se trataba de *sMlatA1* y no tenían cambio en el marco de lectura (Anexo 5 y 6).

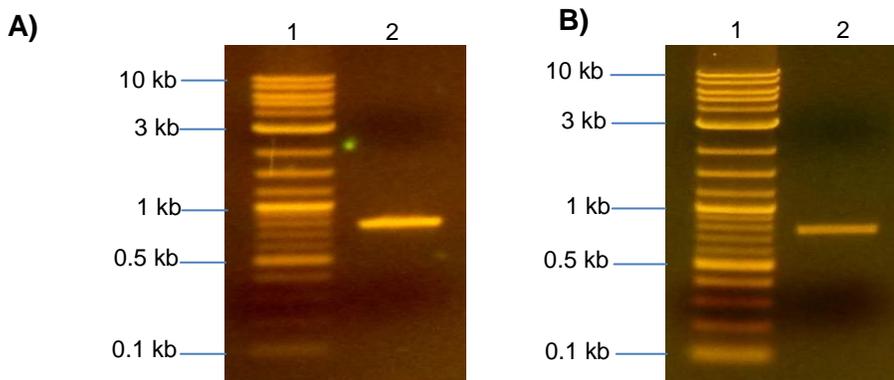


Figura 14. Banda purificada del producto de PCR obtenida de la clona 6-X33 y clona 13-SM5 para secuenciación. A) Carril 1: Marcador de masa molecular, Carril 2: Producto de PCR de la clona 6-X33. C) Carril 1: Marcador de masa molecular, Carril 2: Producto de PCR de la clona 13-SM5.

### VIII.2 Expresión de *sMlatA1* en *Pichia pastoris* X33 y SM5

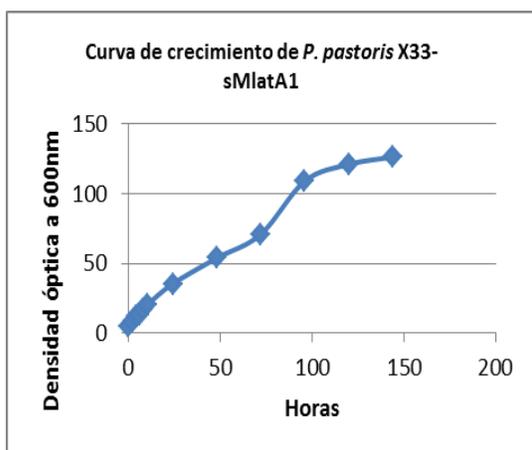
Para expresar la proteína *sMlatA1* se utilizaron la clona 6 de *P. pastoris* X33 y la clona 13 *P. pastoris* SM5, que fueron las colonias en las que se demostró la presencia del gen *sMlatA1* por secuencia. Para la fase de crecimiento se utilizó un medio complejo (BMGY) con la finalidad de generar biomasa. Para la fase inducción se utilizó el medio BMMY. Estos medios controlan el pH y disminuyen la actividad proteasa. La temperatura para la fase crecimiento fue de 30 °C y para la fase de inducción fue de 24 °C. Se sabe que la temperatura óptima de crecimiento de *P. pastoris* es de 30 °C, sin embargo, se ha reportado que a bajas temperatura (<25°C) los rendimientos pueden ser mayores (Chen, YS., *et al.*, 2000; Li, P., *et al.*, 2007; Cregg, JM., 2008; Ling, LY., *et al.*, 2010). Utilizamos matraces tipo Fernbach bafleados para mejorar la transferencia de oxígeno, ya que el parámetro más importante para una eficiente expresión en *Pichia pastoris* es una adecuada aireación durante la inducción con metanol (Cregg, JM., 2008).

Se realizaron cultivos por lote alimentado, suministrando metanol cada 24 horas, como lo proponen Cregg, JM., *et al.*, 2009, a una concentración final de 1.5 % durante 144

h. La densidad óptica a 600 nm fue determinada a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas.

En la figura 15 se observa que la biomasa de *P. pastoris* X33 (A) y *P. pastoris* SM5 (B) sigue aumentando hasta las 144 horas, lo cual puede influir de manera positiva en los rendimientos de expresión de las proteínas recombinantes.

#### A) *P. pastoris* X33



#### B) *P. pastoris* SM5

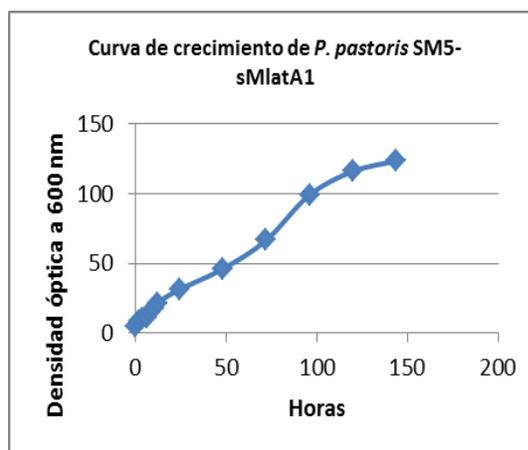


Figura 15. Curva de crecimiento de *P. pastoris* X33-sMlatA1 y *P. pastoris* SM5-sMlatA1

### VIII.3 Purificación y detección de LsMlatA1 y HsMlatA1

En esta sección se muestran las proteínas recombinantes purificadas HsMlatA1 y LsMlatA1 que fueron expresadas en *P. pastoris* X33 y SM5 respectivamente. Para observar la expresión de las proteínas recombinantes se utilizó SDS-PAGE y Western-blot.

En la figura 16A se pueden observar las proteínas HsMlatA1 y LsMlatA1 purificadas en un el gel SDS-PAGE teñido con Coomassie G250 y mediante Western blot se verificó que se trataban de las recombinantes (Fig. 16B). Para el caso de HsMlatA1 se observa que existen mayoritariamente dos poblaciones de proteínas, una de 8-10 kDa y otra de 13-19 kDa. El aumento en la masa molecular de las proteínas expresadas heterológamente con respecto a la proteína purificada directamente del veneno de *M. laticollaris* podría explicarse por glicosilación. En el caso de la proteína LsMlatA1 existe solo una población de proteínas de entre los 9 y 12 kDa. En términos generales, la

proteína LsMlatA1 tiene una masa molecular más baja que la proteína HsMlatA1. Cabe mencionar que en el western blot (fig. 16B) se puede observar la detección de una proteína de aproximadamente 60 kDa, tanto para las proteínas recombinantes (HsMlatA1 y LsMlatA1) como en la proteína nativa (MlatA1), lo cual podría ser una detección inespecífica por parte del anticuerpo policlonal (anti-MlatA1 de conejo) o por un oligomero formado por las alfa-neurotoxinas.

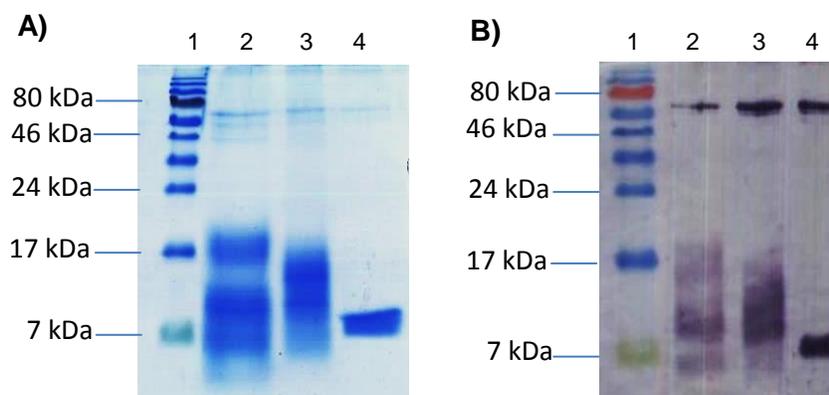


Figura 16. Detección de proteínas purificadas LsMlatA1 y HsMlatA1 de los cultivos de 144 horas. A) SDS-PAGE tinción con azul de coomassie G250. Carril 1: Marcador de masa molecular, Carril 2: HsMlatA1 (12 µg), Carril 3: LsMlatA1 (12 µg), Carril 4: MlatA1 (3 µg). B) Western blot utilizando un suero de conejo anti-MlatA1 (dilución 1:3000). Carril 1: Marcador de masa molecular, Carril 2: HsMlatA1 (1.5 µg), Carril 3: LsMlatA1 (1.5 µg), Carril 4: MlatA1 (0.3 µg).

Para conocer la cantidad de proteína expresada por volumen de medio, HsMlatA1 y LsMlatA1 fueron cuantificadas por BCA, obteniendo un rendimiento de 17.6 mg/L para el caso de HsMlatA1 y un rendimiento de 8.4 mg/L para el caso de LsMlatA1. Las velocidades de crecimiento en la fase de inducción para las dos cepas (X33 y SM5) son muy similares como se puede ver en la figura 17; sin embargo, los rendimientos para la cepa X33 fueron superiores.

#### VIII.4 Unión específica de HsMlatA1 en cromatografía de afinidad a Concanavalina-A

Es importante dar certeza de que el aumento en el peso molecular de las proteínas es debido a la glicosilación, en esta sección se describe el análisis que se realizó únicamente a la proteína HsMlatA1. Existen diferentes maneras de identificar proteínas glicosiladas, una de ellas es mediante el uso de lectinas, proteínas que se unen a azúcares como glucosas o manosas (Palczewska, M., *et al.*, 2003; Mislovicova D., *et al.*,

2002). La lectina ConA se une específicamente a proteínas con N-glicosilación y como ya mencionamos anteriormente existe una probabilidad alta de que la glicosilación de HsMlatA1 sea del tipo N-.

Mediante una cromatografía de afinidad a Concanavalina-A se fraccionó la proteína HsMlatA1. En la Figura 17 se observa que la proteína (marcadas con un círculo) en sus diferentes niveles de glicosilación son retenidas en la resina de Concanavalina-A y que se libera únicamente con  $\alpha$ -MSP 0.6 M. La unión específica a Con-A indica la presencia de N-glicosilaciones, ya que las proteínas que se unen son las que presentan enlaces entre manosas alfa 1-3 o alfa 1-6, presentes únicamente en N-glicosilaciones (en O-glicosilaciones son alfa 1-2 - Hirabayashi, J., *et al.*, 2013).

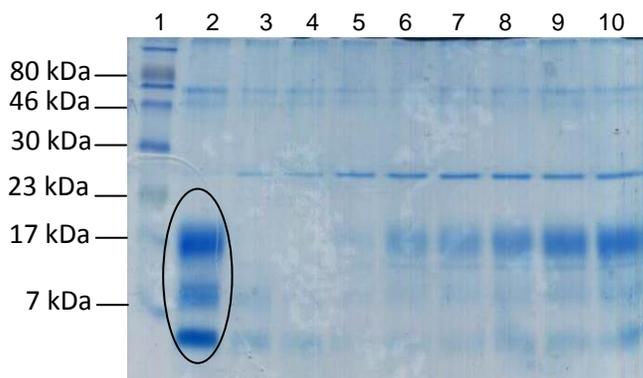


Figura 17. Unión específica de HsMlatA1 a Concanavalina-A. Carril 1: Marcador de masa molecular; Carril 2: Antes de purificar (16  $\mu$ L); Carril 3: Proteína no pegada a Concanavalina-A (16  $\mu$ L); Carril 4: Lavado con buffer de equilibrio (16  $\mu$ L); Carril 5-10: Fracción 1-6 con  $\alpha$ -MSP 0.6M (20  $\mu$ L).

### VIII.5 Corte enzimático con Endoglicosidasa F1

Para verificar la presencia de glicosilaciones del tipo N en la proteína HsMlatA1, se utilizó la endoglicosidasa F1 (Endo F1, Merck). La proteína tratada y sin tratar con la enzima se corrió en un gel SDS-PAGE. En la figura 18 se puede observar que existe un corte en la proteína tratada con EndoF1 a diferencia de la muestra no tratada. Se observa que la banda de 8 kDa es más intensa, sin embargo, aún es visible que existen proteínas con mayor masa molecular, lo que nos hace pensar que posiblemente además de una N-glicosilación exista una O-glicosilación, o bien, que la acción de la EndoF1 no fue completa. Para descartar la presencia o ausencia de O-glicosilación se puede utilizar el método de la beta-eliminación, que es una reacción química alcalina suave que consigue liberar los O-oligosacáridos de la proteína.

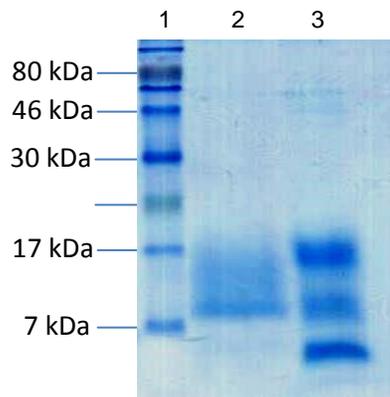


Figura 18. Tratamiento de HsMlatA1 con EndoF1. Carril 1: Marcador de masa molecular; Carril 2: sMlatA1 tratada con Endo F1 (12 µg); Carril 3: sMlatA1 sin tratar (12 µg).

### VIII.6 Neurotoxicidad de las recombinantes en ratones

Con la finalidad de comparar la actividad tóxica de las proteínas recombinantes con la proteína MlatA1 nativa, se determinó la  $DL_{50}$  de HsMlatA1 y LsMlatA1. El resultado que se obtuvo para HsMlatA1 fue una  $DL_{50}$  de 157.3 µg/ratón (7860 µg/ kg de ratón), es decir, 106.2 veces menos potente que la toxina nativa. Utilizando la proteína LsMlatA1 se obtuvo una  $DL_{50}$  de 92.88 µg/ratón (4645 µg/kg de ratón), que comparada con la de HsMlatA1 es 1.7 veces más letal, pero, significativamente menor (62.8 veces) que la MlatA1 purificada directamente del veneno (Tabla 3).

Tabla. 3 Comparación de las Dosis letal media de las proteínas HsMlatA1, LsMlatA1 y MlatA1

Toxina	$DL_{50}$ (µg/ratón)	$DL_{50}$ (µg/kg de ratón)
<b>HsMlatA1</b>	157.2	7860
<b>LsMlatA1</b>	92.88	4645
<b>MlatA1</b>	1.48	74

### VIII.7 Reconocimiento de MlatA1 por los sueros de conejo inmunizados

Para confirmar el reconocimiento y la neutralización de los sueros de los conejos inmunizados con las recombinantes HsMlatA1 y LsMlatA1, se utilizó la proteína nativa MlatA1 purificada mediante HPLC de fase reversa del veneno de *M. laticollaris* (Anexo 7)

Se corrieron 2  $\mu\text{g}$  de MlatA1 purificada en un gel SDS-PAGE (Fig. 19 A). En el gel se observa que la banda que representa MlatA1 es de la masa esperada (6.8 kDa). Por otro lado, 200 ng de MlatA1 se corrieron en un gel SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, para posteriormente realizar un western blot con los cuatro sueros obtenidos de los conejos. En la Figura 19 se observa que todos los sueros, después de 20 semanas de inmunización (conejo 1 y 2 fueron inmunizados con HsMlatA1 y conejos 3 y 4 fueron inmunizados con LsMlatA1) reconocen muy bien a MlatA1. Como control negativo utilizamos el suero preinmune de cada conejo y en ninguno se observó detección en el western blot (resultado no mostrado).

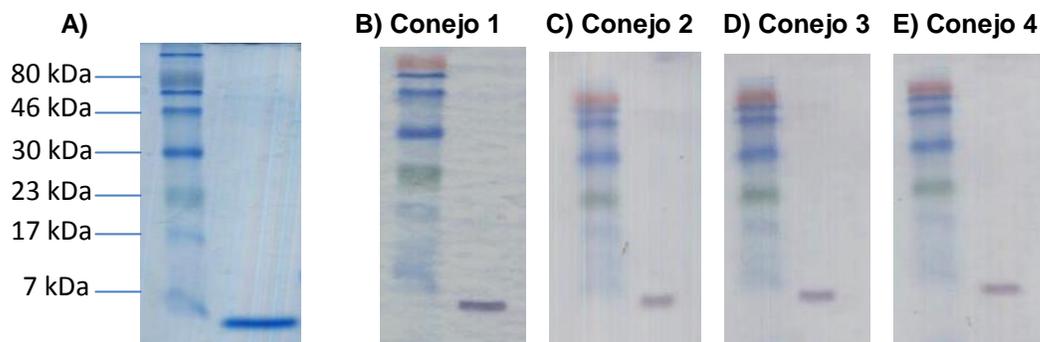


Figura 19. SDS-PAGE de MlatA1 y Western blot utilizando los sueros de conejo. A) MlatA1 (2  $\mu\text{g}$ ) teñida con azul de coomassie G250. B) Western blot (0.2  $\mu\text{g}$ ) con suero de conejo 1, C) Western blot (0.2  $\mu\text{g}$ ) con suero de conejo 2, D) Western blot (0.2  $\mu\text{g}$ ) con suero de conejo 3, E) Western blot (0.2  $\mu\text{g}$ ) con suero de conejo 4.

\*\* Los sueros se utilizaron a una dilución 1:5000

Para determinar la evolución de los títulos de anticuerpos de los sueros de los conejos inmunizados, se realizaron ensayos contra las proteínas HsMlatA1 (para los sueros de los conejos 1 y 2), LsMlatA1 (para los sueros de los conejos 3 y 4) y la proteína nativa MlatA1 (para los 4 sueros). Los títulos de anticuerpos se determinaron con los sueros obtenidos en las semanas 8, 14 y 20 post-inmunización mediante un ensayo de ELISA indirecto. Como se puede observar en la Tabla 4 la respuesta inmune humoral en los conejos 3 y 4 fue superior desde la semana 8, es decir, la cantidad de anticuerpos específicos contra MlatA1 fue superior para los sueros de los conejos inmunizados con LsMlatA1.

Tabla 4. Títulos de anticuerpos de los sueros de conejos contra el inmunógeno utilizado y contra MlatA1

Semana	Conejos inmunizados con HsMlatA1				Conejos inmunizados con LsMlatA1			
	Suero de conejo 1 contra		Suero de conejo 2 contra		Suero de conejo 3 contra		Suero de conejo 4 contra	
	HsMlatA1	MlatA1	HsMlatA1	MlatA1	LsMlatA1	MlatA1	LsMlatA1	MlatA1
<b>8</b>	4292	1100	4870	2907	100907	30815	12725	7802
<b>14</b>	16700	1650	12838	5170	238537	44436	62989	24992
<b>20</b>	39662	7663	31982	14505	281532	85902	258486	68308
<b>Refuerzo</b>	53250	12195	49173	17336	-	-	-	-

Los títulos de anticuerpos contra la proteína MlatA1 nativa en la semana 20 son de 5 a 7 veces mayores en los sueros de los conejos 3 y 4 que fueron inmunizados con LsMlatA1, comparados con los sueros de los conejos 1 y 2 que fueron inmunizados con HsMlatA1. En el caso de los conejos 1 y 2 se necesitó de un refuerzo de inmunización (se les administró 2 mg de HsMlatA1 sin adyuvante a cada conejo en la semana 20 para elevar los títulos correspondientes).

### VIII.8 Potencia neutralizante de los sueros de conejo

Para analizar si los sueros producidos a etapas tempranas de inmunización eran capaces de neutralizar, se realizaron pruebas de neutralización con cantidades altas de los sueros. En la semana 14 post-inmunización se realizó una prueba de neutralización, retando con  $3DL_{50}$  de MlatA1 ( $DL_{50} = 74 \mu\text{g}/\text{kg}$  de ratón) pre-incubadas con 300  $\mu\text{L}$  de los sueros y se administraron a ratones CD1 vía intravenosa. En el ensayo se observó que únicamente los sueros de los conejos 3 y 4 fueron neutralizantes.

Para determinar la eficacia neutralizante de los sueros contra la toxina MlatA1, se incubaron  $3DL_{50}$  de MlatA1 con diferentes cantidades de los sueros y se inyectaron en 5 grupos de 3 ratones. Veinticuatro horas después se hizo la lectura de sobrevivencia para determinar la  $DE_{50}$  (Tabla 5).

Tabla 5. Potencias neutralizantes de los sueros de conejo

	<b>Suero</b>	<b>DE<sub>50</sub> (μL AV/3DL<sub>50</sub>)</b>
<b>Conejos inmunizados con HsMlatA1</b>	1	>450μL
	2	316.4
<b>Conejos inmunizados con LsMlatA1</b>	3	68.5
	4	79.2

Se encontró que el suero del conejo 3 es el que mejor neutralizó seguido por el suero del conejo 4 y el suero del conejo 2. El suero del conejo 1 fue incapaz de neutralizar con dosis de hasta 450 μL. Los sueros de los conejos inmunizados con LsMlatA1 son hasta 4.7 veces mejores neutralizantes que el suero 2 del conejo inmunizado con HsMlatA1.

## IX. DISCUSIÓN

### IX.1 Alfa-neurotoxina sMlatA1 glicosilada

Logramos expresar la proteína sMlatA1 en la plataforma *Pichia pastoris* con rendimientos de hasta 17.6 mg/L para la cepa X33 y de 8.4 mg/L para la cepa SM5, superiores a los reportados en la literatura para proteínas de la familia de los tres dedos usando la misma plataforma (Anangi, R., *et al.*, 2007). Sin embargo, se determinó que la producción de las proteínas ocurre de forma glicosilada, cabe mencionar que MlatA1 de manera natural no es glicosilada. La glicosilación fue corroborada por su unión específica a a ConA y por tratamiento con la endoglicosidasa EndoF1.

La primera interrogante que surge es: ¿Por qué *P. pastoris* glicosila a una proteína que de manera nativa no es glicosilada? Existen varios reportes donde *P. pastoris* glicosila proteínas que de manera natural no son glicosiladas. Por mencionar algunos ejemplos, la beta fructosidasa de *Thermotoga marítima*, (Menéndez, C., *et al.*, 2013), la RNAsa A pancreática de bovino con una O-glicosilación (Chatani, E., *et al.*, 2000) y el caso de la  $\alpha$ -bungarotoxina con una O-glicosilación (proteína perteneciente a la familia de las toxinas de tres dedos) (Levandoski, MM., *et al.*, 2000).

En el caso de la glicosilación del tipo N- se necesita de un motivo de secuencia de aminoácidos, pero también se ve involucrada la estructura secundaria (Mazola, Y., *et al.*, 2011). Se sabe que las asparaginas que se encuentran en loops tienen una alta probabilidad de N-glicosilación (Petrescu, AJ., *et al.*, 2003) y como ya mencionamos la estructura de las alfa-neurotoxinas contienen tres loops. En el caso de sMlatA1 en la Asn5 existe un motivo de secuencia de aminoácidos muy similar al necesario para una N-glicosilación, y mediante análisis bioinformáticos determinamos que esta asparagina tiene una probabilidad alta de que sea N-glicosilada. Para el caso de O-glicosilaciones no existe un motivo aún descrito para levaduras o eucariotes (Daly, R. *et al.*, 2005), sin embargo, se ha visto que las probabilidades de una glicosilación en serina o treonina es más alta cuando existe una prolina cercana (Thanka-Christlet, TH. *et al.*, 2001), que podría ser el caso de Ser8, Ser9, Thr13 o Thr14, presentes en sMlatA1.

## IX.2 Neurotoxicidad de las recombinantes en ratones CD1

Para determinar la actividad tóxica de la proteína HsMlatA1 glicosilada expresada en *P. pastoris* X33 se realizaron ensayos de dosis letal media en ratones, dando como resultado una  $DL_{50}$  de 157.2  $\mu\text{g}/\text{ratón}$ , es decir, 106.2 veces menor a la  $DL_{50}$  de MlatA1 reportada por Carbajal-Saucedo, A., *et al.*, 2013. Creemos que los oligosacáridos de la proteína influyen en la actividad tóxica, como ocurre con una toxina perteneciente a la familia de los tres dedos que de manera natural es glicosilada. Esta glicoproteína se encuentra en el veneno de la cobra tailandesa *Naja kaouthia*, y está glicosilada en la Asn29 situada en el loop II; su actividad es dos veces menor a la de su contraparte no glicosilada. Se sabe que aminoácidos de los loops I, II y III están involucrados en la unión a su receptor. Por lo que, la adición de oligosacáridos en el loop II puede entorpecer tal interacción y como resultado, ocasionar un decremento en la toxicidad (Osipov, AV., *et al.*, 2004).

Para probar que los oligosacáridos estuvieran influyendo en la unión de la toxina recombinante a su blanco, se expresó la proteína en la cepa SM5 que únicamente deja 5 residuos de manosas en glicosilaciones del tipo N-. En la Figura 18 se ve la disminución de peso molecular de la toxina recombinante expresada en SM5 (LsMlatA1) comparada con la expresada en X33 (HsMlatA1). La dosis letal media de la recombinante LsMlatA1 fue de 92.9  $\mu\text{g}/\text{ratón}$ , es decir, la disminución de la cadena de oligosacáridos aumenta la toxicidad 1.7 veces más comparada con la HsMlatA1, pero, sigue siendo significativamente menor a la nativa (62.8 veces). Como ya se mencionó anteriormente, la recombinante LsMlatA1 no carece de glicosilaciones, únicamente disminuye el número de manosas añadidas, por lo que quizás sigan interfiriendo en la unión al receptor. Sin embargo, la disminución de la actividad por oligosacáridos es hipotético y solo será comprobado cuando sMlatA1 sea expresada en *P. pastoris* sin oligosacárido. La forma más sencilla de lograrlo sería expresándola de manera intracelular, pero existen algunos otros métodos, como es el uso de inhibidores de glicosilación como tunicamicina o benzoyl-Asn-Leu-Thr-N-methylamida, o si ya se conocieran los aminoácidos glicosilados se podría realizar mutagénesis sitio dirigida en tales aminoácidos y así evitar la glicosilación (Daly, R. *et al.*, 2005).

Por otro lado, tampoco hay que descartar la posibilidad de que un porcentaje de la recombinante pudiera tener un plegamiento incorrecto, como fue el caso de Chen, CY., *et al* 2006, donde 50% de la dendroaspina (proteína perteneciente a la familia de los tres

dedos) recombinante tenía un plegamiento incorrecto. Lo anterior se puede comprobar mediante dicroísmo circular o resonancia magnética nuclear.

### **IX.3 Evaluación de títulos de anticuerpos por ELISA y capacidad neutralizante de los sueros obtenidos**

La mayor limitante que existe para utilizar la proteína nativa como inmunógeno, es la baja cantidad que se puede obtener de los venenos. Con los rendimientos alcanzados con las dos cepas (X33 y SM5) se logró inmunizar animales con mayor cantidad de proteína.

Se ha descrito en la literatura que antígenos manosilados incrementan la presentación de antígeno y mejoran la respuesta humoral y citotóxica mediada por linfocitos T (Magnus-Sjöblom, 2008). Múltiples estudios han demostrado que proteínas manosiladas expresadas en *P. pastoris* son más inmunogénicas comparadas con su contraparte no glicosilada en *E. coli* (Ahle'n G., *et al.*, 2012). El uso de levaduras para manosilar proteínas parece proveer un potente inmunoestimulador para el desarrollo de vacunas o antígenos para obtener anticuerpos de neutralización (Lam, JS., *et al.*, 2005, Luong, M., *et al.*, 2007, Magnus- Sjöblom, 2008). El fondo bioquímico de la mejora inmunogénica es a través de receptores de unión a manosas (MR), encontrados en células presentadoras de antígeno como células dendríticas y macrófagos, y el receptor SIGN (*specific intracellular adhesion molecule-3 grabbing non integrin*, DC-SIGN) de células dendríticas (Magnus-Sjöblom, 2008, Gustafsson, A., *et al.*, 2011, Luong, M., *et al.*, 2007).

Con estos antecedentes, se pudiera pensar que por tener mayor número de manosas y ser más grande, HsMlatA1 sería más inmunogénica. Sin embargo, esto no ocurre ya que el título de los sueros de los conejos inmunizados con la recombinante de baja manosilación (LsMlatA1) es hasta 7 veces superior comparado con los de HsMlatA1 (Tabla 4). Gustafsson, A., *et al.*, en 2011, sugieren que glicoproteínas altas en manosas con estructura compleja, son menos inmunogénicas, posiblemente debido a un impedimento estérico sobre los receptores de manosas, presentes en células presentadoras de antígeno. Al tener LsMlatA1 un menor número de manosas (menos complejo) es más inmunogénica y por ende provee una respuesta inmune humoral más alta.

Nuestro resultado se compara con lo reportado por Yang, YL., *et al.* (2013), donde observaron que una proteína con bajo número de manosas es más inmunogénica que sus contrapartes hiperglicosilada y no glicosilada. Lo anterior nos lleva a pensar que al disminuir el número de manosas, se elimina el impedimento estérico y los receptores de manosas de las células presentadoras de antígeno reconocen mejor la proteína y por ende aumenta la respuesta inmune humoral. Sin embargo, hay que mencionar que si bien el título de anticuerpos es alto, gran parte de esos anticuerpos generados están dirigidos contra cadena de azúcares. En la Tabla 4, se ve una diferencia entre los títulos de los 4 sueros, por un lado reconociendo a MlatA1 y por el otro a sMlatA1, siempre mucho más altos contra la proteína glicosilada.

#### **IX.4 Neutralización**

Los títulos de anticuerpos de los sueros 1 y 2 son similares o inferiores a los obtenidos por Carbajal-Saucedo, A., (2014), sin embargo, el suero 2 mostró una capacidad neutralizante a diferencia de lo reportado por Carbajal-Saucedo donde los anticuerpos detectados por ELISA no fueron neutralizantes. Pareciera ser que es necesario inmunizar animales con cantidades grandes para poder generar anticuerpos neutralizantes.

Por otro lado, parece existir una relación entre el título y la dosis efectiva media ( $DE_{50}$ ). Los sueros títulos más elevados (suero 3 y 4) fueron los que mejor neutralizaron el efecto neurotóxico de MlatA1, en otras palabras, el inmunógeno LsMlatA1 es mucho más efectivo para la obtención de anticuerpos neutralizantes.

Con este último resultado cubrimos nuestra hipótesis principal: es necesaria una proteína activa o con un correcto plegamiento para poder generar anticuerpos neutralizantes. En este trabajo no sólo generamos una proteína recombinante activa, sino también un buen inmunógeno para generar anticuerpos neutralizantes. Por otra parte, para generar un suero experimental o antiveneno, es necesario inmunizar animales. Con nuestras proteínas recombinantes podemos inyectar más proteína sin la incertidumbre de envenenar o inclusive matar al animal, ya que la actividad tóxica de las proteínas recombinantes es baja.

Por último, con este trabajo damos un paso importante en la posible mejora de antivenenos por desarrollarse. El uso de proteínas recombinantes puede llegar a reemplazar en un futuro los venenos naturales para la inmunización de los animales que producen los sueros que son la materia prima para los antivenenos.

## **X. CONCLUSIONES**

- Es posible generar una alfa-neurotoxina recombinante activa, si bien con menor actividad letal, en el sistema de expresión *Pichia pastoris*.
- La disminución en el número de manosas aumenta la actividad tóxica de la recombinante.
- Es posible generar anticuerpos neutralizantes utilizando HsMlatA1 y LsMlatA1.
- La disminución de manosas en el sitio de glicosilación mejora la respuesta inmune humoral.
- LsMlatA1 es mejor inmunógeno para generar una respuesta inmune humoral protectora.

## **XI. PERSPECTIVAS**

- Caracterizar la glicoproteína para identificar los aminoácidos glicosilados.
- Inmunizar caballos con LsMlatA1 y veneno completo para evaluar la posible mejora de neutralización contra alfa-neurotoxinas.
- Comprobar la posible influencia de la manosilación en la inmunogenicidad utilizando una proteína no glicosilada.

## XII.LITERATURA CITADA

1. **Ahle'n, G., Strindelius, L., Johansson, T., Nilsson, A., Chatzissavidou, Sjoblom, NM., Rova, U., and Holgersson, J.,** (2012). Mannosylated Mucin-Type Immunoglobulin Fusion Proteins Enhance Antigen-Specific Antibody and T Lymphocyte Responses, PLoS One, 7 (10):e46959.
2. **Anangi, R., Chen, CY., Cheng, CH., Chen, YC., Chen, CC., CHU, YP., Chang, CH., Jeng, WY., Shiu, JH., and Chuang, WJ.,** (2007). Expression of snake venom toxins in *Pichia pastoris*, Toxin Reviews, 26:169–187.
3. **Bénard-Valle, M.,** (2011). Caracterización Bioquímica del veneno de la serpiente de coral *Micrurus tener*, Tesis de Maestría. Cuernavaca, Morelos, México. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.
4. **Bénard-Valle, M.,** (2009). Similitud bioquímica e inmunoquímica entre venenos de coralillo norteamericanos, Tesis de Licenciatura, Cuernavaca Morelos, México. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.
5. **Bolaños, R., Cerdas, L. and Abalos, JW.,** (1978). Venoms of coral snakes (*Micrurus* spp.): report on a multivalent antivenom for the Americas, Bulletin Pan American Health Organ. 12(1):23-7.
6. **Brodsky, JL. and William, RS,** (2011). Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum: Recent lessons from yeast and mammalian cell systems”, Current Opinion in Cell Biology, 23:464–475.
7. **Brondyk, WH.,** (2009). Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein, Methods in enzymology, 463: 131-147.
8. **Campbell, JA. and Lamar, WL.,** (2004). The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere (Vol. 1). Cornell University Press. New York.
9. **Carbajal-Saucedo, A.,** (2004). Comparación inmunoquímica del veneno de serpientes de coral (Elapidae: *Micrurus*, *Micruroides*) mexicanas. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM. México.
10. **Carbajal-Saucedo, A.,** (2014). Caracterización biológica, bioquímica e inmunoquímica del veneno de *Micrurus laticollaris*; bases para el desarrollo de un antiveneno de amplio espectro contra coralillo. Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología, UNAM. México.
11. **Carbajal-Saucedo, A., López-Vera, E., Bénard-Valle, M., Zamudio, F., de Roodt, A. and Olvera-Rodriguez, A.,** (2013). Isolation, characterization, cloning

and expression of an alpha-neurotoxin from the venom of the Mexican coral snake *Micrurus laticollaris* (Squamata: Elapidae). *Toxicon* 66:64-74.

12. **Celik, E. and Calik, P.**, (2011). Production of recombinant proteins by yeast cells, 2011, *Biotechnology advances*, 30(5):1108-1018.
13. **Chatani, E., Tanimizu, N., Ueno, H. and Hayashi, R.**, (2000). Expression of soluble Bovine Pancreatic Ribonuclease A in *Pichia pastoris* and its purification and characterization, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64 (11) 2437-2444.
14. **Chen, YS., Jin, M., Egborge, T., Cooppola, G., Andre, J. and Calhoun, DH.**, (2000). Expression and characterization of glycosylated and catalytically active recombinant human alpha-galactosidase a produce in *Pichia pastoris*. *Protein Express. Purif* 20: 472-484.
15. **Chen, CY., Cheng, CH., Chen, YC., Lee, JC., Chou, SH., Huang, W., and Chuang, WJ.**, (2006). "Preparation of Amino-Acid-Type Selective Isotope Labeling of Protein Expressed in *Pichia pastoris*", *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* 62:279–287.
16. **Cheng, CH., Chen, YC., Chen, CY. and Chuang, WJ.**, (2009). "Expression in *Pichia pastoris* and Backbone Dynamics of Dendroaspin and Erabutoxin b: Motion Variability within Three-fingered Toxins", *FASEB J* 23 (Meeting Abstract Supplement) 894.8.
17. **Chotwiwatthanakun, C., Pratanaphon, R., Akesowan, S., Sriprapat, S., Ratanabanangkoon, K.**, (2001). Production of potent polyvalent antivenom against three elapid venoms using a low dose, low volume, multi-site immunization protocol, *Toxicon*, 39(10): 1487-1494.
18. **Cregg JM.**, (2008). *Pichia* protocols 2da edición, *Methods in molecular Biology* Volumen 389.
19. **Cregg, JM., Cereghino, JL., Shi, J. and Higgins, DR.**, (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol.*, 16(1):23-52.
20. **Cregg, JM., Tolstorukov, I., Kusari, A., Sunga, J., Madden, K. and Chappell T.**, (2009). Expression in yeast *Pichia pastoris*, *Methods in Enzymology*, Volume 463, 169-189.
21. **Daly, R. and Hearn, MT.**, (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production, *J. Mol. Recognit.*, 18: 119–138.

22. **Damasceno, LM., Huang, CJ. And Batt, CA.,** (2012). Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production, *Appl Microbiol Biotechnol*, 93:31–39.
23. **Ezzine, A., M'Hirsi el Adab, S., Bouhaouala-Zahar, B., Baciou, IH. and Najib, M.,** (2012). Efficient expression of the anti-Aahl' scorpion toxin nanobody under a new functional form in a *Pichia pastoris* system. *Biotechnology and Applied Biochemistry* Volume 59, Issue 1.
24. **Gustafsson, A., Sjöblom, M., Strindelius, L., Johansson, T., Fleckenstein, T., Lindberg, L., Angström, J., Rova, U., Holgersson, J.,** (2011). *Pichia pastoris* produced mucin-type fusion proteins with multivalent O-glycan substitution as targeting molecules for mannose-specific receptors of the immune system. *Glycobiology* vol. 21 no. 8 pp. 1071–1086.
25. **Gustafsson, C., Govindarajan, S. and Minshull, J.,** (2004). "Codon bias and heterologous protein" *TRENDS in Biotechnology*, ;22(7):346-53.
26. **Hamilton, SR., Bobrowicz, P., Bobrowicz, B., Davidson, RC., Li, H., Mitchell, T., Nett, JH., Rausch, S. Stadheim, TA., Wischnewski, H., Wildt, S., Gerngross, TU.,** (2003). Production of Complex Human Glycoproteins in Yeast, *Science*, Vol. 301, 1244-1246.
27. **Hamilton, SR., Cook, WJ., Gomathinayagam, S., Burnina, I., Bukowski, J., Hopkins, D., Schwartz, S., Du, M., Sharkey, NJ., Bobrowicz, P., Wildt, S., Li, H., Stadheim, TA. and Nett, JH.,** (2013). Production of sialylated O-linked glycans in *Pichia pastoris*. *Glycobiology*, 23(10):1192-11203.
28. **Higgins, DR., and Cregg, JM.,** (1998). *Pichia* Protocols Vol. 103. Methods in Molecular Biology. Edited by Walker, JM., Humana Press, Totowa, NJ.
29. **Hirabayashi, J., Yamada, M., Kunoa, A. and Tatenoa, H.,** (2013). Lectin microarrays: concept, principle and applications, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, 42, 4443-4458.
30. **Kini, RM., and Doley, R.** (2010). Structure, function and evolution of three-finger toxins: Mini proteins with multiple targets. *Toxicon*, 56: 855-867.
31. **Laemmli, UK.,** (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685.
32. **Lam, JS., Mansour, MK., Specht, CA. and Levitz, SM.,** (2005). A Model Vaccine Exploiting Fungal Mannosylation to Increase Antigen Immunogenicity, *Journal of immunology*, vol. 175 no. 11 7496-7503.

33. **Levandoski, MM., Caffery, PM., Rogowski, RS., Lin, Y., Shi, QL., Hawrot, E.,** (2000). Recombinant Expression of  $\alpha$ -Bungarotoxin in *Pichia pastoris* Facilitates Identification of Mutant Toxins Engineered to Recognize Neuronal Nicotinic Acetylcholine, *Journal of Neurochemistry* 74, 1279–1289.
34. **Li, P., Anumanthan, A., Gao, XG., Ilangovan, K., Suzara, VV., Düzgünes, N., and Renugopalakrishnan, V.,** (2007). Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*, *Appl Biochem Biotechnol.*, 142:105–124.
35. **Li, H. and Xia, Y.,** (2008). Expression, antiserum preparation and bioactivity assays of insect neurotoxin LqhIT2, *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 24: 1761–1767.
36. **Lin-Cereghino, GP., Lin-Cereghino, JL., Ilgen, C. and Cregg, JM.,** (2002). Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*, *Current Opinion in Biotechnology* 2002, 13:329–332
37. **Linder, S., Schliwa, M., and Kube-Granderath, E.,** (1996). Direct PCR Screening of *Pichia pastoris* Clones. *Bio-Techniques* 20, 980-982.
38. **Ling, LY., Ithoi, I. and Yik, FM.,** (2010). Optimization for high-level expression in *Pichia Pastoris* and purification of truncated and full length recombinant SAG2 of *Toxoplasma Gondii* for diagnostic use. *Southeast Asian Journal Trop Medical Public Health*, 41:3.
39. **Luong, M., Lam, JS., Chen, J. and Levitz SM.,** (2007). Effects of fungal N- and O-linked mannosylation on the immunogenicity of model vaccines. *Vaccine*, 25(22):4340-4.
40. **Magnus-Sjöblom,** (2008). *Pichia pastoris* as a platform for the production of therapeutic glycoproteins, Tesis de licenciatura, Lulea, Suecia. Division of Biochemical and Chemical Process Engineering, Universidad de Lulea.
41. **Manock, SR., Suarez, G., Graham, D., Avila, ML., Warrell, DA.,** (2008). Neurotoxic envenoming by South American coral snake (*Micrurus lemniscatus helleri*): case report from eastern Ecuador and review, *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, 102(11):1127-1132.
42. **Mazola, Y., Chinaea, G. and Musacchino, A.,** (2011). Glycosylation and Bioinformatics: current status for glycosylation prediction tools. *Biotechnol Apl.* vol.28, n.1, pp. 6-12.
43. **Mislovicova D., Masarova J. and Svitel J., and Gemeiner, P.,** (2002). Influence of mannan epitopes in glycoproteins, Concanavalin A interaction. Comparison of

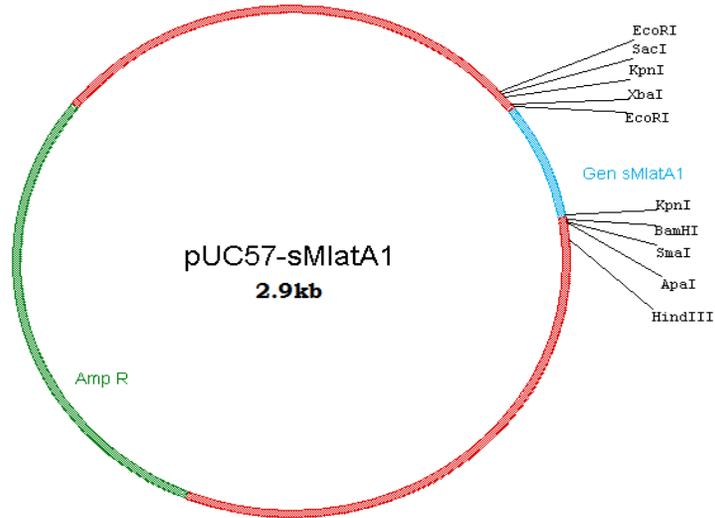
natural and synthetic glycosylated proteins International Journal of Biological Macromolecules 30 (2002) 251-258.

44. **Menéndez, C., Martínez, D., Trujillo, LE., Mazola, Y., González, E., Pérez, ER., and Hernández L.,** (2013). Constitutive high-level expression of a codon-optimized  $\beta$ -fructosidase gene from the hyperthermophile *Thermotoga maritima* in *Pichia pastoris*, *Appl Microbiol Biotechnol.*, 97:1201–1212.
45. **Nett, JH., Cook, WJ., Chen, MT., Davidson, RC., Bobrowicz, P., Kett, W., Bravnova, E., Potgieter, TI., Mellon, MT., Pronz, B., Choi, BK., Zha, D., Burnina, I., Bukowski, JT., Du, M., Wildt, S. and Hamilton, SR.,** (2013). Characterization of the *Pichia pastoris* Protein-O-mannosyltransferase gene family. *PLoS ONE* 8(7): e68325.
46. **Nirathanan, S., and Gwee, M.,** (2004). Three-Finger  $\alpha$ -Neurotoxins and the Nicotinic Acetylcholine Receptor , Forty Years On, *Journal Pharmacology Science* 94, 1-17.
47. **Olvera, A., Ramos, B., Clement, H., Stock, RP. and Alagón, A.,** (2006). North and South American Loxoceles spiders: development of a polyvalent antivenom with recombinant sphingomyelinases D as antigen, *Toxicon*, 48(1):64-74.
48. **Osipov, AV., Astapova, MV., Tsetlin, VI. and Utkin YN.,** (2004). The first representative of glycosylated three-fingered toxins Cytotoxin from the *Naja kaouthia* cobra venom, *European Journal Biochemistry*, 271: 2018–2027.
49. **Ozturk, SS. and Hu, WS.,** (2006). *Cell culture Technology for Pharmaceutical and cell- based therapies*, Taylor and Francis group, New York.
50. **Palczewska, M., Batta, G. and Groves, P.,** (2003). Concanavalin A-agarose removes mannan impurities from an extracellularly expresses *Pichia pastoris* recombinant protein, *Cellular & Molecular Biology letters* 8(3):783-92
51. **Petrescu, AJ., Milac, AL., Petrescu, SM., Dwek, RA. and Wormald, MR.,** (2003). Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding. *Glycobiology*, 14(2):103-114,
52. **Pillet, L., Tremeau, O., Ducancel, F., Drevet, P., Zinn-Justin, S., Pinkasfeld, S., Boulain, JC. and Menez, A.,** (1992). Genetic Engineering of Snake Toxins. Role of invariant residues in the structural and functional properties of a curaremimetic toxin, as probed by site-directed mutagenesis, *The Journal of Biological Chemistry*, 268;2: 909-916.

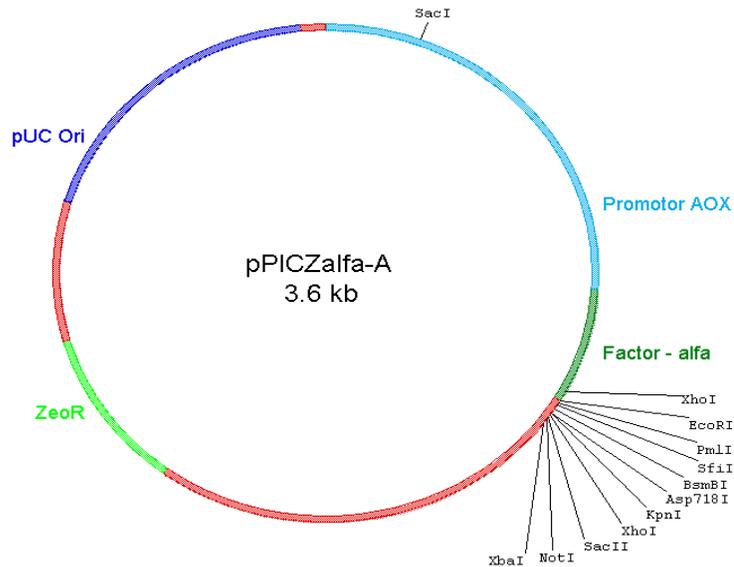
- 53. Pon, S. and Ponlapat, R.,** (2007). Molecular cloning of albolatin, a novel snake venom metalloprotease from green pit viper (*Trimeresurus albolabris*), and expression of its disintegrin domain, *Toxicon*, 15;50(8): 192-200.
- 54. Phui, JS., Nanling, G., Afifiyan, F., Donghui, M., Lay, PS., Armugam, A. and Jeyaseelan, K.,** (2003). Snake postsynaptic neurotoxins: gene structure, phylogeny and applications in research and therapy, *Biochimie* 86:137–149.
- 55. Quintero, V., Ortiz, E., Rendón, M., Schwartz, EF., Becerril, B., Corzo, G., Possani, LD.,** (2011). Scorpion and spider venom peptides: Gene cloning and peptide expression, *Toxicon*, 58 (8): 644-663.
- 56. Sambrook, J., Fritsch, EF. and Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- 57. Sarramegna, V., Demange, P., Milon, A., Talmont, F.,** (2002). Optimizing Functional versus Total Expression of the Human  $\mu$ -Opioid Receptor in *Pichia pastoris*, *Protein expression and purification*, 24(2):212-20.
- 58. de Oliveira, JS., daSilva, ARB., Soares, MB., Stephano, MA., Dias, WO., Raw, I. and Ho, PL.** (2000). Cloning and Characterization of an  $\alpha$ -Neurotoxin-Type Protein Specific for the Coral Snake *Micrurus corallines*, *Biochem Biophys Res Commun.* 27;267 (3): 887-891.
- 59. Siurkus, J. and Neubaue, P,** (2011). Heterologous production of active ribonuclease inhibitor in *Escherichia coli* by redox state control and chaperonin coexpression, *Microb. Cell Fact.*, 10:65.
- 60. Sorensen, H., and Mortensen, K.,** (2005). Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*, *Microbial Cell Factories*, 4(1):1.
- 61. Thanka-Christlet, TH. and Veluraja, K.,** (2001). Database analysis of O-glycosylation sites in proteins, *Biophys Journal* v.80 (2)
- 62. Tsetlin, V.,** (1999). Snake venom  $\alpha$ -neurotoxins and other 'three-finger' proteins, *Eur. J. Biochem.* 264, 281-286
- 63. Weidner, M., Taupp, M. and Hallam, SJ.** (2010). Expression of Recombinant Proteins in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*, *Journal of Visualized Experiments*, 25:(36) 1862.
- 64. Yang, JL., He, HX., Zhu, HX., Cheng, KD. and Zhu, P.,** (2009). Optimization on the production of analgesic peptide from *Buthus martensii* Karsch in *Pichia pastoris*, *Yao Xue Xue Bao*, 44: 91–94.

- 65. You, WK., Choi, WS., Koh, YS., Shin, HC., Jang, Y. and Chung, KH., (2004).** Functional characterization of recombinant batroxobin, a snake venom thrombin-like enzyme, expressed from *Pichia pastoris*, FEBS letters, 30;571(1-3):67-70.
- 66. Vassileva, A., Chugh, DA., Swaminathan, S. and Khanna, N., (2001).** Effect of copy number on the expression levels of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, Protein expression and Purification, 21(1):71-80.

**ANEXO 1. Mapa del vector pUC57 con el gene sMlatA1**



**ANEXO 2. Mapa y secuencia del vector pPICZalfa-A**



pUC ori: Origen de replicación para *E. coli*  
 Promotor AOX (alcohol deshidrogenasa)  
 Factor alfa: gen que codifica para un péptido señal de secreción  
 ZeoR: Gene de resistencia al antibiótico zeocina

5' end of AOX1 mRNA

811 AACCTTTTTT TTTATCATCA TTATTAGCTT ACTTTCATAA TTGCGACTGG TTCCAATTGA

871 CAAGCTTTTGG ATTTTAACGA CTTTTAACGA CAACTTGAGA AGATCAAAAA ACAACTAATT

931 ATTCGAAACG **ATG** AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA  
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala

983 TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA  
Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala

**α-factor signal sequence**

034 CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC  
Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe

085 GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG TTT  
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu Phe

**α-factor priming site**

136 ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT CTC  
Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Val Ser Leu

**Kex2 signal cleavage** EcoR I Pml I Sfi I BamB I Asp718 I

187 GAG AAA AGA GAG GCT GAA GC TA GAATTCAC GTGGCCAG CCGGCCGC TCGGATCGGT  
Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala

**Ste13 signal cleavage**

244 ACCTCGAGCC GCGGCGGCC GCCAGCTTTC TA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG  
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu

**c-myc epitope**

299 GAT CTG AAT AGC GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT TGA GTTTGTAGCC  
Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His \*\*\*

**polyhistidine tag**

351 TTAGACATGA CTGTTCTCTCA GTTCAAGTTG GGCACCTACG AGAAGACCGG TCTTGCTAGA

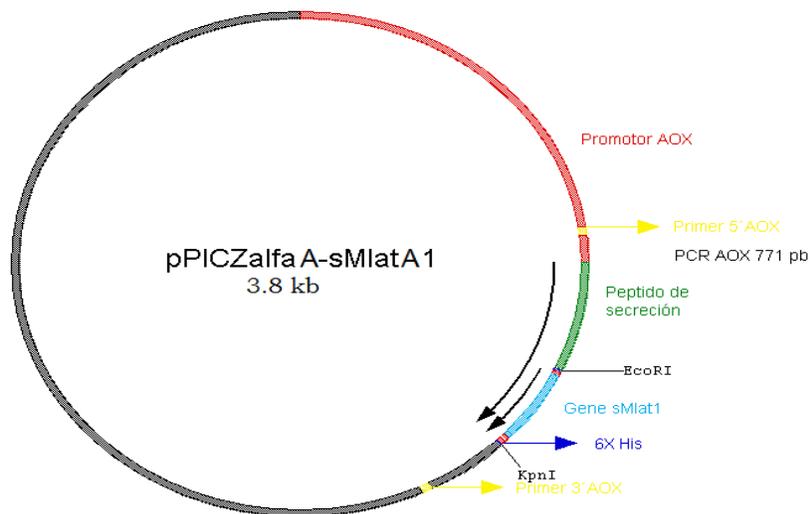
**3' AOX1 priming site**

411 TTCTAATCAA GAGGATGTCA GAATGCCATT TGCCTGAGAG ATGCAGGCTT CATTTTTGAT

**3' polyadenylation site**

471 ACTTTTTTAT TTGTAACCTA TATAGTATAG GATTTTTTTT GTCATTTTGT TTCTTCTCGT

### ANEXO 3. Mapa del vector pPICZalfaA-sMlat1



## ANEXO 4. Digestiones con *EcoRI* y *KpnI*

### 4.1 Digestiones con *EcoRI* y *KpnI* de pUC57 y pPICZalfaA

	pUC57-sMlatA1			pPICZalfaA		
Corte/ reactivo	<i>EcoRI</i>	<i>KpnI</i>	<i>EcoRI</i> / <i>KpnI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>KpnI</i>	<i>EcoRI</i> / <i>KpnI</i>
<i>EcoRI</i> (20UI/ μL)	0.5 μL	-	0.5 μL	0.5 μL	-	0.5 μL
<i>KpnI</i> (10UI/ μL)	-	1 μL	1 μL	-	1 μL	1 μL
Buffer 1 (10X)	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL
BSA (1 μg/ μL)	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL
DNA	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL
H <sub>2</sub> O	2.5 μL	2 μL	1.5 μL	2.5 μL	2 μL	1.5 μL

### 4.2 Digestiones con enzimas *EcoRI* y *KpnI* de los candidatos

	pPICZalfaA-sMlatA1		
Corte/ Reactivo	<i>EcoRI</i>	<i>KpnI</i>	<i>EcoRI</i> / <i>KpnI</i>
<i>EcoRI</i> (20UI/μL)	0.5 μL	-	0.5 μL
<i>KpnI</i> (10UI/μL)	-	1 μL	1 μL
Buffer 1 (10X)	1 μL	1 μL	1 μL
BSA (1 μg/ μL)	1 μL	1 μL	1 μL
DNA	5 μL	5 μL	5 μL
H <sub>2</sub> O	2.5 μL	2 μL	1.5 μL

### 4.3 Digestión de pPICZA-sMlatA1 con *SacI*

	pPICZalfaA- sMlatA1
<i>SacI</i> (20UI/μL)	2 μL
Buffer 1 (10X)	3 μL
BSA (1 μg/ μL)	3 μL
DNA	22 L

## ANEXO 5. Secuencia sMlat1 en *P. pastoris* X33 - clona 6

```

TTTAACGACAACCTTGAGAAGATCAAAAAACAATAATTATTCGAAACGATGAGATTTCCCTCAATTTTTACTGC
                                ▶ M R F P S I F T A
TGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTC
▶ V L F A A S S A L A A P V N T T T E D E T A Q I
CGGCTGAAGCTGTTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGC
▶ P A E A V I G Y S D L E G D F D V A V L P F S N S
ACAAATAACGGGTTATTGTTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGA
▶ T N N G L L F I N T T I A S I A A K E E G V S L E
                                EcoRI
GAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATTCGAAACGATGAGAATTTGTTACAACCAACAATCTTCTCAACCACCAACTA
▶ K R E A E A E F E T M R I C Y N Q Q S S Q P P T
CTAAGACTTGTTCTGAAGGTCAATGTTACAAGAAGACTTGGAGAGATCATAGAGGTACTATTATTGAAAGAGGT
▶ T K T C S E G Q C Y K K T W R D H R G T I I E R G
TGTGCTTGTCCAAACGTTAAGCCAGGTATTCAAATTTCTTGTTGTACTTCTGATAAGTGTAAACGGTCATCATCA
▶ C A C P N V K P G I Q I S C C T S D K C N G H H H
                                XpnI
TCATCATCATTAAGGTACCTCGAGCCGCGGCGGCCAGCTTTCTAGAACA AAAACTCATCTCAGAAGAGGAT
▶ H H H .
CTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCATTGAGTTTGTAGCCTTAGACATGACTGTTCCCTCAGTTCA
AGTTGGGCA

```

 Peptido de secreción  Gen sMlat1

## ANEXO 6. Secuencia sMlat1 en *P. pastoris* SM5- clona 13

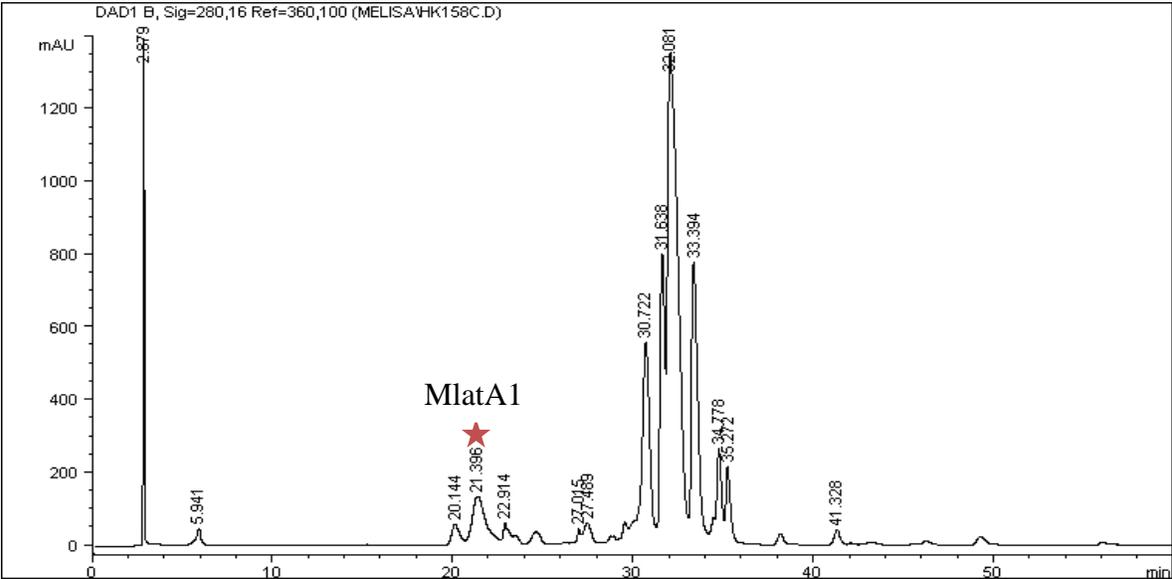
```

TTTAACGACAACCTTGAGAAGATCAAAAAACAATAATTATTCGAAACGATGAGATTTCCCTCAATTTTTACTGC
                                ▶ M R F P S I F T A
TGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTC
▶ V L F A A S S A L A A P V N T T T E D E T A Q I
CGGCTGAAGCTGTTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGC
▶ P A E A V I G Y S D L E G D F D V A V L P F S N S
ACAAATAACGGGTTATTGTTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGA
▶ T N N G L L F I N T T I A S I A A K E E G V S L E
                                EcoRI
GAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATTCGAAACGATGAGAATTTGTTACAACCAACAATCTTCTCAACCACCAACTA
▶ K R E A E A E F E T M R I C Y N Q Q S S Q P P T
CTAAGACTTGTTCTGAAGGTCAATGTTACAAGAAGACTTGGAGAGATCATAGAGGTACTATTATTGAAAGAGGT
▶ T K T C S E G Q C Y K K T W R D H R G T I I E R G
TGTGCTTGTCCAAACGTTAAGCCAGGTATTCAAATTTCTTGTTGTACTTCTGATAAGTGTAAACGGTCATCATCA
▶ C A C P N V K P G I Q I S C C T S D K C N G H H H
                                XpnI
TCATCATCATTAAGGTACCTCGAGCCGCGGCGGCCAGCTTTCTAGAACA AAAACTCATCTCAGAAGAGGAT
▶ H H H .
CTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCATTGAGTTTGTAGCCTTAGACATGACTGTTCCCTCAGTTCA
AGTTGGGCA

```

 Peptido de secreción  Gen sMlat1

**ANEXO 7. Purificación de MlatA1 mediante RP-HPLC a partir del veneno de *M. laticollaris***



## XIV. MEDIOS Y SOLUCIONES

### **Azul Brillante de Coomassie**

1 g de azul de coomassie G-250 (Research Organiscs)  
125 mL de Isopropanol (JT. Baker)  
100 mL de ácido acético glacial (Mallinckrodt Chemicals)  
Aforar a 500 mL de agua y filtrar

### **BMGY (Buffer Medium Glicerol YNB) y BMMY (Buffer Medium Metanol YNB)**

100 mM Fosfato de potasio, pH 5.5 (JT. Baker)  
1% Extracto de levadura (Becton Dickinson)  
2% Peptona de caseína (Becton Dickinson)  
13.4% YNB (Becton Dickinson)  
4X10<sup>-5</sup> Biotina (Sigma- Aldrich)  
1% Glicerol o Metanol para BMMY (JT. Baker)

### **Breaking buffer**

0.6g Fosfato de sodio Monobásico (JT.Baker)  
37.2 mg EDTA (JT.Baker)  
5 mL Glicerol (JT.Baker)  
Ajustar pH a 7.4  
17.2 mg PMSF (inhibidor de proteasas) \* Adicionar antes de usarse (Pierce®)  
Aforar a 100 mL con agua bidestila

### **CaCl<sub>2</sub> + 2H<sub>2</sub>O 0.1M**

14.6 g de CaCl<sub>2</sub> + 2H<sub>2</sub>O (JT.Baker)  
Llevar a 1L con agua destilada

### **LB**

10 g de Triptona (Becton Dickinson)  
5 g de Extracto de levadura (Becton Dickinson)  
10 g de NaCl (JT.Baker)  
Llevar a un 1L con agua destilada

**LB bajo en sales**

10 g de Triptona (Becton Dickinson)

5 g de Extracto de levadura (Becton Dickinson)

5 g de NaCl (JT.Baker)

15 g de agar (solo en caso de placas- Becton Dickinson)

Llevar a un 1 L con agua destilada

**PBS 1X**

8 g de NaCl (JT.Baker)

0.1 g de KCl (JT.Baker)

14.4 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (JT.Baker)

2.4 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (JT.Baker)

Ajustar pH a 7.2

Llevar a 1 L con agua destilada

**Solución desteñidora**

100 mL de Isopropanol (JT.Baker)

100 mL de Ácido acético glacial (Mallinckrodt Chemicals)

Llevar a 1L con agua destilada

**Sorbitol-D 1M**

182.2 g de Sorbitol D (Sigma-Aldrich)

Llevar a 1L con agua destilada

**TAE 50X**

242 g de Tris (Research Organiscs)

18.6 g de EDTA (JT. Baker)

800 mL de agua

Ajustar pH a 7.6

10 mg de Bromuro de Etidio (Sigma-Aldrich)

Aforar a 1 L

**TBST 1X pH7.6**

10 mM	Tris base (research Organics)
150 mM	NaCl (JT. Baker)
0.05%	Tween 20 (Bio-Rad)

**YPD**

10 g Extracto de levadura (Becton Dickinson)  
20 g Peptona de caseína (Becton Dickinson)  
20 g Dextrosa (JT. Baker)  
20 g de agar (solo en caso de placas- Becton Dickinson)  
Levar a un 1L con agua destilada

**YPDS**

10 g de Extracto de levadura (Becton Dickinson)  
20 g Peptona de caseína (Becton Dickinson)  
20 g Dextrosa (JT. Baker)  
182.2 de Sorbitol-D (Sigma-Aldrich)  
20 g de agar (solo en caso de placas- Becton Dickinson)  
Levar a un 1L con agua destilada

**Anticuerpo monoclonal:**

Anti ig-G de conejo acoplado a fosfatasa alcalina (Merck ®)  
Anti-IgG de conejo acoplado a HRP (peroxidasa de rábano- Merck®)

**Glucosidasa:**

Endoglucosidasa F1 (Merck)

**Marcador de masa molecular para geles de agarosa:**

2 log DNA ladder, (New England Biolabs)

**Marcador de masa molecular para geles SDS-PAGE:**

Color Plus Prestained Protein Market (New England Biolabs)