



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**PRODUCCIÓN DE LA CONOTOXINA *VITx* POR TÉCNICAS DE ADN
RECOMBINANTE**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

PRESENTA:

JESÚS OMAR TOVAR RAMOS

Dra. Laura Escobar Pérez
Facultad de Medicina, UNAM

Dra. Nuria Sánchez Puig
Instituto de Química, UNAM

Dr. Federico del Rio Portilla
Instituto de Química, UNAM

Ciudad de México, abril, 2016



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.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la coordinación del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas.

Al Instituto de Química de la UNAM.

A CONACYT, por el financiamiento de los proyectos 166913 y 253586.

A CONACYT, por la beca otorgada durante mis estudios de maestría (549677).

Al apoyo financiero a cargo del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT). Proyecto No. IN214613.

A la Dra. Laura Escobar Pérez por guiar este proyecto de investigación.

A la Dra. Nuria Sánchez Puig y al Dr. Federico del Rio Portilla, miembros del comité tutor, por su apoyo y aportaciones durante el desarrollo de este proyecto.

Al jurado de examen de maestría, constituido por:

Dr. Alejandro Alagón Cano

Dr. Estuardo López Vera

Dr. Enrique García Hernández

Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros

Dra. Norma Adriana Valdez Cruz

cuyas valiosas aportaciones contribuyeron a mejorar esta tesis.

A la M. en C. Liliana Pérez Reyes por guiarme y compartir sus valiosos conocimientos.

A la M. en C. Carolina Salvador Hernández por compartir sus conocimientos de biología molecular.

Al Dr. Marcelo Galván Espinosa y a la Dra. Cristina Dezi por los modelos estructurales de las conotoxinas.

A mis compañeros de laboratorio: Beatriz, Zina, Claudia, Teresa, Erika y Dilan por su apoyo y compañía.

DEDICATORIAS

A mis padres, Jesús y Celina, y a mi hermano, Gerardo, por su apoyo y amor incondicional.

A mis abuelos, Raquel y Ernesto, por hacer de mi infancia una etapa muy feliz y completa.

A mis tías y primos, Begoña, Jackeline, Claudia, Karla, Rodolfo, Diego y Leonardo por estar siempre para mí y por su gran amor.

A mi primo Rodrigo, el niño más valiente y noble que he conocido.

Κατά τον δαίμονα εαυτού

...Vivir es supremo bien, y, mejor que inteligente, hay que ser bueno y valiente, mirar claro y hablar bien.

Despedida a la Luna, Manuel Machado

...En este mundo nada es perfecto, tal vez sea una frase trillada, pero es la realidad. Justo por eso los hombres ordinarios buscan el concepto de la perfección para sentirse superiores. Pero en el fondo siempre me pregunto cuál es el significado de ser perfecto, y la respuesta que obtengo es nada, no significa nada. ¡La verdad de las cosas es que desprecio la perfección!, si algo fuera perfecto ¡se acabó!, significaría que no hay lugar para la imaginación, no habría espacio para la inteligencia, para la capacidad, para mejorar. ¿Lo entiendes?, para hombres de ciencia como nosotros la perfección es un callejón sin salida. Siempre hay que buscar ser mejor pero no perfecto. Los científicos se torturan con la idea de alcanzar la perfección, esa es la clase de criaturas que somos, nos deleitamos intentando llegar más allá, intentando alcanzar algo, que, al final, debemos aceptar que podría ser inalcanzable.

Mayuri Kurotsuchi, Bleach

ÍNDICE

Abreviaturas	1
Resumen	3
1.- Introducción	4
1.1.- Género <i>Conus</i>	4
1.2.- Conopéptidos	6
1.2.1.- Conotoxinas	6
1.2.1.1.- Conotoxinas de la superfamilia I2.....	14
1.2.2.- Biotecnología de las conotoxinas	15
1.3.- Tecnología recombinante.....	17
1.3.1.- Proteínas recombinantes.....	19
1.3.1.1.- Elementos de un vector de expresión para proteínas recombinantes.....	20
1.3.1.1.1.- Replicón	20
1.3.1.1.2.- Promotor	20
1.3.1.1.3.- Marcador de selección	20
1.3.1.1.4.- Etiquetas de afinidad.....	21
1.3.1.1.5.- Eliminación de las etiquetas de afinidad	23
1.3.2.2.- Problemas en la producción de proteínas recombinantes	25
1.3.2.2.1.- Baja o nula expresión.....	25
1.3.2.2.2.- Formación de cuerpos de inclusión	26
1.3.2.- Toxinas recombinantes	27
1.3.2.1.- Conotoxinas recombinantes.....	29
2.- Antecedentes	31
2.1.- Conotoxina ViTx	31
2.2.- Conotoxina Sr11a.....	31
3.- Justificación	34
4.- Objetivos	34
5.- Materiales y Métodos	35
5.2.- Expresión de la proteína de fusión	35
5.3.- Purificación de la proteína de fusión y separación de ViTx.....	35

5.4.- Identificación de la proteína de fusión y ViTx	36
6.- Resultados	38
7.- Discusión	48
8.- Conclusiones	53
9.-Perspectivas	53
10.- Bibliografía	54
11.- Anexos	68

Abreviaturas

Å Armstrongs

ϵ Coeficiente de extinción molar

μm Micrómetro

A Absorbancia

ADN Ácido desoxirribonucleico

AP 4-aminopiridina

ARNm Ácido ribonucleico mensajero

CI Cuerpos de inclusión

CnBr Bromuro de cianógeno

E Ácido glutámico

Fh8 Proteína de *Fasciola hepatica*

Gla γ -carboxilación

GST Glutación S-transferasa

Hyp Hidroxilación

IPTG Isopropil β -D-1 tiogalactopiranosido

KDa Kilodaltones

Kv Canal de potasio dependiente de voltaje

LB Medio Luria-Bertani

Lipoil Residuos 1-85 de la enzima dihidrolipoil acetiltransferasa de *Bacillus sterothermophilus*

MALDI *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* = Desorción/Ionización Laser Asistida por Matriz

MBP Proteína de unión a maltosa

MP Modificación postraducciona

nAChR Receptor nicotínico

NaCl Cloruro de sodio

nm Nanómetros

NusA *N-utilization substance protein A*

ori Origen de replicación

PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida

Poly-His Etiqueta de histidinas

R Arginina

RE Retículo endoplásmico

SDS Dodecilsulfato sódico

SPPS Síntesis de péptidos en fase sólida

SUMO *Small Ubiquitin-like Modifier*

TEA Tetraetilamonio

TEV Proteasa del virus del tabaco

TOF *Time of flight* = Tiempo de vuelo

Tris Tris (hidroximetil) aminometano

Trx Tioredoxina

Resumen

Los venenos de algunos organismos son una fuente de compuestos con potencial farmacológico. Los caracoles pertenecientes al género *Conus* constituyen un grupo diverso de depredadores marinos; abarcan más de 700 especies y cada una de ellas produce hasta 200 conopéptidos.

Dentro de los conopéptidos, aquellos con dos o más enlaces disulfuro son nombrados *conotoxinas*. Las conotoxinas se clasifican en *superfamilias* según su secuencia señal, el blanco molecular sobre el que actúan y su arreglo de cisteínas. La especificidad que tienen algunas conotoxinas por sus blancos moleculares las hace candidatas a nuevos compuestos con potencial farmacológico. Sin embargo, de su fuente natural se obtienen en muy bajas cantidades, por lo que el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan su síntesis es imprescindible para su estudio.

La conotoxina ViTx fue aislada de *Conus virgo*, pertenece a la superfamilia *I2*, consta de 35 aminoácidos entrecruzados por cuatro enlaces disulfuro y bloquea los canales potasio Kv1.1 y Kv1.3. En este trabajo se intentó producir la ViTx recombinante en *Escherichia coli* (BL21); se utilizó el vector de expresión pHLTEV. El péptido Sr11a, aislado de *Conus spurius*, también pertenece a la superfamilia *I2*, consta de 32 residuos entrecruzados por cuatro enlaces disulfuro y tiene actividad específica sobre los canales de potasio dependientes de voltaje Kv 1.2 y Kv 1.6. Este péptido ya ha sido producido por nuestro equipo de investigación (datos no publicados) y por ello se usó como control positivo. La producción de la conotoxina ViTx recombinante no fue posible. Planteamos varias hipótesis que nos ayudan a explicar porque la ViTx no se pudo producir de forma recombinante en *E. coli*.

1.- Introducción

1.1.- Género *Conus*

Los caracoles pertenecientes al género *Conus* (familia Conidae) comprenden un grupo de depredadores marinos ^[1]. Todos sus miembros usan su veneno, un coctel de pequeños péptidos (conopéptidos), para capturar a su presa y defenderse de posibles depredadores ^[2]. El género *Conus* consiste de más de 700 especies de caracoles cono, estos abundan en hábitats marinos tropicales (aunque algunas especies han colonizado aguas más frías). ^[3] La compleja red de interacciones biológicas a la que están sujetos los conos han hecho posible el desarrollo evolutivo de un inmenso repertorio molecular en sus venenos. Se estima que más de 100 diferentes componentes se encuentran en cada especie de cono, con lo que se estiman >50,000 componentes farmacológicamente activos en el género *Conus*. ^[4]

Los cónidos se dividen en tres grandes grupos de acuerdo al tipo de presa del que se alimentan. El grupo más grande de cónidos es el que se alimenta de gusanos, en especial de poliquetos (una clase de gusanos marinos). El segundo grupo consta de especies que se alimentan de otros gasterópodos. El último grupo y tal vez el más interesante es el que se alimenta de peces (piscívoros), los cuales poseen venenos que inmovilizan a su presa rápidamente. ^[4]

Todas las especies del género *Conus* utilizan su veneno rico en péptidos para atrapar a su presa. Todos comparten el mismo mecanismo por el cual el veneno se inyecta a la presa. Este sistema complejo (Figura 1) está integrado por un ducto donde el veneno se produce y almacena, además de un bulbo que se cree sirve para transportar el veneno del ducto, y por último un diente modificado en forma de arpón el cual sirve a semejanza de una aguja hipodérmica con el que inyectan el veneno. ^[4]

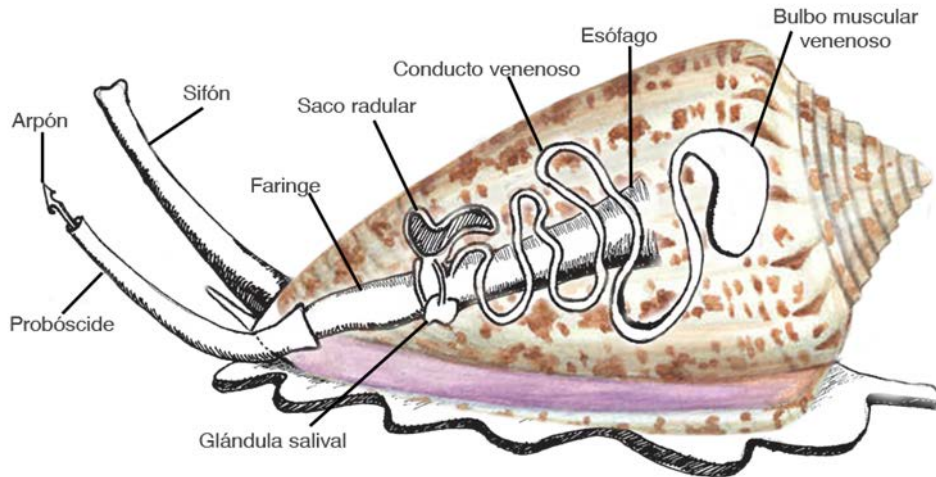


Figura 1.- Representación gráfica del aparato venenoso

El ser humano tiene conocimiento de la existencia de los cónidos desde hace más de 5000 años, porque sus conchas se usaron como ornamento. ^[2] La existencia de estos caracoles intrigó por muchos años a los pueblos de la antigüedad por su gran variedad y su picadura letal.

Por las características de su hábitat los caracoles como no suelen tener contacto con los humanos; sin embargo, se han reportado casos de picadura y muertes provocadas por estos animales ^[5]. La potencia letal de su veneno es el factor principal por el cual la comunidad científica se ha interesado en estudiar los componentes que lo forman.

La extracción del veneno de los caracoles siempre ha sido un gran problema debido al reducido número de especímenes que se pueden conseguir así como el poco rendimiento que se obtiene al extraer el veneno del animal. Las técnicas de separación actuales han facilitado la obtención de los componentes del veneno, abriendo nuevos horizontes en este campo.

1.2.- Conopéptidos

Los péptidos encontrados en el veneno de las especies del género *Conus* se dividen en dos categorías ^[4]: aquellos que son ricos en enlaces disulfuro, llamados comúnmente *conotoxinas*, y aquellos que poseen uno o ningún enlace disulfuro. Dentro de esta clasificación las conotoxinas han sido objeto de un intenso estudio debido a sus características peculiares.

1.2.1.- Conotoxinas

Las conotoxinas son un grupo relativamente pequeño de oligopéptidos de 14-46 aminoácidos que contienen un gran número de residuos de cisteínas, ej. C-C-C-C, donde el '-' representa uno o más aminoácidos, excepto cisteína. ^[6] Presentan un número variable de enlaces disulfuro, los cuales son importantes para su estabilidad conformacional así como para su actividad biológica. Su característica más importante es la especificidad que poseen. Son capaces de distinguir entre diferentes subtipos de canales, tanto iónicos como dependientes de ligando. Es por esto que han sido un importante objeto de estudio. En el 2004 se aprobó el primer fármaco (Ziconotide, Prialt[®]) derivado de uno de estos péptidos: la ω -conotoxina de *Conus magus*, el cual bloquea selectivamente el canal de calcio dependiente de voltaje de tipo N, inhibiendo la liberación de neurotransmisores, lo que provoca un efecto analgésico. ^[7,8]

La síntesis de las conotoxinas (Figura 2) se lleva a cabo en el ducto venenoso del animal y solo recientemente se ha logrado comprender más a fondo este proceso. Los genes codificantes para las conotoxinas son transcritos y solo los ARNm con una secuencia señal de retículo endoplásmico se unen a su membrana y son cotraducidos ahí. El ARNm se mantiene unido al retículo endoplásmico (RE) como parte de un poliribosoma. ^[9] Una vez completada la conotoxina, esta se internaliza completamente en el RE. Es aquí donde se forman los enlaces disulfuro entre los residuos de cisteínas, esta reacción es catalizada por la isomerasa disulfuro. ^[10] Posteriormente, el péptido es transportado al aparato de Golgi donde sufre algunas modificaciones postraduccionales, como la amidación del carboxilo terminal y la O-glicosilación. ^[11,12]

Aunque se estima que apenas se conoce el 1-2% de las conotoxinas, aquellas que han podido ser estudiadas presentan una gran diversidad, tanto en su secuencia de aminoácidos como de modificaciones postraduccionales (MP). Se cree que los fenómenos responsables de esto son: la gran diversidad en la familia de genes, los cuales están en evolución constante, y el gran repertorio de MP disponibles para estos péptidos. ^[13]

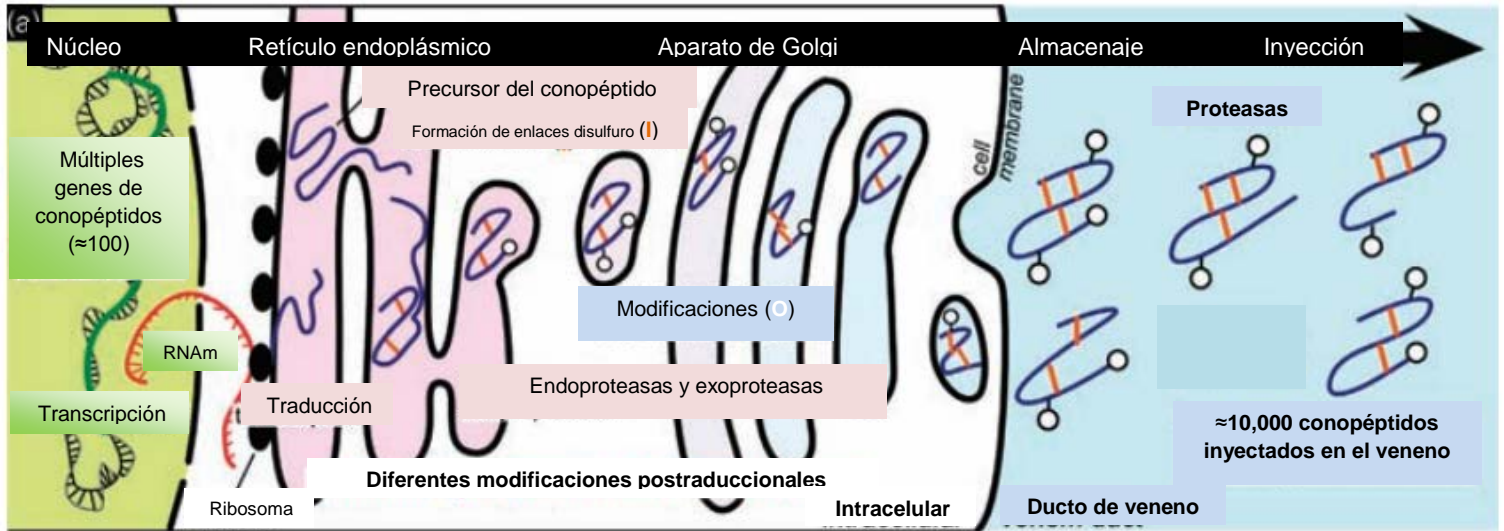


Figura 2. Síntesis y maduración de las conotoxinas. Modificado de Craik y Kass, 2014 ^[14]

Algunas de las MP en las conotoxinas son: la amidación del carboxilo terminal, hidroxilación, carboxilación, brominación, glicosilación y sulfatación. ^[15] (Figura 3).

La amidación del carboxilo terminal es una MP que se encuentra presente en la mayoría de las conotoxinas, especialmente en las α -conotoxinas. Se lleva a cabo en el *trans*-Golgi y en los gránulos secretorios. ^[11] Se ha sugerido que juega un papel importante en el plegamiento de la proteína así como en la formación de los enlaces disulfuro. ^[16]

La hidroxilación de un residuo de prolina a 4-hidroxiprolina es una de las MP más comunes, esta reacción es catalizada por la prolina hidroxilasa en el RE. ^[17] Se le representa con el código de tres letras *Hyp* o con la letra *O*. Tiene un papel importante en la actividad de la μ -conotoxina GIIIA pues se ha sugerido que interacciona con los canales de sodio. ^[18]

Una de las MP mejor comprendidas es la γ -carboxilación del ácido glutámico. Aproximadamente el 10% de las conotoxinas la presentan. Se utiliza el código *Gla* para representarla. Aunque la enzima responsable de esta MP, la glutamato carboxilasa, se encuentra tanto en el RE ^[19] como en el aparato de Golgi ^[20], estudios sugieren que esta MP se lleva a cabo en el RE. ^[21] Se cree que los residuos Glu están involucrados en la formación de hélices que unen iones Ca^{2+} . ^[22]

La *O* glicosilación de residuos de serina y treonina se lleva a cabo por glicosil transferasas ^[23] en el aparato de Golgi. ^[12] En general, la *O* glicosilación es una MP poco comprendida.

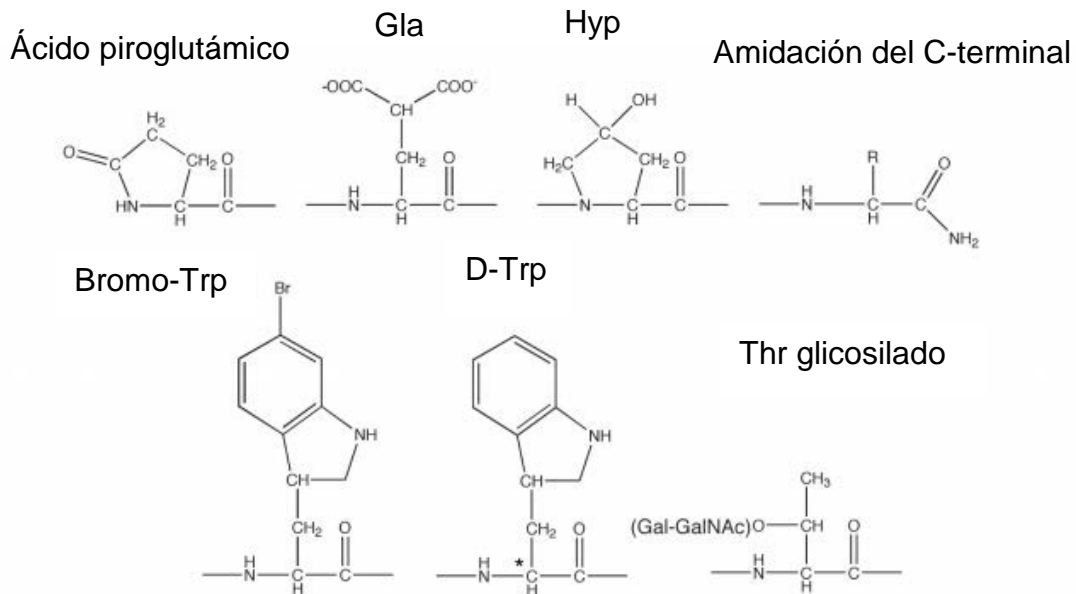


Figura 3. Representaciones esquemáticas de algunas modificaciones postraduccionales. Modificado de Marx *et al.*, 2006.

Tabla 1. Modificaciones postraduccionales y sus efectos en la actividad. Adaptado y modificado de Bingham *et al.* 2013. [24]

MPT	Toxina	Secuencia	Blanco molecular	Farmacología de la toxina con MPT	Farmacología de la toxina sin MPT	Referencia
Ácido piroglutámico, Thr glicosilado.	Contulakina-G	ZSEEGGSNATKKPYIL ↓ ZSEEGGSNA(gTr)KKPYIL	hNTR1 rNTR1 RNTR2 mNTR3	IC ₅₀ (nM) hNTR1: 23 rNTR1: 79 RNTR2: 170 mNTR3: 171	IC ₅₀ (nM) hNTR1: 960 rNTR1: 540 RNTR2: 730 mNTR3: 250	Craig, <i>et al.</i> (1990)
Hidroxilación, amidación.	μ-GIIIA	RDCCTPPKKCKDRQCKPQRCCA* ↓ RDCCTOOKKCKDRQCKOQRCCA*	Nav1.4	IC ₅₀ (nM) 870.3	IC ₅₀ (nM) 21.8	Lopez-Vera, <i>et al.</i> (2008)
Sulfatación, amidación.	α-AnIB	GGCCSHPACANNQDYC* ↓ GGCCSHPACANNQDYC*	α3β32 nAChR α7 nAChR	IC ₅₀ (nM) 0.28 (α3β32) 76 (α7)	IC ₅₀ (nM) 0.64 (α3β32) 836 (α7)	Loughnan, <i>et al.</i> (2004)
Hidroxilación, epimerización.	R11c	GOSFCKADEKOCKYHADCCNCLGGICKOSTSWIGCSTNVFLT ↓ GOSFCKADEKOCKYHADCCNCLGGICKOSTSWIGCSTNVFLT	ND	Convulsión en ratas (20 pmol)	Convulsión en ratas (100 pmol)	Buczek, <i>et al.</i> (2008)

Z ácido piroglutámico, **gTr** triptófano glicosilado, *NTR* receptor de neurotrofina, * amidación en el C-terminal, **O** hidroxiprolina, *Nav* canal de sodio activado por voltaje, **Y** sulfotirosina, *nAChR* receptor nicotínico, **L** epimerización de leucina, *IC₅₀* concentración inhibitoria media, *ND* no determinado.

Con base en su secuencia señal, las conotoxinas se clasifican en *superfamilias* (Figura 4). Los miembros de cada superfamilia conservan, generalmente, un patrón de residuos de cisteína específico así como una **secuencia señal** determinada. El péptido señal o secuencia señal está compuesto por 5-30 residuos y se localiza en el amino-terminal de la mayoría de las proteínas sintetizadas. Al final de esta secuencia se encuentra una serie específica de aminoácidos que son reconocidos por una peptidasa de señal, la cual escinde el péptido señal de la proteína. [25] Cada superfamilia incluye varias *familias farmacológicas*, las cuales están definidas por su blanco molecular y cómo las toxinas los afectan. [26]

Algunas de las superfamilias más estudiadas son:

La superfamilia A está compuesta por cuatro familias (α , αA , κ , ρ). La familia α fue la primera que se caracterizó [27], su patrón de cisteínas es CC-C-C. Las α conotoxinas presentan actividad sobre receptores nicotínicos (nAChR). [28] La

familia κ posee un arreglo de cisteínas distinto (C-C-C-C-C-C). Los miembros de esta familia, como el péptido SIVA de *Conus striatus*, son bloqueadores de canales de potasio dependientes de voltaje (Kv).^[29] La α -conotoxina, SII, de *Conus striatus* es la única conotoxina de la superfamilia A que tiene un patrón de cisteínas del tipo II (CCC-C-C-C), es un inhibidor de los nAChR.^[30] El péptido Pu14.1 presenta un patrón de cisteínas único (C-C-C-C), también es un inhibidor de los nAChR.^[31] Los blancos moleculares de esta superfamilia no se limitan a canales iónicos. La conotoxina p-TIA, la cual comparte el mismo patrón de cisteínas que la familia α , tiene como blanco a un receptor adrenérgico acoplado a proteínas G.^[32]

La superfamilia D fue descubierta gracias al estudio de tres conotoxinas aisladas del veneno de *Conus v exillum*: VxXXA, VxXXB y VxXXC. Ensayos electrofisiológicos demostraron que tienen actividad inhibitoria sobre los nAChRs ($\alpha 7$, $\beta 2$).^[33,34] Su patrón de cisteínas es: C-CC-C-CC-C-C-C-C.

La superfamilia J. Gracias al estudio de la conotoxina p114a fue descubierta esta superfamilia, su patrón de cisteínas es C-C-C-C. p114a presenta un efecto inhibitorio sobre dos subtipos de nAChRs ($\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$) y el canal de potasio Kv1.6. Es la primera conotoxina que muestra un efecto inhibitorio en nAChRs y en canales de potasio dependientes de voltaje.^[35]

La superfamilia M, sólo de tres de sus familias se conocen sus blancos moleculares. Las μ M-conotoxinas bloquean selectivamente canales de sodio dependientes de voltaje.^[36] Las κ M-conotoxinas, RIIIJ y RIIIK, aisladas del veneno de *Conus radiatus*, bloquean el canal de potasio dependiente de voltaje Kv1.2.^[37, 38,39] Estas familias presentan el mismo patrón de cisteínas: CC-C-C-CC.

La superfamilia O se divide en tres grupos: O1, O2 y O3. Los péptidos O1 comparten un patrón de cisteínas del tipo VI/VII (C-C-CC-C-C). Este grupo se compone de cuatro familias con actividad conocida. Las μ - y δ - conotoxinas, como la MrVIB, son bloqueadoras de canales de sodio activados por voltaje, haciéndolas candidatas para el desarrollo de nuevos analgésicos.^[40] Los péptidos de la familia

κ bloquean canales de potasio activados por voltaje, la toxina κ -PVIIA está siendo investigada como un potencial cardioprotector. ^[41] Las ω -conotoxinas son bloqueadoras de canales de calcio activados por voltaje, el péptido ω -MVIIA (Ziconotide) se utiliza como fármaco para el tratamiento del dolor crónico. ^[8] El grupo O2 también posee un patrón de cisteínas del tipo VI/VII, además del XV (C-C-CC-C-C-C-C). Su única familia, la Y, presenta actividad sobre los canales HCN de moluscos. ^[42,43] Del grupo O3 solo se ha caracterizado un péptido denominado “*Bromoslepper*”. Esta conotoxina de 33 residuos induce letargo y sueño en ratones, sin embargo, su blanco molecular es desconocido. ^[44]

La superfamilia L se definió por el estudio de la conotoxina Itl4a de *Conus literatus*. Este péptido mostró una secuencia señal única y un patrón de cisteínas del tipo XIV (C-C-C-C). Con base en la secuencia madura predecida para esta toxina se logró producir sintéticamente, este péptido sintético mostro actividad sobre un subtipo no identificado de un nAChR. ^[45]

La superfamilia S tiene un único patrón de cisteínas (C-C-C-C-C-C-C-C-C-C). La conotoxina GVIIIA, aislada de *Conus geo graphus*, fue la primera toxina de la superfamilia S en ser descubierta. Presenta actividad inhibitoria en el receptor de serotonina dependiente de ligando 5-HT3. ^[46] El péptido α S-RVIIIA de *Conus radiatus*, que posee la misma secuencia señal y patrón de cisteínas que GVIIA, tiene como blanco a los nAChRs neuromusculares. ^[47]

La superfamilia T se divide en dos familias. Los péptidos MrIA y MrIB de *Conus marmoreus* presentan un patrón de cisteínas tipo X (CC-C-C) e inhiben al transportador de noradrenalina. Una variante sintética de MrIA (Xen 2174) se encuentra en pruebas clínicas para el tratamiento del dolor postoperatorio. ^[48] Las conotoxinas con el patrón de cisteínas del tipo V (CC-CC) que pertenecen a esta superfamilia son conocidas por tener como blanco molecular a canales de calcio. ^[49]

La superfamilia V fue designada gracias al estudio del péptido Vi15a de *Conus virgo* y posee un arreglo de cisteínas del tipo XV (C-C-CC-C-C-C-C). ^[50] A la fecha

no existe información estructural o funcional de los miembros de esta superfamilia. Un estudio en *Conus f avidus* reveló una alta expresión y diversidad de conotoxinas V en esta especie. ^[51]

La superfamilia Y consiste de una sola conotoxina, ca17a, aislada del veneno de *Conus characteristicus*. Presenta un patrón de cisteínas único (C-C-CC-C-CC-C), la estructura y actividad de esta toxina son desconocidas. ^[52]

La superfamilia I fue descubierta por el estudio de cinco péptidos de *Conus radiatus* que provocan movimiento muscular incontrolado en anfibios ^[53], su patrón de cisteínas específico es: C-C-CC-CC-C-C. Los miembros de esta familia son conocidos por inhibir canales iónicos de las células nerviosas ^[54], aunque algunas han sido identificadas como inhibidores de ciertos canales de K⁺ específicos (Kv). La superfamilia I ha sido dividida en tres grupos: *I*₁, *I*₂, *I*₃, con base en la ausencia (*I*₂) o presencia (*I*₁) de la región propéptido entre la secuencia señal y la toxina madura (Figura 5). La familia *I*₃ fue separada de las otras familias debido a que presenta una secuencia de péptido señal diferente. ^[55]

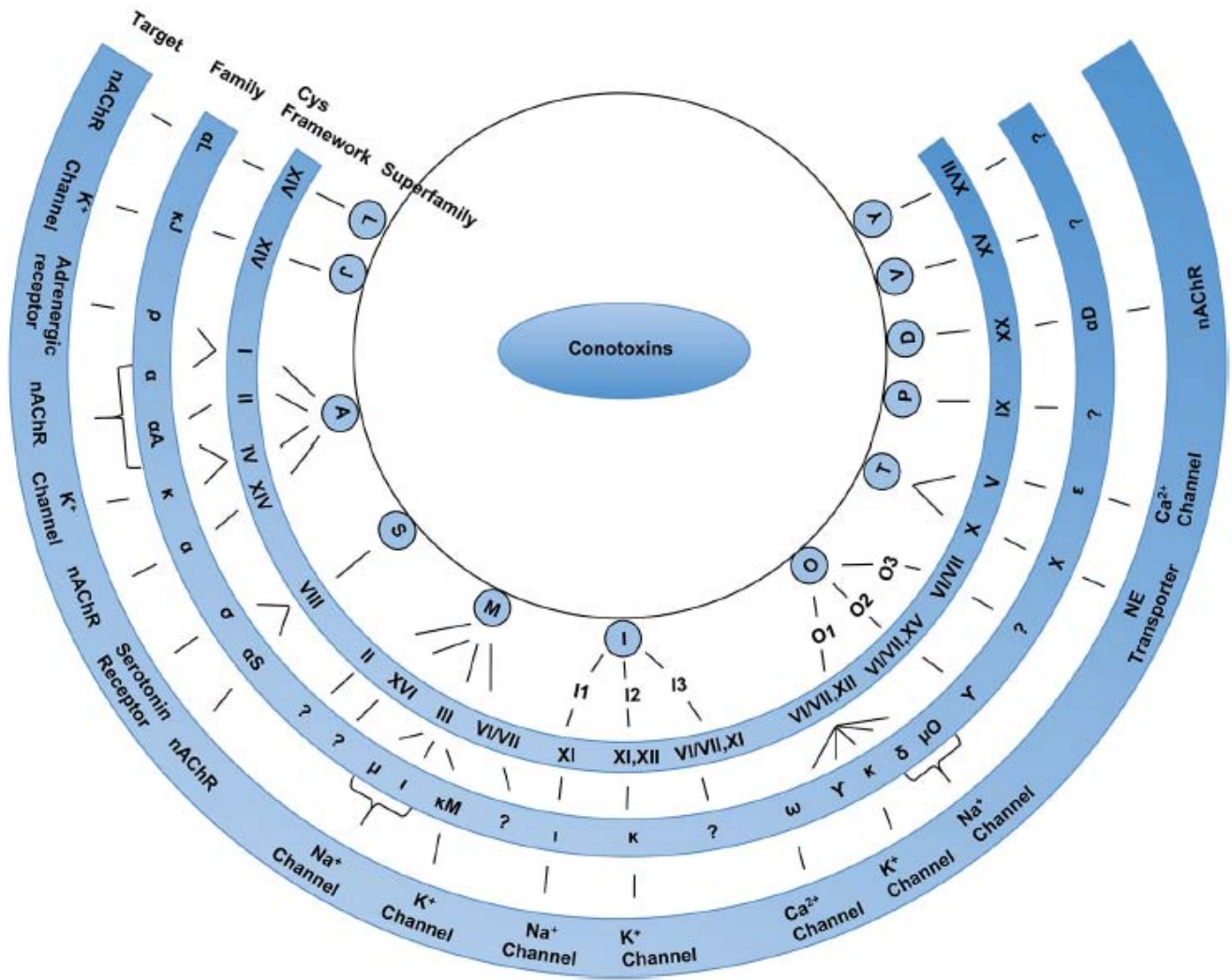


Figura 4. Clasificación típica de las conotoxinas. Tomado de Akondi et.al, 2014 [56]

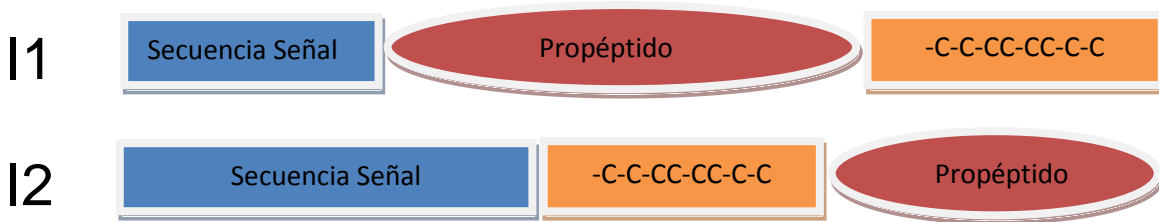


Figura 5. Representación gráfica de las regiones codificadas de las superfamilias I₁ e I₂, respectivamente. Modificado de Mondal et al. , 2006.

1.2.1.1.- Conotoxinas de la superfamilia I2

En la actualidad se han identificado 59 conotoxinas que pertenecen a la superfamilia I2 (Conoserver.com). Sin embargo, solo en tres de ellas se ha determinado su efecto en canales de potasio. La BtX, de *C. betulinus*, aumenta la actividad de los canales de potasio dependientes de voltaje y activados por calcio (BK) ^[57]. La Sr11a, de *C. spurius* bloquea los canales de potasio de la subfamilia Kv1 de mamíferos: Kv1.2 y Kv1.6. ^[58] Por último, la ViTx de *C. virgo* tiene un efecto bloqueador de los canales de potasio de mamífero de la subfamilia Kv1: Kv1.1 y Kv1.3 ^[59]. Es importante mencionar que está reportado que el canal Kv1.1 no llega a la membrana plasmática salvo como heteromultímero, ^[60] por lo que este resultado es dudoso. La producción recombinante de ViTx permitiría estudiar detalladamente su efecto sobre estos canales.

Una de las características propuestas para que una toxina de origen peptídico interaccione con un canal de potasio activado por voltaje es la presencia de una diada, compuesta por un residuo de **lisina** (aminoácido con carga positiva) y un **residuo hidrofóbico** (Y o F). ^[61] Sin embargo, esta diada no se encuentra presente en ViTx y Sr11a. En el caso de ViTx, por estudios de modelaje tridimensional teórico, se concluyó que los residuos de Arg-26 y Arg-31 son importantes para bloquear el paso de iones potasio a través del poro de los canales Kv1.1 y Kv1.3 ^[62] Por otra parte, los **residuos de arginina** de la Sr11a podrían ser los responsables de su actividad.

Como se mencionó anteriormente, las modificaciones postraduccionales pueden ser importantes para la actividad de las conotoxinas. La Sr11a presenta su carboxilo terminal amidado y dos gamma-carboxiglutamatos en las posiciones 9 y 10. Será importante estudiar el efecto de esta conotoxina sobre los canales Kv1 sin modificaciones postraduccionales. Sorprendentemente, el péptido ViTx, es la única conotoxina de la superfamilia I2, con actividad estudiada, que no presenta modificaciones.

1.2.2.- Biotecnología de las conotoxinas

Las conotoxinas se obtienen en muy pocas cantidades. Esto limita su disponibilidad para la investigación y aplicaciones médicas. En la actualidad existen dos métodos para sortear este inconveniente: la síntesis química y la **producción recombinante** (Figura 6).

La síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) es el método más utilizado para la producción de grandes cantidades de conotoxinas, sobre todo porque es posible sintetizar las toxinas con sus modificaciones postraduccionales. Sin embargo, los costos elevados que conlleva este proceso lo hacen inviable en algunas ocasiones. ^[63]

La *síntesis recombinante* en sistemas de expresión bacterianos y eucariontes es una opción atractiva en relación a los costos de producción. Sin embargo, la maquinaria de estos sistemas heterólogos, impide la expresión de conotoxinas con modificaciones.

La bacteria gram-negativa *Escherichia coli* es el hospedero más estudiado y mejor caracterizado para la producción de proteínas recombinantes, debido a los bajos costos de cultivo y rápido crecimiento. ^[64,65] Sin embargo, posee grandes limitantes cuando se requiere producir pequeños péptidos ricos en enlaces disulfuro como las conotoxinas. La formación de agregados insolubles de proteína, denominados cuerpos de inclusión, son un problema común al utilizar *E. coli* como sistema de expresión, además, los péptidos pequeños se degradan rápidamente por proteasas. El citoplasma celular es un ambiente reductor que impide la formación de enlaces disulfuro, incrementando la posibilidad de formación de cuerpos de inclusión. ^[66]

La levadura metilotrófica *Pichia pastoris* es una alternativa a la utilización de sistemas bacterianos. Su ambiente intracelular similar al de las células de mamíferos y la secreción de la proteína al medio circundante son importantes ventajas que ofrece este sistema de expresión. Sus costos de producción son similares a los de *E. coli*. ^[67]

Las células de insecto también han sido utilizadas para producir péptidos ricos en enlaces disulfuro mediante el sistema del baculovirus, como lo son las células S2 de *Drosophila melanogaster*. Sin embargo, su elevado costo hace que sean una opción inviable para la producción de proteínas recombinantes. [68]

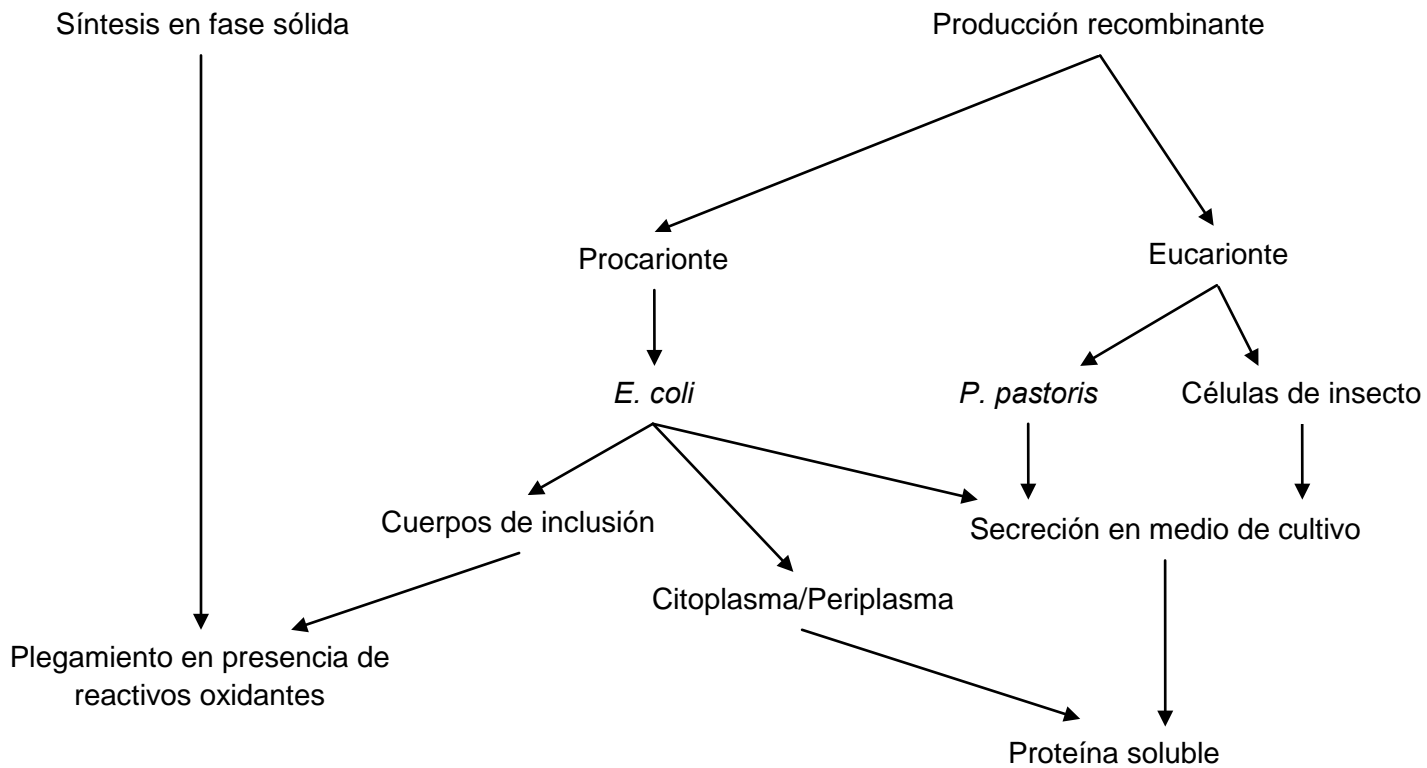


Figura 6. Estrategias para la producción de conotoxinas. Modificado de Becker y Terlau, 2008. [69]

1.3.- Tecnología recombinante

Al conjunto de técnicas que permiten formar ADN artificial a partir de secuencias pertenecientes a diferentes organismos se le denomina *tecnología recombinante*. Al introducir *ADN recombinante* en un organismo (transformación) este adquiere nuevas características.

Una molécula que puede transportar ADN de un organismo a otro se denomina **vector de clonación**. Los vectores poseen cuatro características importantes: son autorreplicables, poseen diferentes sitios de restricción, llevan un marcador de selección (generalmente genes que confieren resistencia a antibióticos), lo que permite diferenciar a las células que contienen el vector, y por último, su fácil extracción y purificación de la célula hospedera.

Existen diferentes tipos de vectores de clonación, los más comunes son: plásmidos, cósmidos y fagos (Tabla 2).^[70]

Vector	Fundamento	Tamaño máximo del inserto	Principales aplicaciones
Plásmido	Plásmidos multicopia de origen bacteriano	≤ 10 kb	Subclonaje y posterior manipulación, clonación de cADN y ensayos de expresión
Fago	Bacteriófago λ	5-20 kb	Clonación de ADN genómico, clonación de cADN, bibliotecas de cADN
Cósmido	Plásmido unido al sitio cos del bacteriófago λ	35-45 kb	Construcción de librerías genómicas

Tabla 2.- Vectores de clonación y sus principales características. Modificado de Mullis 1990.

Los plásmidos son fragmentos circulares de ADN de doble cadena. Estos se encuentran de forma natural en procariontes y eucariontes, y tienen la capacidad de autoreplicarse.

A un plásmido que ha sido modificado para servir como vector de clonación (Figura 7) se le ha agregado un marcador de selección así como una región llamada sitio múltiple de clonación o '*polylinker*'; esta región posee varios sitios de corte para endonucleasas. Al cortar con estas enzimas se crean espacios para introducir una molécula de ADN exógeno (inserto). Posteriormente, el inserto es unido al vector mediante una reacción de ligación. ^[70]

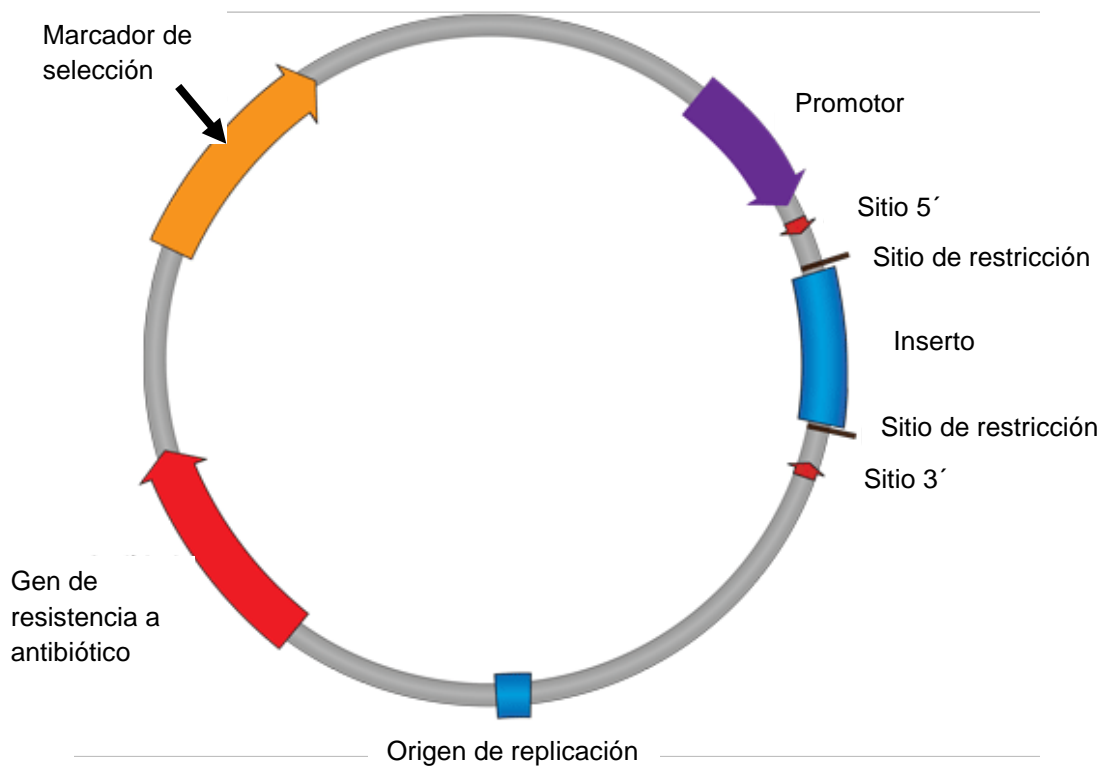


Figura 7. Estructura de un vector de clonación

Como se mencionó anteriormente, la transformación consiste en introducir ADN exógeno a un organismo huésped. Para que las células puedan aceptar al nuevo ADN es necesario hacer su membrana citoplasmática permeable al medio. Esto se logra mediante la incubación de las células en soluciones de calcio concentradas o por medio de la electroporación. Las células cuyas membranas se han permeabilizado se denominan **competentes**. Posteriormente, se somete a las células a un choque térmico con la finalidad de introducir el ADN. Las cepas utilizadas para este tipo de procedimientos han sido modificadas genéticamente para ser deficientes de enzimas que degraden el ADN exógeno, permitiendo así su transformación.^[70]

La transformación es un fenómeno que ocurre de manera natural en algunas bacterias. Fue descrita por primera vez en la bacteria Gram-positiva *Streptococcus pneumoniae*. Se le considera un proceso parasexual, es decir, únicamente está involucrado el ADN exógeno y el organismo que lo capta, y mediante recombinación homóloga, el huésped adquiere nuevas características que le permiten adaptarse a su medio. Hasta el 2014 se han identificado 82 organismos *transformables*.^[71]

Para poder transformar a *E. coli* es necesario hacer competentes a las células. En la actualidad existen muchos protocolos de transformación para esta bacteria.^[72]

1.3.1.- Proteínas recombinantes

Cuando la secuencia que codifica para una proteína se encuentra como *inserto* dentro de un vector de clonación (Figura 8), al producto se le llama **proteína recombinante**. Esta la produce el hospedero (denominado sistema heterólogo) el cuál se transformó con el ADN recombinante.^[73] La primera proteína recombinante producida fue la somatotatina, utilizando *E. coli* como sistema heterólogo.^[74]

La tecnología de las proteínas recombinantes ha revolucionado tanto el área científica como la industrial. Gracias a la relativa facilidad de su producción y

purificación, además de que es posible producirlas a gran escala, muchas proteínas de interés médico e industrial se han podido comercializar.

1.3.1.1.- Elementos de un vector de expresión para proteínas recombinantes

1.3.1.1.1.- Replicón

Los elementos autorreplicables, como los plásmidos, contienen un replicón. Este consiste en un origen de replicación (**ori**) asociado con elementos de control en *cis*. El número de copias de un plásmido es un factor importante a tomar en cuenta. No siempre un número elevado de copias tiene correlación directa con una alta expresión de la proteína recombinante. Un elevado número de copias puede ocasionar una gran carga metabólica para el hospedero, disminuyendo su crecimiento y rendimiento, además de inestabilizar el plásmido. ^[73]

1.3.1.1.2.- Promotor

A la secuencia de ADN que se encarga de controlar el inicio de la transcripción se le denomina promotor. El promotor *lac*, que es un componente clave del operón lactosa ^[75], es el más estudiado y por lo tanto, es utilizado en muchos vectores de clonación. El fundamento de este promotor es que en ausencia de lactosa la transcripción se mantiene reprimida. Cuando la lactosa se encuentra presente en el medio, y no hay otra fuente de energía (ej. glucosa) disponible, se inicia la transcripción. En el operón lactosa el gen que se transcribe da origen a una proteína que procesa la lactosa.

Aunque es posible utilizar la lactosa como inductor de una proteína recombinante, es más común que se use su análogo, el isopropil β -D-1 tiogalactopiranosido (IPTG) ya que este no se degrada por las enzimas. ^[76]

1.3.1.1.3.- Marcador de selección

Para impedir el crecimiento de células que no contengan el plásmido, se agrega al vector de clonación un marcador de selección. Por lo general, este viene en forma de un gen que confiere resistencia a un antibiótico. El marcador de selección más utilizado es el gen de resistencia a ampicilina *bla* cuyo producto es la enzima β -

lactamasa, la cual inactiva el anillo β -lactámico de la ampicilina. Esta enzima se secreta de forma continua al medio periplásmico, degradando todo el antibiótico en un par de horas.

Cuando el uso de antibióticos es inviable, se pueden utilizar otras opciones, por ejemplo, se priva a las células de un gen importante sin el cual no pueden crecer, y se inserta ese gen en el vector de clonación. ^[73]

1.3.1.1.4.- Etiquetas de afinidad

Cuando es necesario obtener la proteína recombinante en su forma activa y soluble, surgen varios aspectos a tomar en cuenta. El primero, poder identificar la proteína. Segundo, obtenerla en su forma soluble y, por último, poderla separar y purificar de todos los demás componentes de la célula.

La expresión de una secuencia pequeña de aminoácidos (**etiqueta peptídica**) (Tabla 3) o de un polipéptido (**proteína a carreadora**) (Tabla 4) *in tándem* con la proteína recombinante, facilitan su identificación y purificación. ^[77]

Por su tamaño reducido, las etiquetas peptídicas son poco propensas a interferir de alguna forma cuando se fusionan con otras proteínas. Aunque algunas veces pueden provocar efectos negativos en la estructura terciaria o en la actividad de la proteína. ^[78,79,80]

Estas etiquetas pueden ser reconocidas por ciertos anticuerpos, lo que permiten la identificación de la proteína mediante Western Blot. Además, también hacen posible su purificación por afinidad. Por ejemplo, las proteínas unidas a una etiqueta de histidinas (**Poly-His**), pueden recuperarse por medio de una cromatografía de afinidad con una columna de níquel.

Por otra parte, utilizar proteínas acarreadoras puede mejorar la solubilidad de la proteína recombinante. ^[81]

Etiqueta peptídica	Residuos/Tamaño (kDa)	Ligando/Matriz	Condiciones de purificación
Poly-Arg	5/0.80	Resina de intercambio catiónico	Gradiente lineal de NaCl (0-400 mM)
Poly-His	6/0.84	Resina de afinidad	20-250 mM de Imidazol/bajo PH
FLAG	8/1.01	Anticuerpo Anti-FLAG	2-5 mM EDTA
Strep-tag II	8/1.06	Estreptavidina especialmente diseñada (Strep-Tactin)	2-25 mM destiobiotina
c-myc	11/1.20	Anticuerpo anti-myc	Bajo PH
S-tag	15/1.75	Proteína S (RNAsa A, residuos 21-124)	3 M de tiocianato de guanidina; 0.2 M buffer citrato de potasio, PH 2 o 3 M MgCl ₂

Tabla 3.- Algunas etiquetas peptídicas y sus principales características. Modificado de Rosano y Ceccarelli 2014.

Algunas de las proteínas acarreadoras más utilizadas son: La proteína de unión a maltosa (MBP)^[82], “*N-utilization substance protein A*” (NusA)^[83], Tiorredoxina (Trx)^[84], Glutación S-transferasa (GST)^[85], Ubiquitina^[86] y SUMO (*small ubiquitin-like modifier*)^[87].

NusA, MBP y Trx incrementan la solubilidad del péptido recombinante en mayor grado. Sin embargo, por su gran tamaño, pueden ocasionar errores en la estimación de la solubilidad.^[88]

Recientemente, la proteína Fh8 de *Fasciola hepatica* demostró ser tan efectiva o inclusive mejor que otras proteínas acarreadoras en términos de incremento de la solubilidad. Además, tiene la ventaja de unirse a columnas de fenil-sefarosa. Por lo tanto, Fh8 actúa como etiqueta de afinidad y proteína acarreadora.^[89]

Proteína acarreadora	Residuos/Tamaño (kDa)	Ligando/Matriz	Condiciones de purificación	Incremento de la solubilidad
Fh8	69/8.0	Unión dependiente de Ca ²⁺ a fenil-Sefarosa	10 mM EDTA	ND
Trx	109/11.7	Agarosa con 4-amino fenilarseno	5-1000 mM b-βmercaptoetanol	+++
SUMO	100/12.0	Se debe de agregar una etiqueta de afinidad	-	++++
BRT17	153/14.7	-	Precipitación en presencia de 25-75 mM Ca ²⁺	ND
GST	211/26.0	Glutación-agarosa	10-20 mM glutatión reducido	+
HaloTag7	300/34.0	Cloroalcano ligado a agarosa	Un sitio de corte de proteasa es agregado	ND
MBP	396/42.5	Amilosa entrecruzada	10 mM maltosa	+++
ELPs	550/47.0	-	Precipitación por cambios de temperatura y/o por altas concentraciones de NaCl (> 5M)	ND
NusA	495/54.8	Se debe de agregar una etiqueta de afinidad	-	++

Tabla 4.- Algunas proteínas acarreadoras ^[82,83,84,85,86,87] y sus principales características. El incremento de la solubilidad está basado en los resultados de *Bird (Bird 2011)* ^[90]; ND, no determinado en ese estudio. Modificado de Rosano y Ceccarelli 2014.

1.3.1.1.5.- Eliminación de las etiquetas de afinidad

Ya que tanto las etiquetas peptídicas como las proteínas acarreadoras pueden afectar la estructura o actividad de la proteína recombinante, es necesario separarlos de ésta. Las etiquetas pueden eliminarse mediante digestión enzimática o por escisión química.

Si se desea separar por medio de una **digestión enzimática**, el vector de expresión debe contener la secuencia que codifica para el sitio de corte de la enzima *río abajo* del gen que codifica para la etiqueta. Algunos ejemplos de

enzimas utilizadas para este fin son: Enteroquinasa, trombina, factor Xa y la proteasa del virus del tabaco (TEV).^[91,92]

La elección de la enzima a utilizar depende de varios factores: especificidad, costo, disponibilidad y el número de aminoácidos residuales después del corte.

Dentro de las opciones disponibles la TEV, es la enzima más común debido a su alta especificidad, su fácil producción a gran escala y a que solo deja dos residuos (serina y glicina) después de la digestión.^[93,94,95]

La eliminación con un reactivo químico tiene varias ventajas: son fáciles de eliminar después de que la reacción se llevó a cabo y su costo es menor que el de las enzimas; sin embargo, las condiciones de reacción son violentas y pueden causar modificaciones indeseables en la proteína.^[96] El reactivo más utilizado para este fin es el bromuro de cianógeno (CNBr). El CNBr *corta* justamente después de una metionina, por lo que este aminoácido debe de estar presente entre la proteína y la etiqueta. Además, la proteína no debe de presentar metioninas en su estructura.^[97]

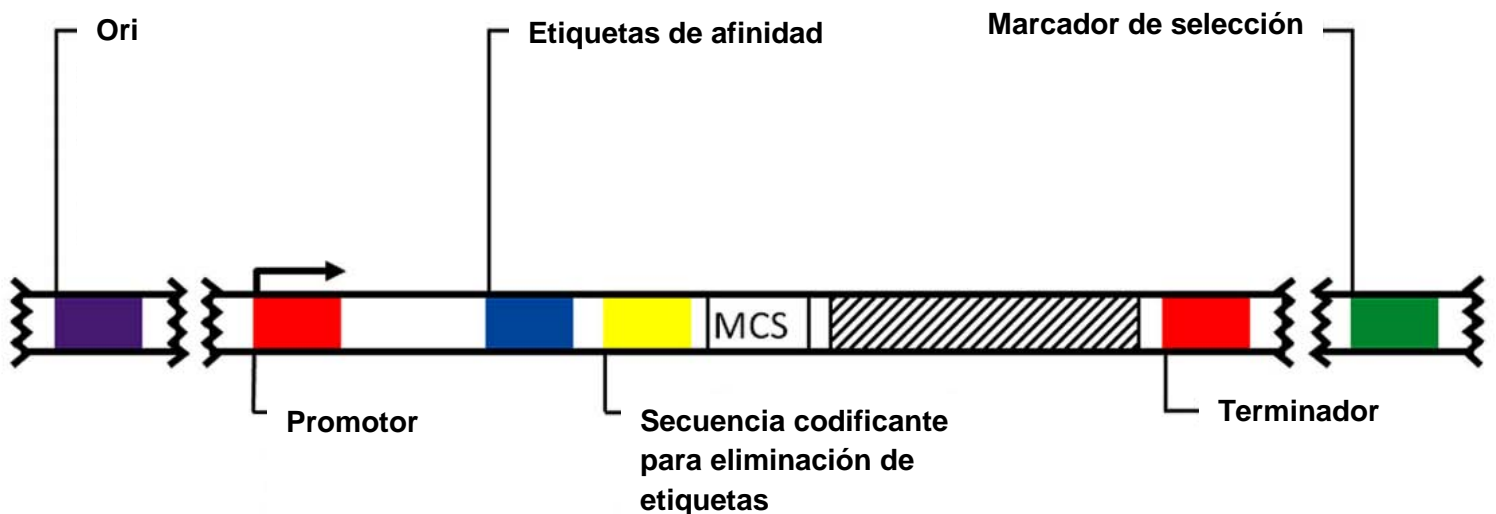


Figura 8. Estructura típica de un vector de expresión. MCS, sitio múltiple de clonación. Rectángulo rayado: secuencia codificante de la proteína recombinante. Modificado de Rosano y Ceccaralli 2014.

1.3.2.2.- Problemas en la producción de proteínas recombinantes

Sin duda alguna, la tecnología de las proteínas recombinantes ha revolucionado el área científica. La época en que grandes cantidades de tejidos animales o vegetales se necesitaban para aislar una proteína está llegando a su fin.

En teoría, la metodología a seguir para obtener una proteína recombinante es lineal: se clona el gen de interés en un vector de expresión, se transforman las células hospederas, se induce la expresión y la proteína está lista para purificarse y caracterizarse. Sin embargo, en la práctica, surgen muchas limitantes y dificultades que entorpecen la obtención del producto deseado.

Muchos estudios se han llevado a cabo para tratar de solucionar estas adversidades y algunas estrategias han resultado efectivas. A pesar de esto, no existe una regla o solución definitiva para la producción de proteínas recombinantes. Aunque se haya diseñado con detenimiento una estrategia para producir cierta proteína, el resultado es incierto. A veces la proteína se obtiene en muy bajas cantidades, se forman cuerpos de inclusión, es inactiva desde el punto de vista biológico, o simplemente, no se produce.

1.3.2.2.1.- Baja o nula expresión

Hay ocasiones en que la misma proteína recombinante resulta tóxica para el hospedero. La introducción de un gen exógeno, y su posterior transcripción y traducción, supone una fuerte carga metabólica para la célula y algunas veces esta carga resulta fatal. Es importante monitorear el crecimiento de los cultivos antes y después de la inducción para comprobar si la proteína resulta tóxica. Algunas cepas de *E. coli* como la C41 poseen mutaciones (*lacUV5*) que previenen la muerte celular asociada a proteínas tóxicas. ^[98].

La secreción de la proteína al periplasma o al medio extracelular también es una opción viable para evitar la muerte celular debido a su toxicidad. ^[99,100]

Si el vector de clonación posee codones que rara vez son utilizados por *E. coli* (<1%) es probable que se incorporen aminoácidos erróneos o que la síntesis de la proteína se trunque. ^[101]

1.3.2.2.2.- Formación de cuerpos de inclusión

Cuando una proteína recombinante se produce en *E. coli*, existen muchas condiciones en su microambiente que difieren con las que normalmente hay en el organismo que la sintetiza de forma natural; pH, osmolaridad, potencial redox, cofactores y mecanismos de plegamiento. Además, cuando una proteína se sintetiza en grandes cantidades, los segmentos hidrofóbicos presentes en el polipéptido son propensos a interactuar entre ellos. Todos estos factores ocasionan la inestabilidad y la agregación de la proteína. ^[102,103] Estos agregados proteicos se denominan *cuerpos de inclusión* (CI). Los CI son el resultado de un desequilibrio entre la agregación de la proteína y su solubilización. Por lo tanto, si se desea obtener la proteína recombinante en su forma soluble es necesario evitar la formación de CI.

Introducir una proteína acarreadora es una manera de evitar la formación de CI. Como se describió en la introducción, estas aumentan la solubilidad de la proteína, facilitando su purificación. El vector *pHLTEV* posee los aminoácidos 1-85 del dominio *lipoil* de la enzima dihidrolipoil acetiltransferasa de *Bacillus stearothermophilus*, el cual actúa como proteína acarreadora aumentando la solubilidad de la proteína. ^[104,105]

La formación correcta de enlaces disulfuro en una proteína es vital para su plegamiento y actividad biológica, por ejemplo, un patrón erróneo puede originar una estructura terciaria incorrecta y promover la aparición de CI. El citoplasma de *E. coli*, por su naturaleza reductora, evita la formación de enlaces disulfuro. ^[106] Una opción viable para sortear este inconveniente es dirigir el péptido sintetizado al periplasma de la bacteria, el cual provee un ambiente oxidante que facilita la formación de estos enlaces. ^[107]

Algunas cepas comerciales como Origami (Novagen) y SHuffle (NEB) poseen citoplasmas con un ambiente oxidante que promueven la formación de enlaces disulfuro.

Las chaperonas son la piedra angular del control de calidad de las proteínas ya que ayudan a los polipéptidos recién formados a tomar su estructura correcta. ^[108]. Existen varias estrategias que aprovechan esta capacidad que tienen las chaperonas para promover el plegamiento correcto de las proteínas y evitar la formación de CI. Se puede inducir la expresión natural de chaperonas mediante la adición de alcohol bencílico o por choque térmico. ^[109] La co-expresión de chaperonas junto con la proteína recombinante también es una estrategia que ha funcionado. ^[110,111,112]

Ya que la sobreexpresión proteica promueve la formación de CI, otra estrategia utilizada para evitarlos ha sido la disminución de la concentración en la célula de la proteína de interés. Esto se logra reduciendo la temperatura de incubación. Las temperaturas bajas disminuyen la agregación de las proteínas, al contrario de las altas temperaturas que las promueven debido a que favorecen las interacciones hidrofóbicas. ^[113,114,115]

1.3.2.- Toxinas recombinantes

Las toxinas son una fuente valiosa de compuestos, principalmente de origen proteico. Aunque su papel principal en la naturaleza es de depredación y defensa, se han utilizado para el estudio de las estructuras moleculares de los canales iónicos y algunas se usan como agentes terapéuticos eficaces. Es por ello que su estudio y la comprensión de cómo actúan es muy importante. ^[116]

Varios tipos de organismos son capaces de producir toxinas, desde las bacterias hasta los mamíferos (Figura 9). Sin embargo, existe una clara diferencia en como los seres vivos utilizan sus toxinas. Un organismo pasivamente venenoso es aquel que produce toxinas pero no tiene mecanismos especializados para introducirlas en otro ser vivo. Es decir, solo producen daño si son tocados o ingeridos. Por otra parte, los organismos activamente venenosos poseen refinados sistemas (colmillos, aguijones, arpones) que les permiten introducir su veneno en su presa o en algún depredador. ^[117]

Dentro de la gama de seres ponzoñosos los que pertenecen al reino animal han sido objeto de estudio, principalmente por su constante contacto con el ser humano. Aunque en la gran mayoría de los estudios realizados con venenos animales, éstos fueron obtenidos de su fuente natural, no siempre es viable esta opción. Los recursos que se gastan recolectando, cuidando y manteniendo a estos animales son elevados y muchas veces se obtiene muy poco veneno de cada individuo, haciendo necesario la obtención de varios especímenes. La localización geográfica es también una limitante importante, muchos de estos animales viven en zonas de difícil acceso.

La *tecnología recombinante* es una opción viable para la producción y el posterior estudio de estas toxinas. Aunque tiene sus propias limitantes, la capacidad de producir grandes cantidades de la proteína de interés y su costo relativamente bajo la colocan como una opción atractiva.

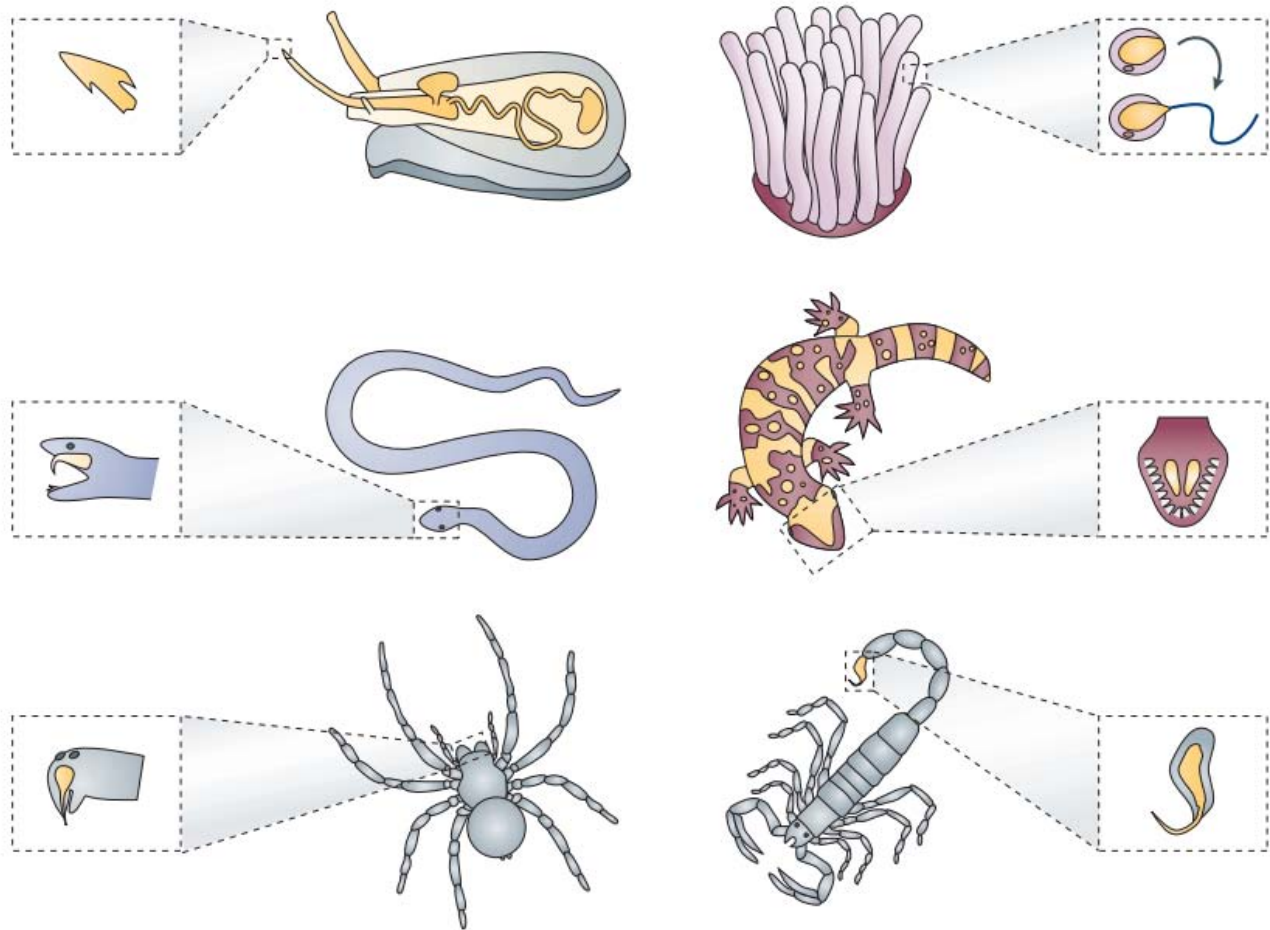


Figura 9. Caracol cono, anémona, serpiente, monstruo de Gila, araña y escorpión. Todos ellos poseen toxinas con potencial terapéutico. Su aparato de envenenamiento está resaltado. Tomado de Lewis y García. 2003.

1.3.2.1.- Conotoxinas recombinantes

Hasta la fecha, pocas conotoxinas se han producido de forma recombinante. [118,119,120,121,122,123,124] En el año 2003 se publicó el primer estudio donde se expresó exitosamente una conotoxina (MVIIA); además, se demostró su actividad analgésica. [118]

La mayoría de las conotoxinas recombinantes que se han logrado expresar pertenecen a la superfamilia más estudiada, la O. En todos los estudios se evaluó la actividad biológica de las toxinas (Tabla 5).

Conotoxina	Tipo de estudio	Entidad biológica	Efecto	Referencia
MVIIA	Modelo animal ('hot-plate')	Ratón	Analgésico	Zhan, <i>et al.</i> (2003)
Lt7a	Electrofisiológico ('patch-clamp')	Neuronas (rata)	Bloquea canales de Na ⁺	Pi, <i>et al.</i> (2006)
TxVIA	Modelo animal	<i>M. domestica</i> y larva de <i>M. brassicae</i>	Insecticida	Bruce, <i>et al.</i> (2011)
PrIIIE	Electrofisiológico ('voltage clamp')	nAChR expresados en ovocitos de <i>Xenopus</i>	Bloqueador	Hernandez-Cuebas, <i>et al.</i> (2011)
Vn2	Modelo animal	Larva de <i>G. mellonella</i>	Insecticida	Spieza, <i>et al.</i> (2012)
GeXIVAWT	Ensayo colorimétrico	Células de <i>Spodoptera frugiperda</i>	Inhibe el crecimiento celular de forma dosis-dependiente	Gao, <i>et al.</i> (2012)
MrVIB	Modelo animal (varios)	Ratón	Analgésico	Gao, <i>et al.</i> (2013)

Tabla 5.- Conotoxinas recombinantes expresadas en *E. coli* y su actividad

Las estrategias para la expresión y purificación de las conotoxinas variaron en todos los casos. La mayoría fueron expresadas junto con una proteína acarreadora para incrementar su solubilidad. (Tabla 6).

Conotoxina	Superfamilia	Patrón de cisteínas	Vector de clonación	Cepa (<i>E. coli</i>)	Proteína acarreadora	Enzima	Referencia
MVIIA	O1	C-C-CC-C-C	pET-22b	BL21 (DE3)	pelB	-	Zhan, <i>et al.</i> (2003)
Lt7a	O	C-C-CC-C-C	PTRX	BL21 (DE3)	Tiorredoxina	Proteasa Factor Xa	Pi, <i>et al.</i> (2006)
TxVIA	O1	C-C-CC-C-C	pET32a	BL21 Origami	Tiorredoxina	Enteroquinasa	Bruce, <i>et al.</i> (2011)
PrIIIE	M4	CC-C-C-CC	PETHSUL	Rosetta gami B	SUMO	dtuD1	Hernandez-Cuebas, <i>et al.</i> (2011)
Vn2	O1	C-C-CC-C-C	pET14B	BL21 (DE3)	GST	Proteasa Factor Xa	Spieza, <i>et al.</i> (2012)
GeXIVAWT	O1	C-C-C-C-C	PET-22b	BL21 (DE3)	pelB	-	Gao, <i>et al.</i> (2012)
MrVIB	O1	C-C-CC-C-C	pET-22b	BL21 (DE3)	Tiorredoxina	-	Gao, <i>et al.</i> (2013)

Tabla 6.- Conotoxinas recombinantes. Características y estrategias de expresión.

2.- Antecedentes

2.1.- Conotoxina ViTx

La ViTx fue aislada de *Conus virgo*, está formada por una cadena de 35 aminoácidos entrecruzados por cuatro enlaces disulfuro. No presenta modificaciones postraduccionales. Esta toxina inhibe a los canales de K^+ activados por voltaje de vertebrados, específicamente a los canales Kv1.1 y Kv1.3. [59]

SRCFPPGIYCTPYLPCCWGICCGTCRNVCHLRI

Secuencia ViTx

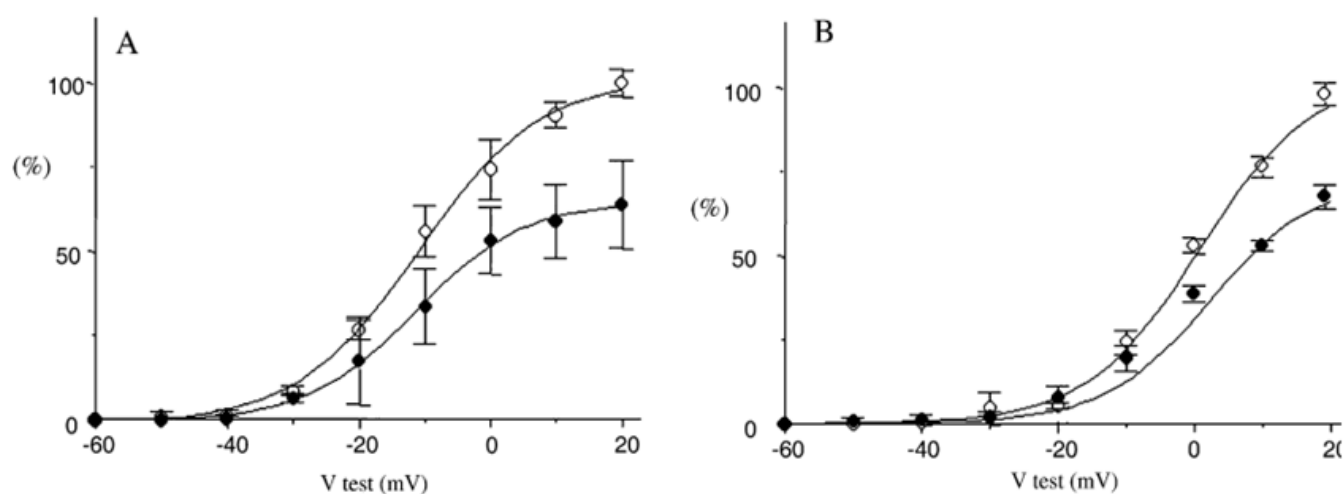


Figura 10.- Porcentaje de bloqueo de los canales Kv1.1 (A) y Kv1.3 (B) por la toxina ViTx sintética. La presencia de $0.8 \mu\text{M}$ de ViTx (\bullet) redujo las corrientes del Kv1.1 (66%) y Kv1.3 (63%) con respecto al control (\circ). Tomado de Kaufenstein *et al.* 2003.

2.2.- Conotoxina Sr11a

La Sr11a fue aislada de *Conus purius*, tiene 32 residuos de aminoácidos entrecruzados por cuatro enlaces disulfuro y presenta modificaciones postraduccionales en sus dos glutamatos, así como la amidación de la prolina del C-terminal. Presenta actividad sobre los canales de potasio Kv 1.2 y Kv 1.6 [58]

El vector pHLTEV ha sido utilizado con éxito por nuestro equipo de investigación para producir de forma recombinante la conotoxina Sr11a con un rendimiento de **4.5 mg/L**. El vector pET22b (+) también se utilizó para tratar de producir esta conotoxina. Este vector tiene incluida la secuencia PelB que dirige el péptido a periplasma para promover la formación de los enlaces disulfuro. Se transformaron las cepas de *E. coli* BL21, Tunner y C41, sin embargo, la producción de esta toxina no se logró mediante esta estrategia.^[125] El equipo de investigación también modeló su estructura (Figura 11) y probó la actividad de la toxina Sr11a en canales de potasio (Kv) expresados en ovocitos de *Xenopus* (Figura 12).^[58]

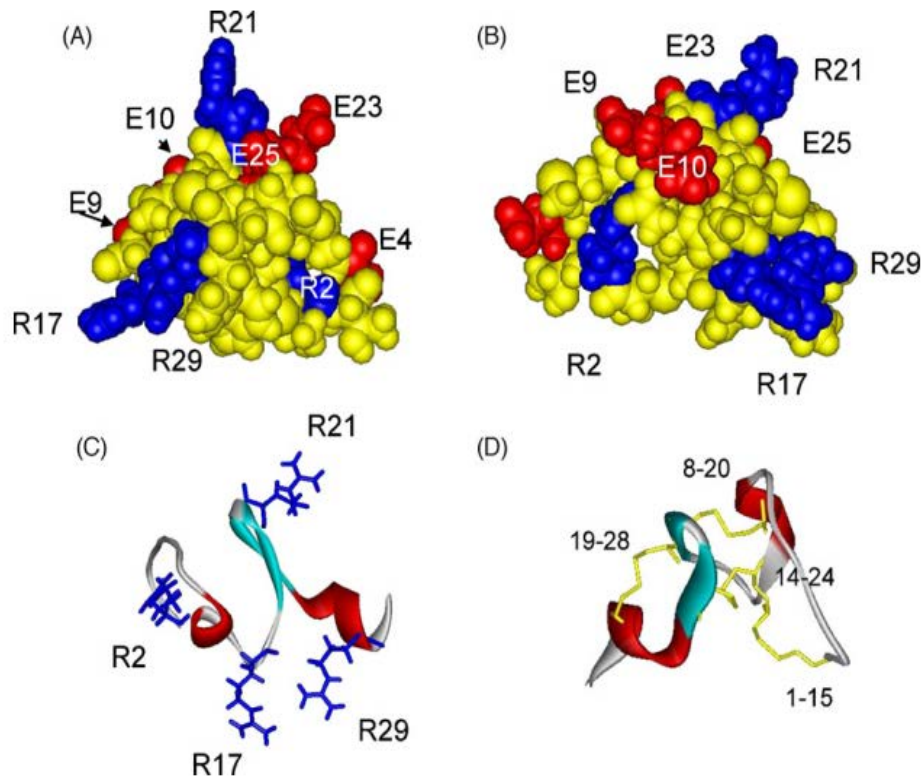


Figura 11. Modelo estructural del péptido sr11a: (A) Esquema CPK. Los residuos cargados positivamente y negativamente están coloreados de azul y rojo, respectivamente. E9 y E10 corresponden a la MPT Glu. (B) Vista previa rotada 180° verticalmente. (C) α -hélices representadas en rojo (11-13-26-29), Hojas- β representadas en azul claro (19-20-24-25); *loops* y *random coils* están representados en blanco. Los residuos de arginina están representados en color azul. (D) Los enlaces disulfuro están coloreados de amarillo y los números indican los aminoácidos implicados en su formación. Tomado de M.B. Aguilar *et al.*, 2010.

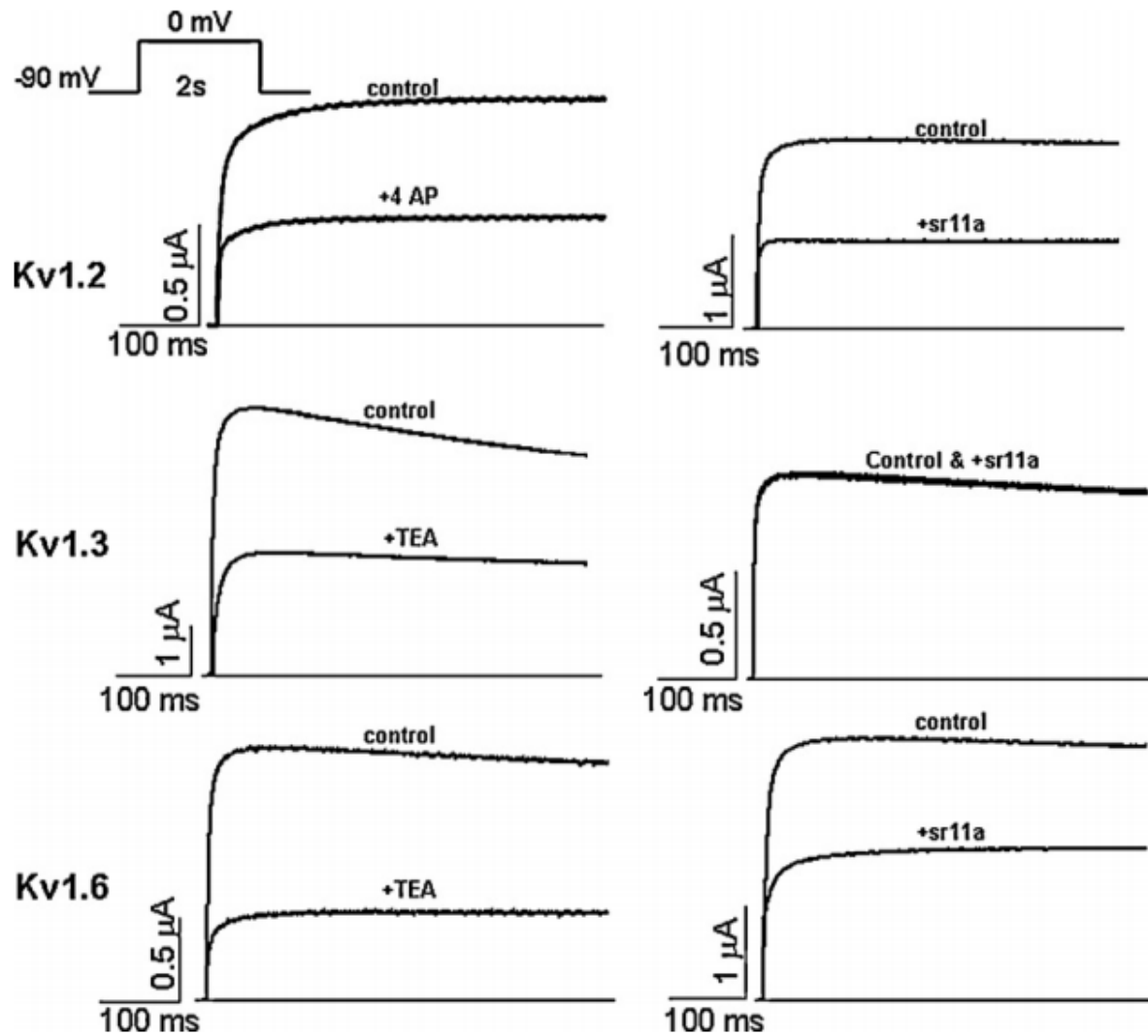


Figura 12. Efecto de la conotoxina Sr11a sobre la corrientes de los canales de potasio Kv 1.2, Kv 1.3 y Kv 1.6. La concentración de péptido sr11a fue de 640 nM. Se logró la completa inhibición de la corriente a los 14 minutos para Kv 1.2 y a los 23 minutos para Kv 1.6. AP 4-aminopiridina, TEA tetraetilamonio. Tomado de M.B. Aguilar *et al.*, 2010.

3.- Justificación

Las conotoxinas pueden extraerse en muy bajas cantidades de los conos lo que limita su uso para la investigación. Actualmente, se utilizan dos métodos principales para la obtención de estos péptidos: la síntesis química y la producción recombinante en sistemas de expresión heterólogos.

Actualmente solo a tres conotoxinas de la superfamilia I₂ se les ha evaluado su actividad en canales de potasio: ViTx (Kv1.1, Kv1.3)^[59], BtX (BK)^[57] y Sr11a (Kv1.2, Kv1.6)^[58].

Hasta la fecha **la producción recombinante de ViTx no se ha llevado a cabo**, por lo que su expresión en sistemas heterólogos nos permitiría desarrollar e implementar técnicas para su correcta expresión, entender mejor su naturaleza y mecanismo de acción.

4.- Objetivos

General

Producir la conotoxina ViTx mediante técnicas de ADN recombinante a través del sistema de expresión heterólogo de *Escherichia coli*.

Particulares

- Diseñar el vector de expresión pHLTEV-ViTx
- Identificar y evaluar la expresión de la proteína de fusión (His-Lipo-ViTx)

5.- Materiales y Métodos

5.1.- Expresión de la proteína de fusión

Se utilizó la cepa BL21 (*fhuA2 [lon] ompT gal [dcm] ΔhsdS*) de *E. coli* para expresar la proteína de fusión. Se transformó con 2 µg del vector pHLTEV-ViTx. Se sembraron en cajas Petri con medio LB (Luria-Bertani) con y sin ampicilina (1µ/1ml). Las transformadas se crecieron en 35 ml de medio TY2X (Tryptona 16 gr/L, extracto de levadura 10 gr/l, NaCl 5gr/l) suplementado con ampicilina (1µ/1ml). Se dejó creciendo toda la noche. Se inoculó 1L de medio TY2X (Amp 1µl/mL) con el cultivo (3% v/v). Cuando se llegó a una densidad óptica de 0.5 (600nm) se indujo la expresión de la proteína de fusión con 0.5 mM de IPTG. Se dejó expresando por 9h, posteriormente se recolectó el pellet y se resuspendió en solución A (50 mM Tris pH 7.4, 500 mM NaCl, 10mM Imidazol). Se sonicó con pulsos de 15 segundos, 30 segundos de descanso, potencia 5.5, durante 5 minutos (Misonix Sonicator 3000). Se centrifugó a 10,400 g durante una hora para separar las fracciones soluble e insoluble.

5.2.- Purificación de la proteína de fusión y separación de la toxina ViTx

La fracción soluble se pasó por una columna de afinidad de Níquel (HisTrap™ HP, 5 ml). Antes de utilizar la columna, todas las soluciones y la muestra se pasaron por un filtro de 22 µm. Se siguió el protocolo indicado en el manual de uso.

- 1.- Se lavó con 15 ml de agua destilada
- 2.- Se equilibró con 20 ml de solución A
- 3.- Se pasó la muestra a un flujo aproximado de 1ml por minuto
- 4.- Se lavó la columna con 20 ml de solución A
- 5.- Se eluyó la muestra con 20 ml de solución B (50 mM Tris PH 7.4, 500mM NaCl, 250 mM Imidazol)

6.- Se lavó la columna con 15 ml de agua destilada

7.- Se lavó con 10 ml de etanol para almacenar la columna.

Se calculó la concentración de la proteína mediante la absorbancia (Espectrofotómetro *Jenway 6105*) a 220 nm utilizando la ley de Lambert-Beer.

$$C = \frac{A}{\varepsilon * l}$$

Dónde:

C = Concentración ε = Coeficiente de extinción molar (calculado en ExPASy)

A= Absorbancia l = Longitud de la celda

La muestra se concentró con un centrífugo (Amicon[®] Ultra 15 ml) a 4600 g por 20 minutos. El concentrado se dializó toda la noche en un regulador para eliminar el imidazol (50 mM Tris pH 7.4, 500mM NaCl).

El concentrado ya dializado se puso a reaccionar con 1.65 mg de enzima TEV, se dejó la reacción en agitación leve y a temperatura ambiente durante 48 h.

Se realizó una segunda cromatografía con la columna de níquel para separar la toxina del resto de la proteína de fusión. Se dializó la fracción que corresponde a la toxina libre en agua desionizada durante 24 h para eliminar las sales.

5.3.- Identificación de la proteína de fusión y ViTx

Las fracciones correspondientes a la proteína de fusión, el fragmento Lipoil-His y la ViTx se analizaron por medio de un gel de Tricina-SDS-PAGE. ^[126] Posteriormente se confirmó la masa de esas tres fracciones mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Microflex Bruker Daltonics). Se utilizaron como matrices el ácido sinapínico y el ácido α -ciano-4-hidroxicinamínico.

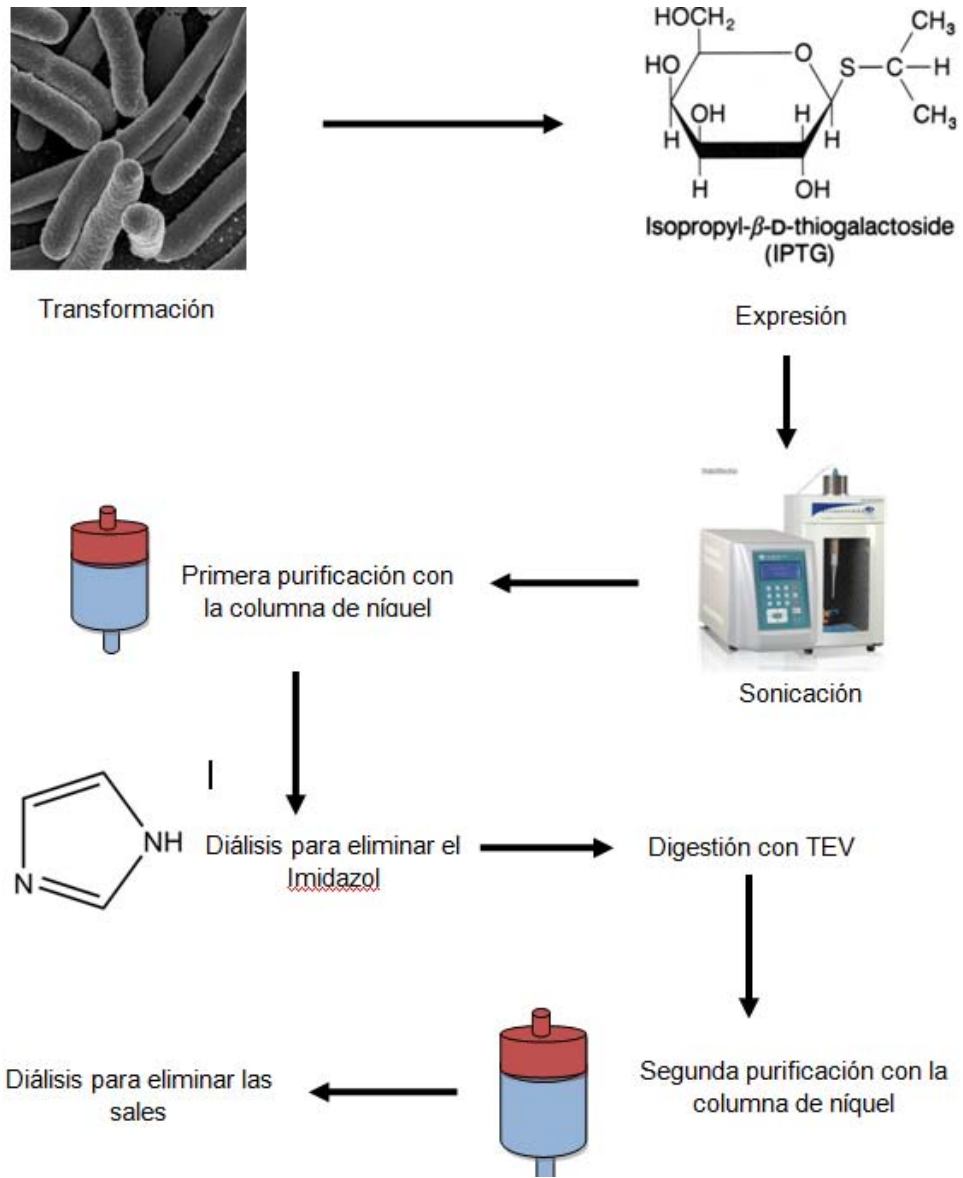


Figura 15.- Metodología general para la expresión y purificación de la conotoxina ViTx

6.- Resultados

6.1.- Diseño del vector de expresión *pHLTEV-ViTx*

Se diseñó el vector **pHLTEV-ViTx** (Figura 13) que contiene la secuencia de la toxina madura entre los sitios de corte *BamHI* y *HindIII*. El vector fue sintetizado por Epoch Life Science®. La secuencia presenta modificados los codones preferenciales para *E. coli*.

Al principio de la secuencia se adicionó un residuo de **metionina** para poder tratarla con **bromuro de cianógeno** y así facilitar la purificación de la toxina madura. La **proteína de fusión** incluye: Una cola de histidinas (Poli-His), los aminoácidos 1-85 del dominio *lipoil* de la enzima dihidrolipoil acetiltransferasa de *Bacillus stearotherophilus*, el sitio de corte de la proteasa TEV y la conotoxina ViTx. El peso esperado de la proteína de fusión es de **15, 584.7 Da** (Figura 14).

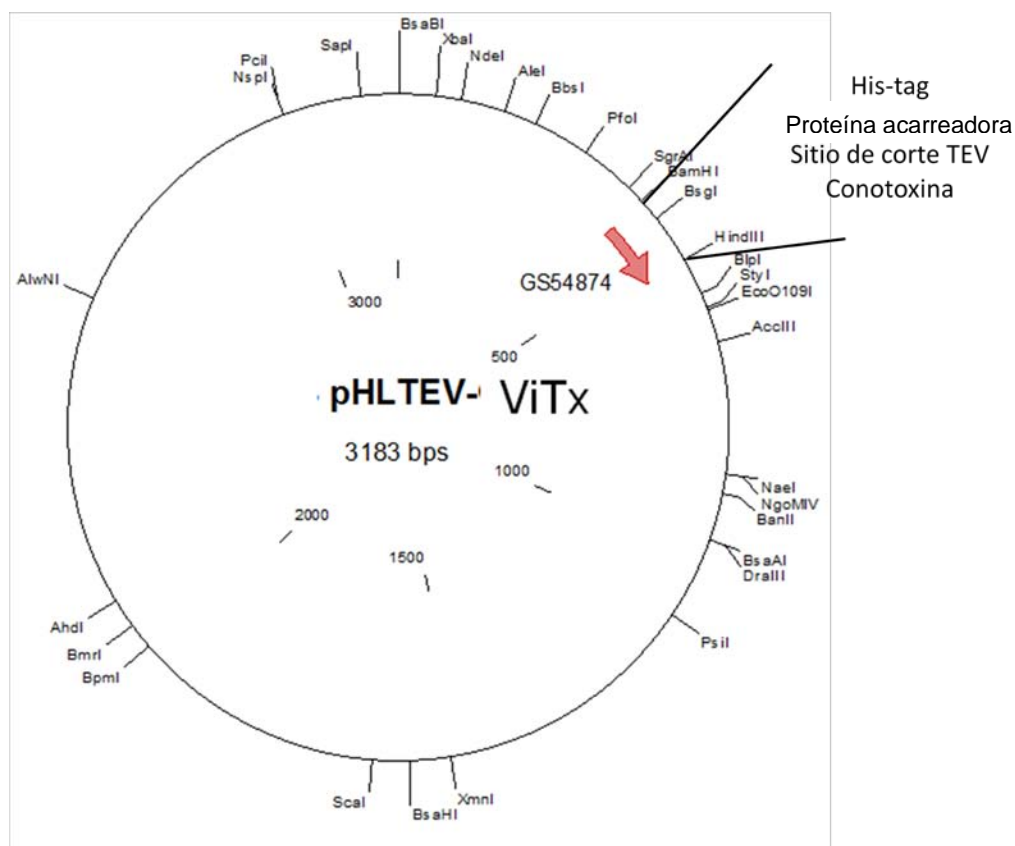


Figura 13.- Vector de expresión *pHLTEV-ViTx*

Analizando más a fondo la secuencia donde se transcribe la conotoxina se puede observar: La parte en **gris** es la secuencia de reconocimiento de TEV, los últimos dos codones codifican para glutamina y glicina, por lo que la enzima cortaría entre estos dos aminoácidos, dejando la glicina pegada a la toxina. La parte que se encuentra en **amarillo** es el sitio de corte BamHI, entonces se tendrían dos aminoácidos más: glicina y serina. La parte en **morado** corresponde a una fracción de la proteína acarreadora. Contando la metionina, sumarían 4 residuos: **glicina-glicina-serina-metionina**. Son justamente estos aminoácidos los que se busca eliminar con el tratamiento de bromuro de cianógeno.

La parte en **verde** codifica para la conotoxina ViTx.

```

ggttatgaaaacatgacgaccggcagcgacaccggcgaaaacctgtacttccag
ggtggatccatgtctcgttgtttccaccgggtatctactgcactccatatctg
ccgtgttgctggggtatctgctgcgccacctgccgtaacgtgtgtcacctgcgt
atctaa
  
```

GGSMSRCFPPGIYCTPYLPCCWGICCGTCRNVCHLRI

Secuencia ViTx + 4 a.a.

Peso molecular: 4,068 Da

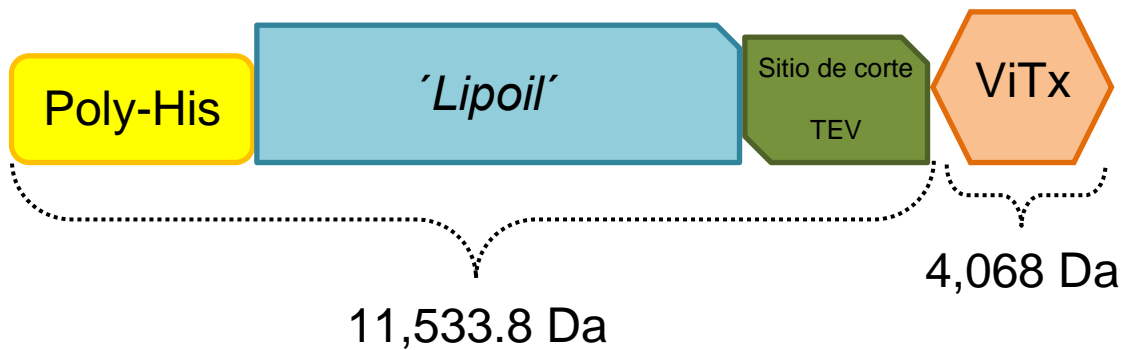


Figura 14.- Estructura de la proteína de fusión

6.2.- Identificación y evaluación de la expresión de la proteína de fusión

Utilizando la cepa BL21 de *E. coli* se expresó la proteína de fusión la cual se compone de dos fracciones principales: el fragmento Lipoil-His y la conotoxina ViTx (Tabla 7). Se estimó que la cantidad de proteína de fusión obtenida fue de 12.96 mg por litro de cultivo. En el gel de la figura 16 se observa el nivel de expresión de la proteína de fusión y del fragmento Lipoil-His. ViTx no es observable.

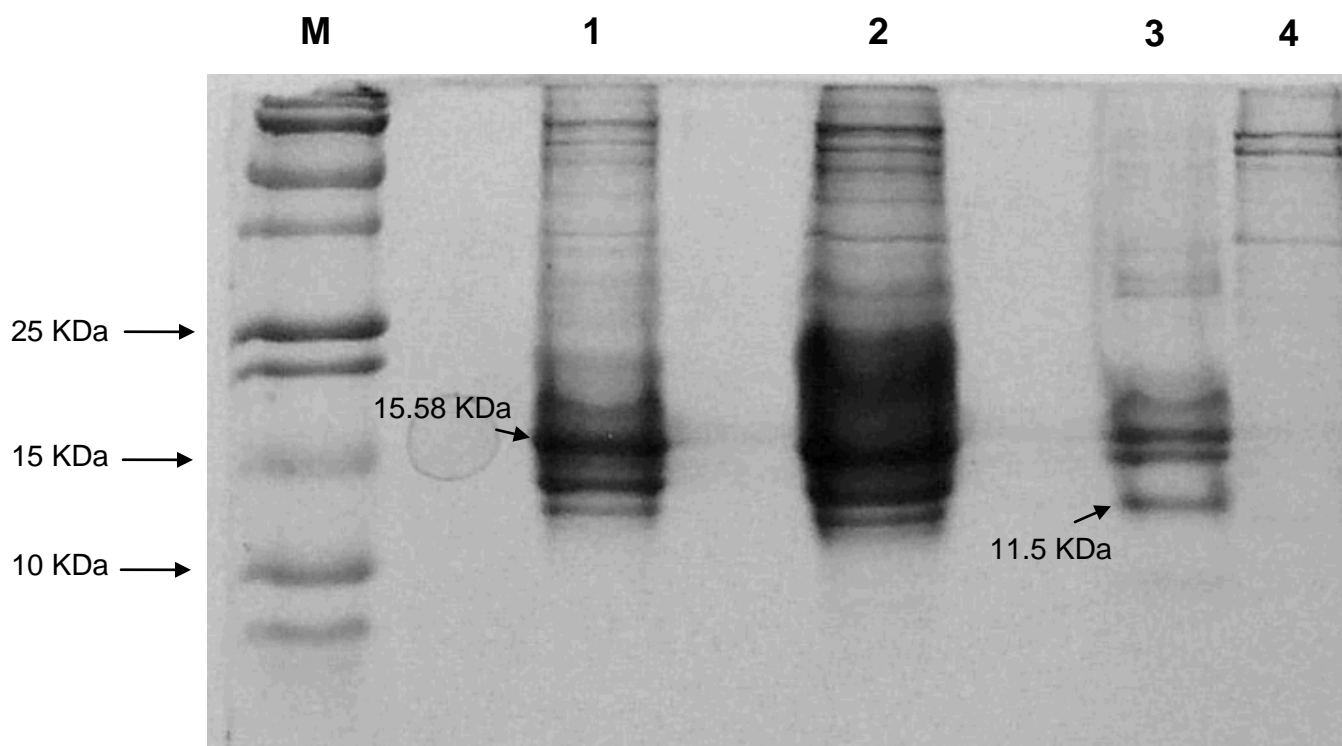


Figura 16.- Análisis en Tricina-SDS-PAGE. **Carril M**, Marcador de peso molecular; **carril 1**, Proteína de fusión (15.5 KDa); **carril 2**, Concentrado de la proteína de fusión; **carril 3**, Fragmento Lipoil-His (11.5 KDa); **carril 4**, Fracción ViTx (4 KDa).

Muestra	Peso molecular teórico
Proteína de fusión	15, 584.7 Da
Fragmento Lipoil-His	11, 533.8 Da
Conotoxina ViTx	4,068 Da

Tabla 7.- Pesos moleculares teóricos de la proteína de fusión, fragmento Lipoil-His y ViTx.

Las fracciones correspondientes a la proteína de fusión (Figura 17), el fragmento Lipoil-His (Figura 18) y ViTx (Figura 19) se mandaron al Instituto de Química para ser analizadas mediante la técnica de espectrometría de masas (MALDI-TOF).

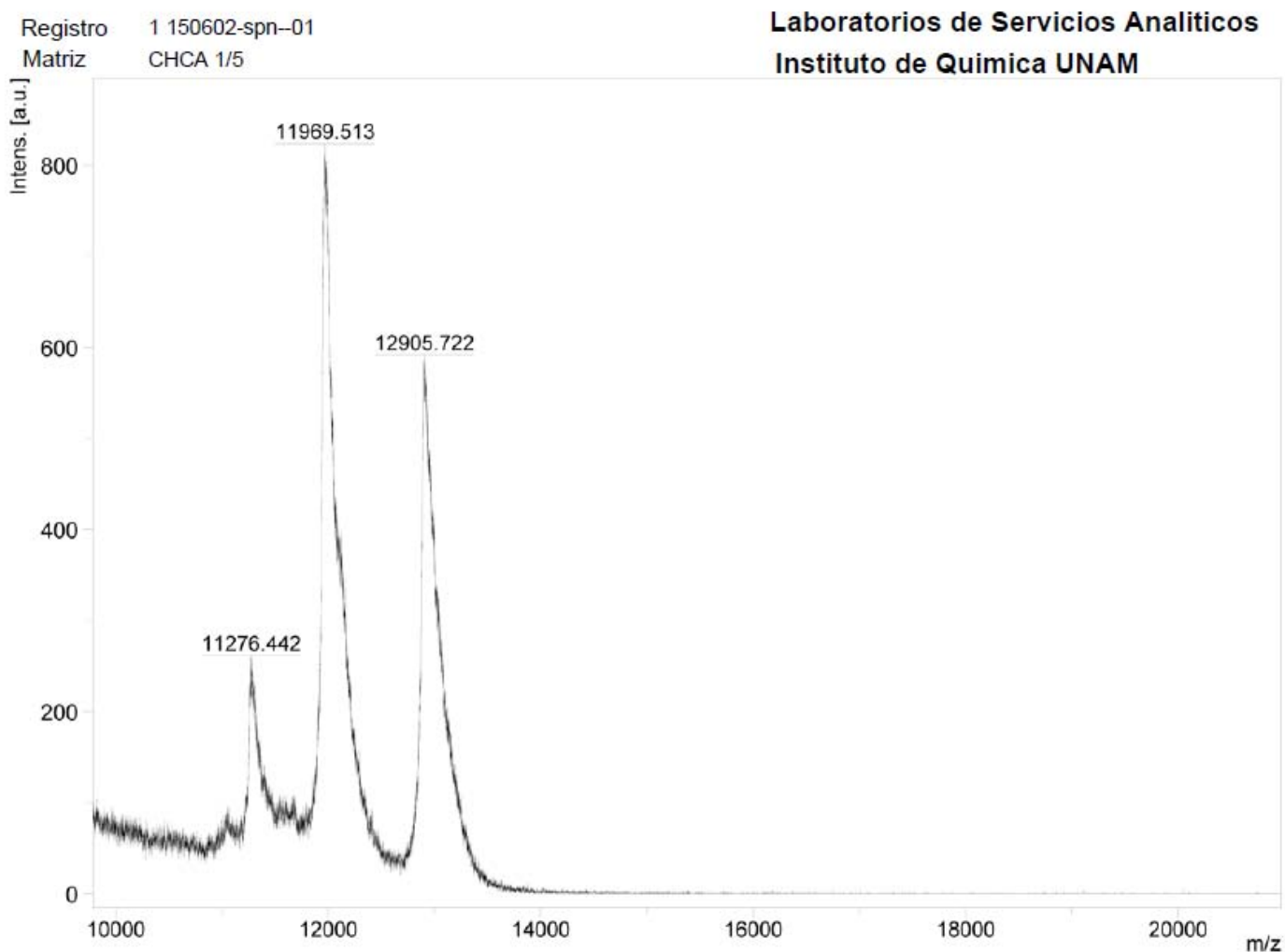


Figura 17. Análisis MALDI-TOF de la fracción correspondiente a la proteína de fusión.

Registro 2 150602-spn-02
Matriz CHCA 1/5

Laboratorios de Servicios Analíticos
Instituto de Química UNAM

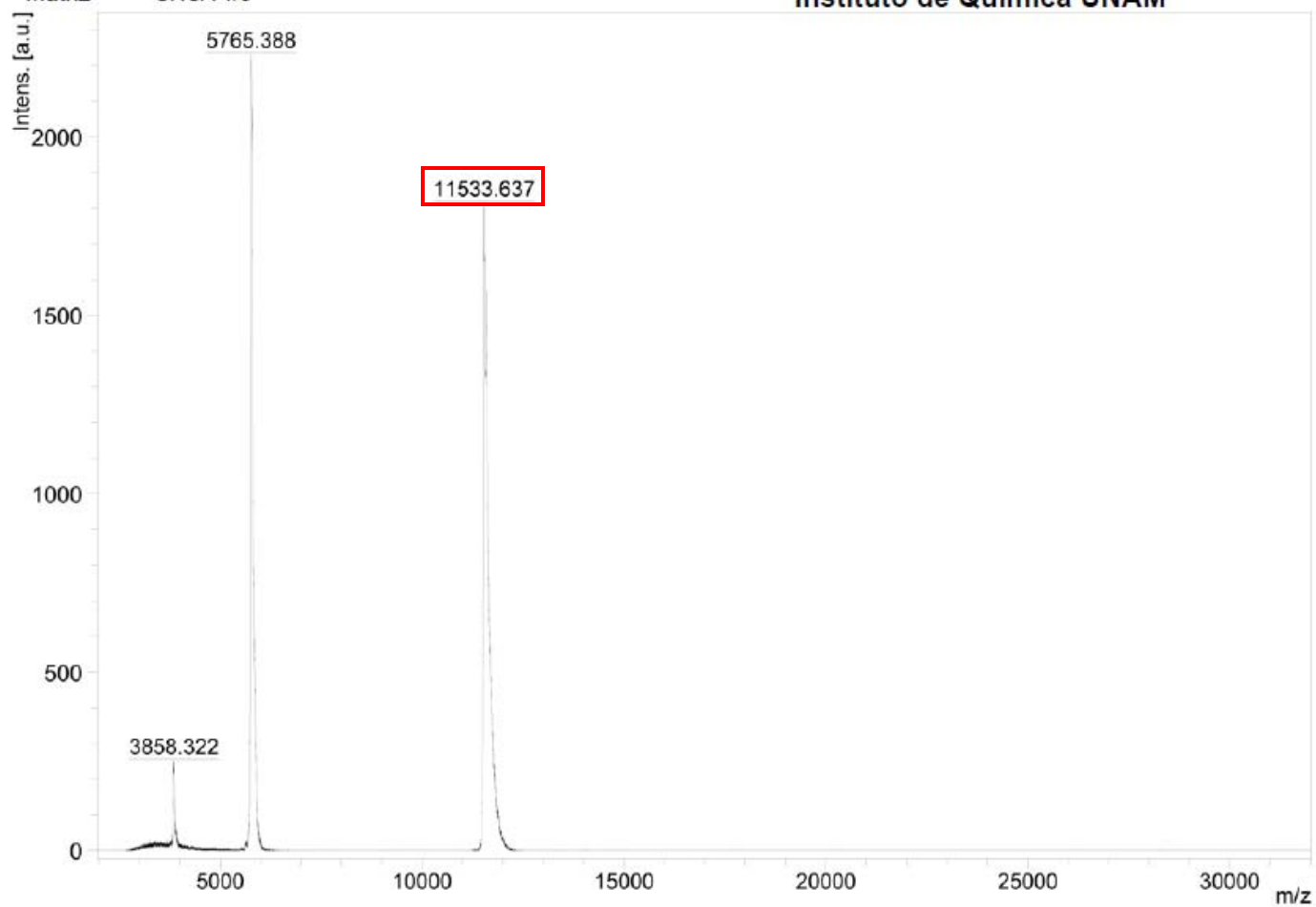


Figura 18. Análisis MALDI-TOF de la fracción correspondiente al fragmento Lipoil-His.

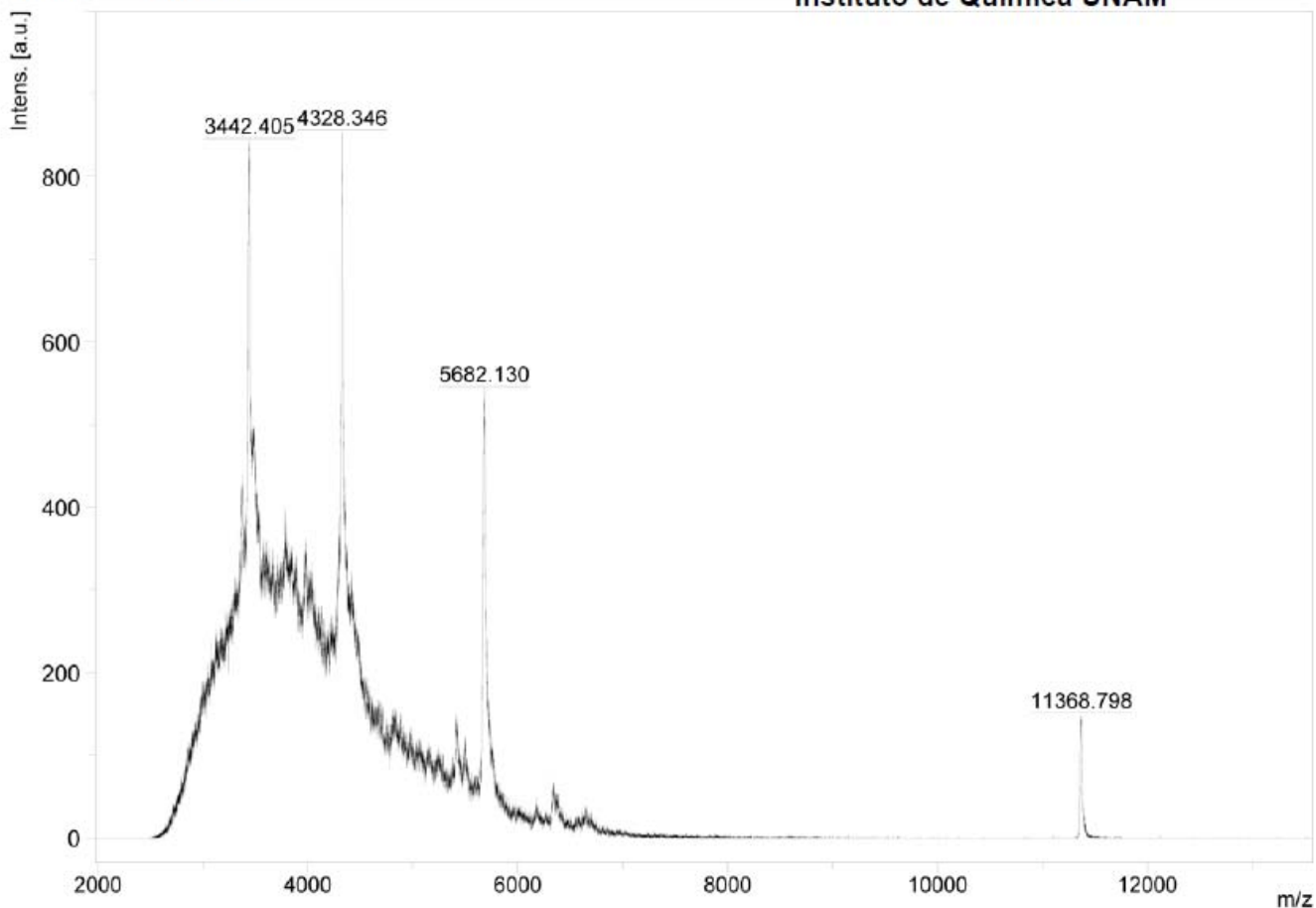


Figura 19. Análisis MALDI-TOF de la fracción correspondiente a la conotoxina ViTx

No se observó ningún pico que correspondiera a la proteína de fusión. Sí se registró un pico correspondiente al fragmento Lipoil-His. La toxina ViTx no es visible.

Debido a estos problemas se decidió sintetizar como control la conotoxina **Sr11a**, la cual ya había sido expresada con éxito por nuestro grupo de investigación (datos no publicados), con el objetivo de validar la metodología utilizada. Esta toxina también está insertada en el vector pHLTEV (Tabla 8). El protocolo para sintetizarla fue el mismo que el utilizado para la ViTx, con la única diferencia de que no se agregó una metionina.

GGSCRTEGMSCEENQQCCWRSCCRGECEAPCRFGP
 Secuencia Sr11a + 3 a.a.

Muestra	Peso molecular
Proteína de fusión	15, 377.1 Da
Fragmento Lipoil-His	11, 533.8 Da
Conotoxina Sr11a	3861.3 Da

Tabla 8.- Pesos moleculares teóricos de la proteína de fusión, fragmento Lipoil-His y Sr11a.

En el gel de la figura 20 se observa el nivel de expresión de la proteína de fusión y del fragmento Lipoil-His. Sr11a no fue observable.

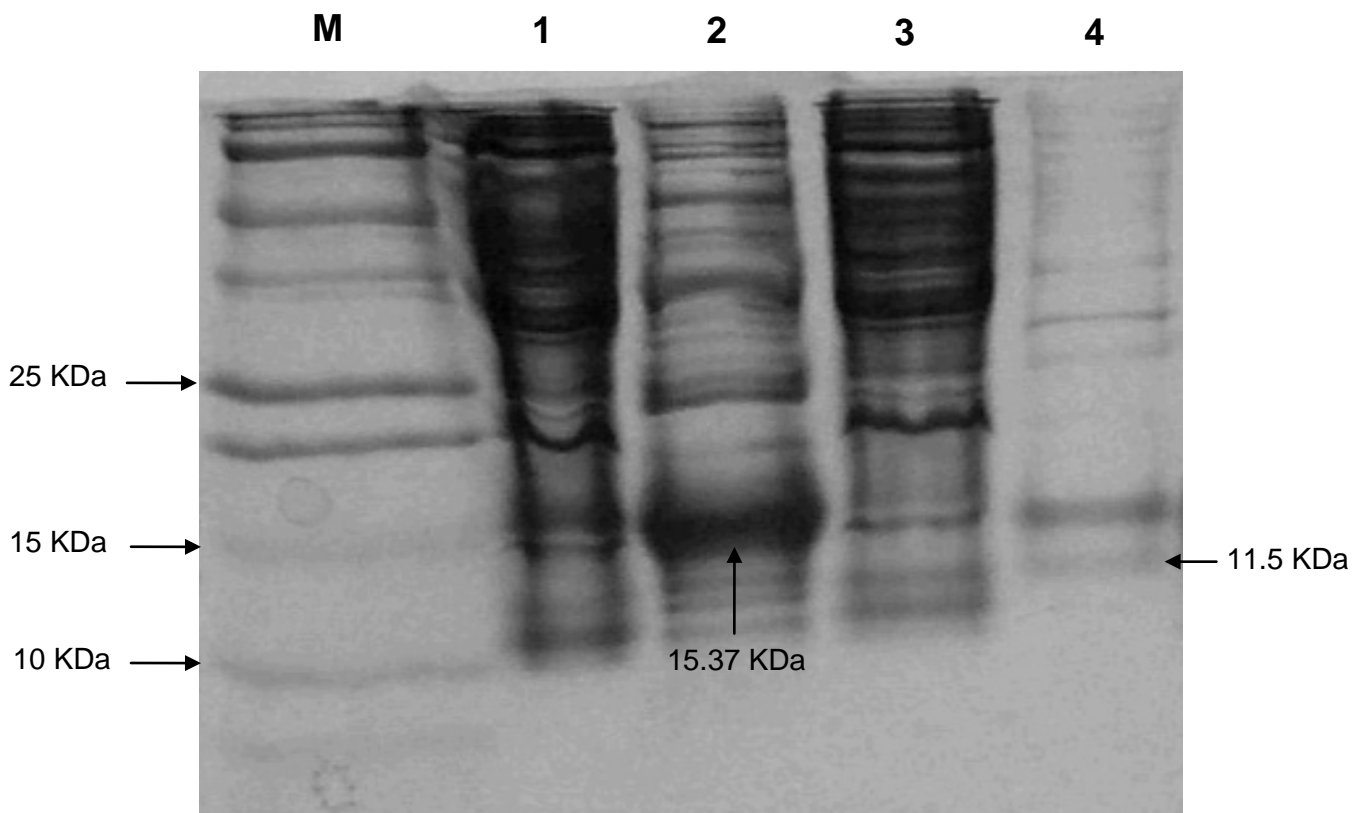


Figura 20.-Análisis en Tricina-SDS-PAGE. **Carril M**, Marcador de peso molecular; **carril 1**, Proteína de fusión (15.5 KDa); **carril 2**, Concentrado de la proteína de fusión (15.5 KDa); **carril 3**, Filtrado de la primera columna de níquel; **carril 4**, Fragmento Lipoil-His (11.5 KDa).

Se mandaron a analizar las fracciones correspondientes a la proteína de fusión en el extracto crudo (Figura 21), el fragmento Lipoil-His (Figura 22) y la Sr11a (Figura 23), por espectrometría de masas (MALDI-TOF).

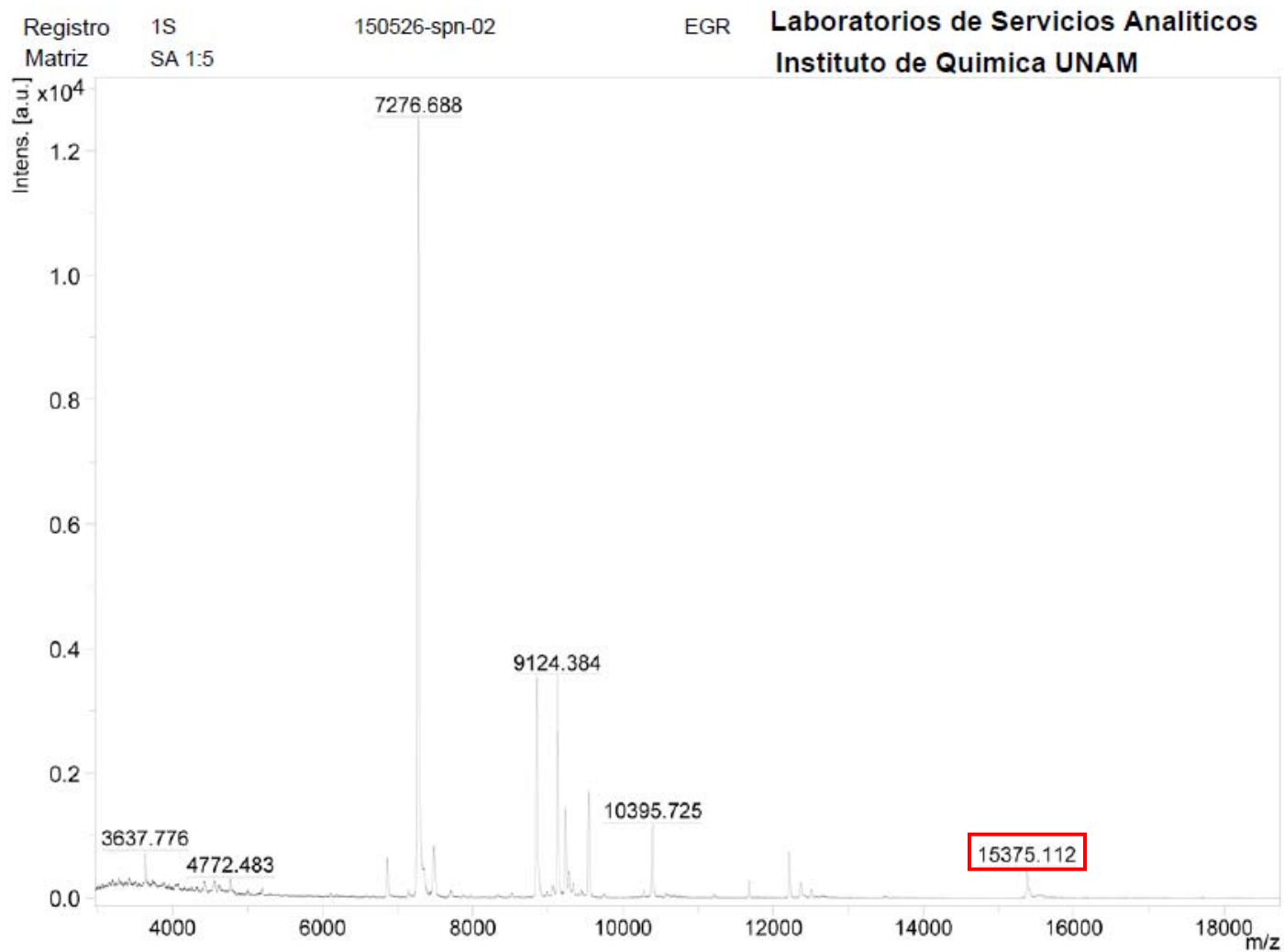


Figura 21.- Análisis MALDI-TOF de la fracción correspondiente a la proteína de fusión en el extracto crudo.

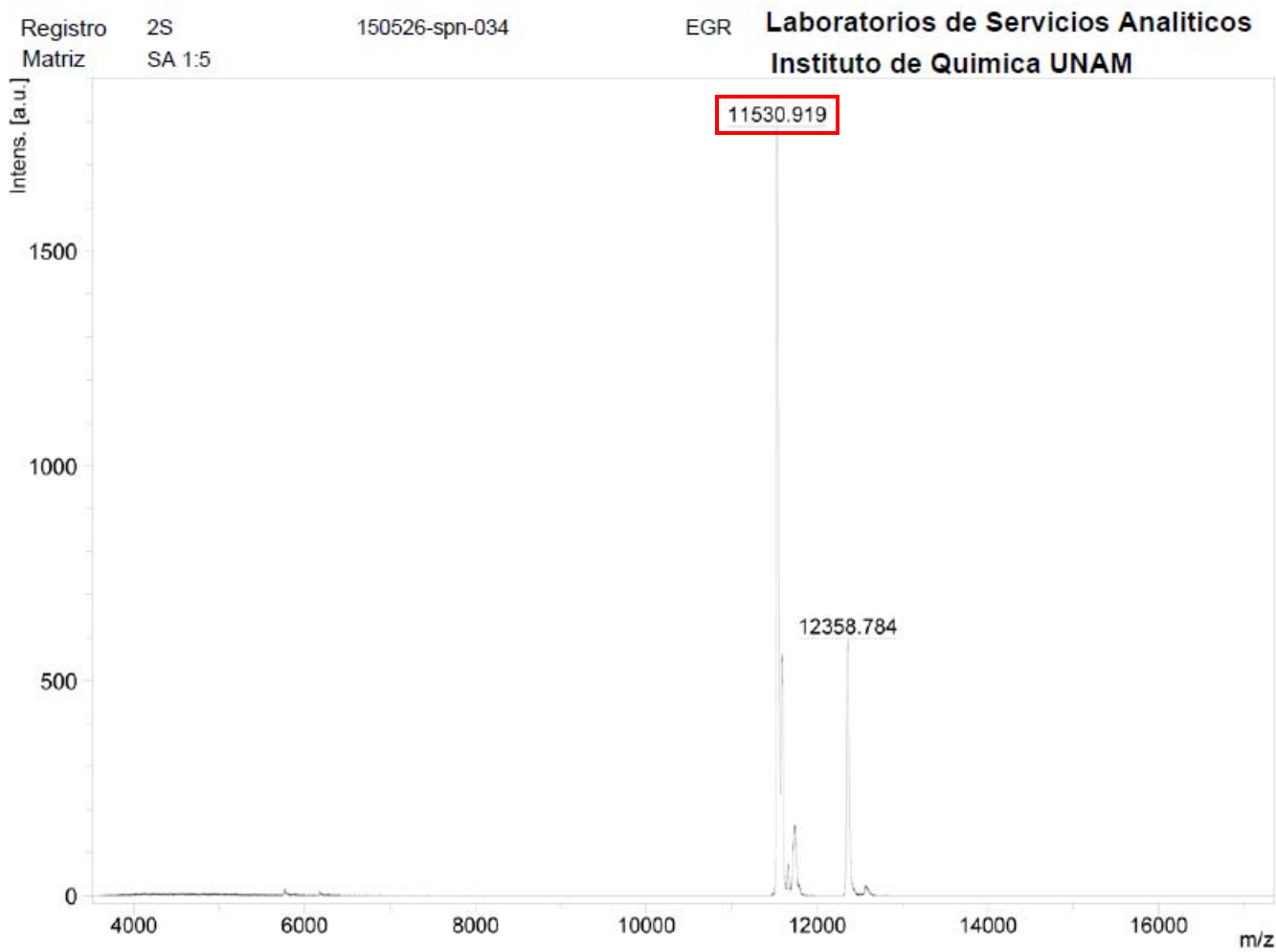


Figura 22. Análisis MALDI-TOF de la fracción correspondiente al fragmento Lipoil-His.

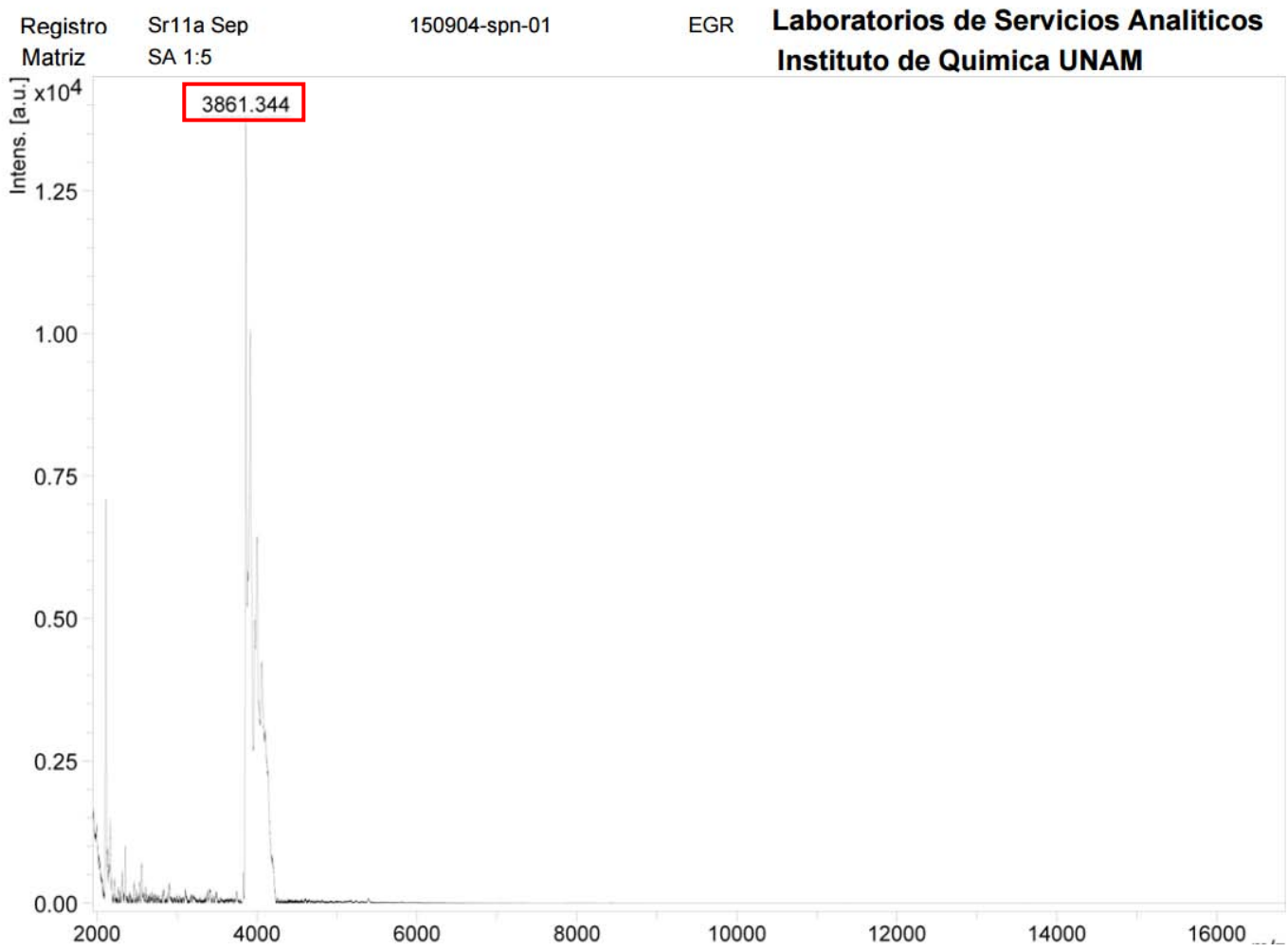


Figura 23. Análisis MALDI-TOF de la fracción correspondiente a la conotoxina Sr11a.

7.- Discusión

La cepa BL21 de *E. coli* se transformó con el vector pHLTEV-ViT_x. Se indujo la expresión de la proteína de fusión (His-Lipo-ViT_x) y se obtuvo una proteína con un peso aproximado de 15 KDa (Figura 16, carril 1). Se podría esperar que esta proteína fuese la proteína fusión, sin embargo, el análisis de masas no muestra ningún pico con el peso esperado de 15.37 KDa (Figura 17). El fragmento que corresponde a la proteína acarreadora unida al His-tag (Lipo-His) fue visible en el gel (Figura 16, carril 3) y su espectro de masas confirma su presencia (Figura 18). Por último, ViT_x no se detectó en el gel y el espectro de masas.

Con la intención de validar la metodología utilizada se produjo la conotoxina Sr11a. El análisis en el gel de poliacrilamida muestra una banda correspondiente a la proteína de fusión en el peso esperado de 15 KDa (Figura 20, carril 2) y, el fragmento Lipo-His también se observa (Figura 20, carril 4). El péptido Sr11a no fue detectable en el gel debido a su peso. En el análisis de espectrometría de masas se confirmó la presencia de la proteína de fusión (Figura 21), el fragmento Lipo-His (Figura 22) y la conotoxina Sr11a (Figura 23).

Para explicar porque no se obtuvo ViT_x se proponen al menos dos hipótesis. La primera es que la síntesis de la proteína de fusión (ViT_x-Lipo-His) es correcta, sin embargo, las proteasas presentes en *E. coli* degradan la proteína de fusión correspondiente a la conotoxina ViT_x, y, en consecuencia, no se observa el peso esperado en el espectro de masas. El fragmento Lipo-His es más grande y estable y no se degrada fácilmente, por lo tanto, se observa en el registro. Aunque la cepa utilizada (BL21) es deficiente de proteasas (*Lon* y *OmpT*) no significa que no estén presentes, aunque sea en cantidades pequeñas. La segunda hipótesis sugiere que la proteína de fusión no se sintetiza correctamente y, queda trunca en la secuencia donde se comienza a sintetizar la ViT_x. Se puede suponer que la traducción es correcta hasta el sitio de corte de la enzima TEV, pues después de la digestión enzimática el fragmento Lipo-His está presente, además, se realizó un *Western blot* con un anticuerpo contra la His-tag y se identificó la proteína de

fusión (anexos). También es posible que en la traducción se incorporen residuos erróneos en la secuencia.

Para poder comprender mejor porque una conotoxina se puede producir en forma recombinante, se realizó una alineación (ClustalO) y se compararon las secuencias de ViTx y Sr11a (Figura 24). Aunque ambas toxinas pertenecen a la misma superfamilia tienen poca homología (26.316%). La diferencia más notable es la cantidad de residuos cargados. La ViTx tiene tres residuos ácidos de arginina y no tiene aminoácidos con carga negativa (básicos), mientras que la Sr11a, además de tener cuatro residuos positivos de arginina, tiene cinco glutamatos (E). Se hizo un alineamiento de la ViTx para comparar su secuencia con todas las conotoxinas que hasta la fecha se han producido de forma recombinante (Figura 25). Aunque la cantidad de residuos cargados varía considerablemente, todas las conotoxinas excepto ViTx, poseen, al menos, un residuo con carga negativa.

Se sabe que las interacciones intramoleculares en las proteínas favorecen la estabilización de su estructura.^[127,128,129] Los enlaces disulfuro juegan un papel importante no solo en la estructura sino también en la actividad de las proteínas.^[130] Resulta interesante que la conotoxina Sr11a se haya podido producir en *E. coli* sin la formación de estos enlaces, lo cual sugiere que otras interacciones estabilizan al péptido e impiden su degradación por las proteasas endógenas. Una de estas posibles interacciones son los puentes o enlaces salinos. Estos enlaces se forman entre residuos cargados negativamente (glutamato y aspartato) y residuos cargados positivamente (arginina y lisina) (Figura 26). La distancia mínima entre residuos para que se pueda formar uno de estos enlaces es de 4 Å.^[131] Aunque en la actualidad se debate mucho acerca de la importancia de los enlaces salinos para la estabilización estructural de las proteínas, hay estudios que señalan su importancia para que la estructura terciaria sea estable y funcional.^[132] Es posible que las otras conotoxinas que se han producido de forma recombinante formen enlaces salinos que favorecen su estabilidad en un ambiente ajeno para ellas como el de *E. coli*.

Por otra parte, para lograr su plegamiento correcto, muchas proteínas requieren de un residuo de prolina en la conformación *cis* en su enlace peptídico. La isomerización espontánea es lenta y se ha sugerido que es el paso limitante en el plegamiento de algunas proteínas, ^[133] por lo que se necesita de una enzima que catalice esta reacción. La peptidilpropil isomerasa cataliza la isomerización *cis-trans* de los enlaces peptídicos X-Pro (Figura 27). ^[134,135] En *E. coli* este grupo de enzimas se encuentran tanto en el citoplasma como en el periplasma. ^[136] En péptidos, la presencia de un residuo voluminoso antes de una prolina incrementa la posibilidad de que se forme un enlace en conformación *cis*. ^[137] ViTx es la única conotoxina recombinante que tiene aminoácidos con estas características antes de un residuo de prolina (F4-P5 y T11-P12). Probablemente alguna prolina de ViTx no sufra esta isomerización, provocando que la toxina no adquiera su estructura terciaria, y por lo tanto, se expone a una degradación proteica.

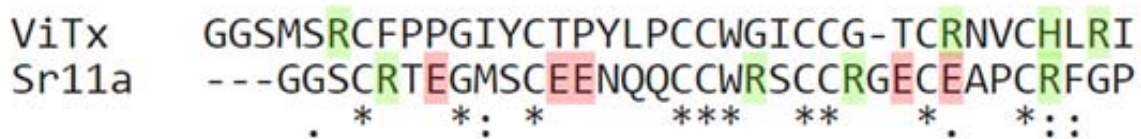


Figura 24.- Alinamiento de las conotoxinas ViTx y Sr11a. Los residuos cargados negativamente están coloreados en rojo y los cargados positivamente en verde. * *residuo conservado* : *mismo grupo principal* . *mismo grupo secundario*.

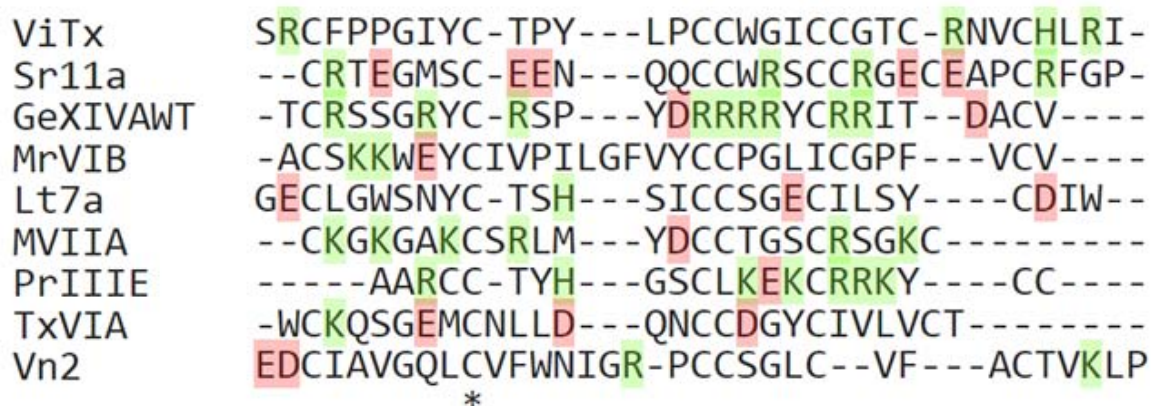


Figura 25.- Alinamiento de ViTx con las conotoxinas recombinantes. Los residuos cargados negativamente están coloreados en rojo y los cargados positivamente en verde. * *residuo conservado*.

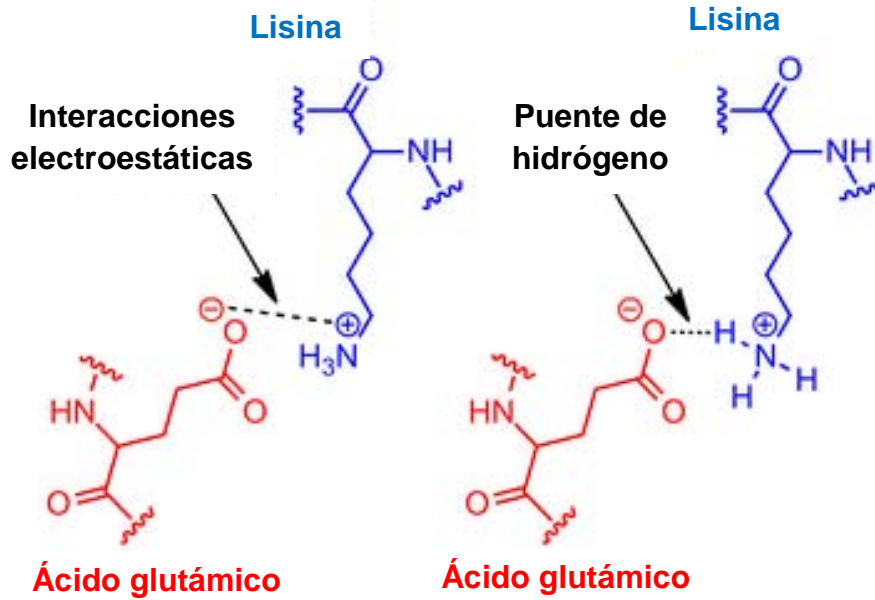


Figura 26.- Ejemplificación de un enlace o puente salino entre un ácido glutámico y una lisina. En estas interacciones se forman puentes de hidrógeno.

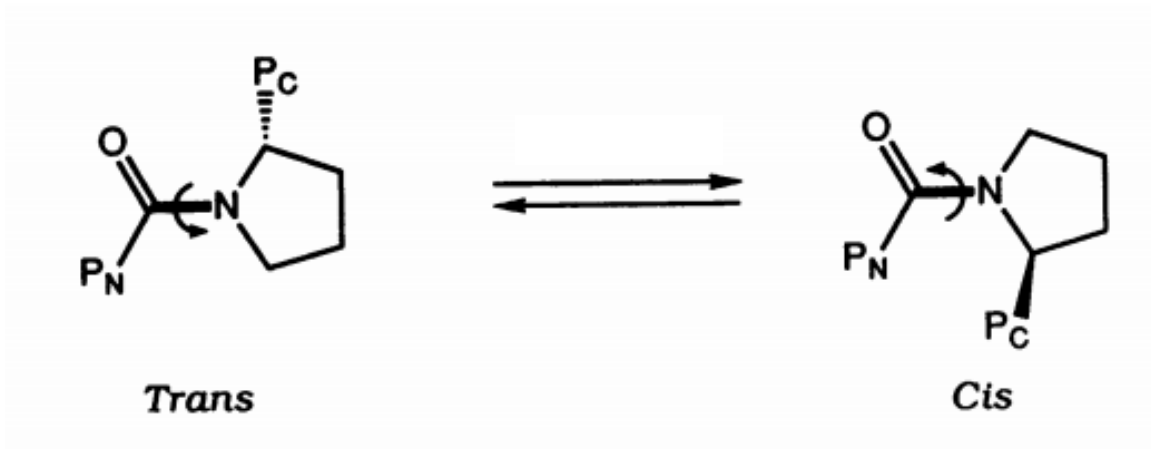


Figura 27.- Isomerización de la prolina catalizada por la peptidilpropil isomerasa.

Los péptidos que no se pliegan correctamente se degradan por proteasas en *E. coli*.^[138] Los últimos cinco residuos en el carboxilo terminal son clave para que la proteína sea reconocida y degradada por proteasas. Si un aminoácido **no polar** se encuentra justo en el extremo carboxilo, el péptido tiene más posibilidades de ser reconocido y degradado por una proteasa, en cambio, lo aminoácidos cargados

evitan este reconocimiento, y, por lo tanto, la degradación.^[138,139] Si ViTx no se logró plegar correctamente, probablemente sea la razón de su degradación proteica, en particular porque el último residuo en su secuencia es no polar (isoleucina).

En la literatura se reportan muy pocas conotoxinas producidas de forma recombinante. Este reducido número puede ser un indicio de la dificultad para sintetizar estos péptidos por esta vía. Lamentablemente los resultados negativos nunca se publican, lo que hace imposible la identificación de aquellos péptidos cuya síntesis recombinante es inviable utilizando esta estrategia.

8.- Conclusiones

- Se logró el diseño del vector pHLTEV-ViT_x.
- No se obtuvo la conotoxina ViTx, posiblemente debido a una degradación proteolítica.
- Se obtuvo la conotoxina Sr11a, lo que confirmó los resultados previos del equipo de investigación (tesis de Doctorado de Liliana Pérez; datos no publicados).

9.- Perspectivas

Para la conotoxina ViTx se plantean las perspectivas siguientes:

- Realizar un *Western blot* utilizando un anticuerpo contra la toxina ViTx para corroborar su presencia.
- Probar diferentes matrices en la técnica de MALDI-TOF.

Para la conotoxina Sr11a se plantean las perspectivas siguientes:

- En el péptido recombinante determinar su patrón de enlaces disulfuro mediante resonancia magnética nuclear.
- Probar la actividad de la Sr11a recombinante en canales de potasio activados por voltaje (Kv1) expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*.

- Sintetizar las cuatro mutantes de carga positiva (R2, R17, R21 y R29) de la conotoxina Sr11a en las cuales las argininas hayan sido reemplazadas con alanina (*alanine scanning*), para identificar los residuos involucrados en su actividad, por estudios funcionales en ovocitos de *Xenopus laevis*.

10.- Bibliografía

- 1.- Olivera, B. (1997). E.E. Just Lecture, 1996. **Conus Venom Peptides, Receptor and Ion Channel Targets, and Drug Design: 50 Million Years of Neuropharmacology.** *Molecular Biology Of The Cell*, 8(11), 2101-2109.
- 2.- Olivera, B. (2002). Conus Venom Peptides: **Reflections from the Biology of Clades and Species.** *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 33(1), 25-47.
- 3.- Terlau, H. (2004). **Conus Venoms: A Rich Source of Novel Ion Channel-Targeted Peptides.** *Physiological Reviews*, 84(1), 41-68.
- 4.- Norton, R. S., & Olivera, B. M. (2006). **Conotoxins down under.** *Toxicon*, 48(7), 780-798.
- 5.- Nelson, L., & Goldfrank, L. (2011). **Goldfrank's toxicologic emergencies.** New York: McGraw-Hill Medical.
- 6.- Olivera, B. M., & Cruz, L. J. (2001). **Conotoxins, in retrospect.** *Toxicon*, 39(1), 7-14.
- 7.- McIntosh, M., Cruz, L., Hunkapiller, M., Gray, W., & Olivera, B. (1982). **Isolation and structure of a peptide toxin from the marine snail Conus magus.** *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 218(1), 329-334.
- 8.- Miljanich, G. P. (2004). **Ziconotide: neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain.** *Current medicinal chemistry*, 11(23), 3029-3040.
- 9.- Alberts, B. (2002). **Molecular biology of the cell** (4th ed., pp. 689-707). New York: Garland Science.
- 10.- Puig, A., & Gilbert, H. F. (1994). **Protein disulfide isomerase exhibits chaperone and anti-chaperone activity in the oxidative refolding of lysozyme.** *Journal of Biological Chemistry*, 269(10), 7764-7771.

- 11.- Schnabel, E., Mains, R. E., & Farquhar, M. G. (1989). **Proteolytic processing of pro-ACTH/endorphin begins in the Golgi complex of pituitary corticotropes and AtT-20 cells.** *Molecular Endocrinology*, 3(8), 1223-1235.
- 12.- Lis, H., & Sharon, N. (1993). **Protein glycosylation.** *European Journal of Biochemistry*, 218(1), 1-27.
- 13.- Puillandre, N., Watkins, M., & Olivera, B. M. (2010). **Evolution of Conus peptide genes: duplication and positive selection in the A-superfamily.** *Journal of molecular evolution*, 70(2), 190-202.
- 14.- Kaas, Q., & Craik, D. J. (2014). **Conotoxins and Other Conopeptides.** *Outstanding Marine Molecules: Chemistry, Biology, Analysis*, 319-332.
- 15.- Marx, U. C., Daly, N. L., & Craik, D. J. (2006). **NMR of conotoxins: structural features and an analysis of chemical shifts of post-translationally modified amino acids.** *Magnetic Resonance in Chemistry*, 44(S1), S41-S50.
- 16.- Kang, T. S., Vivekanandan, S., Jois, S. D., & Kini, R. M. (2005). **Effect of C-Terminal Amidation on Folding and Disulfide-Pairing of α -Conotoxin Iml.** *Angewandte Chemie International Edition*, 44(39), 6333-6337.
- 17.- Vuori, K., Pihlajaniemi, T., Myllylä, R., & Kivirikko, K. I. (1992). **Site-directed mutagenesis of human protein disulphide isomerase: effect on the assembly, activity and endoplasmic reticulum retention of human prolyl 4-hydroxylase in *Spodoptera frugiperda* insect cells.** *The EMBO Journal*, 11(11), 4213.
- 18.- Wakamatsu, K., Kohda, D., Hatanaka, H., Lancelin, J. M., Ishida, Y., Oya, M., ... & Sato, K. (1992). **Structure-activity relationships of μ -conotoxin GIIIA: structure determination of active and inactive sodium channel blocker peptides by NMR and simulated annealing calculations.** *Biochemistry*, 31(50), 12577-12584.
- 19.- Carlisle, T. L., & Suttie, J. W. (1980). **Vitamin K dependent carboxylase: subcellular location of the carboxylase and enzymes involved in vitamin K metabolism in rat liver.** *Biochemistry*, 19(6), 1161-1167.
- 20.- Wallin, R., Stanton, C., & Hutson, S. M. (1993). **Intracellular maturation of the γ -carboxyglutamic acid (Gla) region in prothrombin coincides with release of the propeptide.** *Biochemical Journal*, 291(3), 723-727.
- 21.- Bristol, J. A., Ratcliffe, J. V., Roth, D. A., Jacobs, M. A., Furie, B. C., & Furie, B. (1996). **Biosynthesis of prothrombin: intracellular localization of the**

vitamin K-dependent carboxylase and the sites of gamma-carboxylation. *Blood*, 88(7), 2585-2593.

22.- Rigby, A. C., Baleja, J. D., Li, L., Pedersen, L. G., Furie, B. C., & Furie, B. (1997). **Role of γ -carboxyglutamic acid in the calcium-induced structural transition of conantokin G, a conotoxin from the marine snail *Conus geographus*.** *Biochemistry*, 36(50), 15677-15684.

23.- Craig, A. G., Norberg, T., Griffin, D., Hoeger, C., Akhtar, M., Schmidt, K., ... & Mazella, J. (1999). **Contulakin-G, an O-glycosylated invertebrate neurotensin.** *Journal of Biological Chemistry*, 274(20), 13752-13759.

24.- Espiritu, M., Cabalteja, C., Sugai, C., & Bingham, J. (2013). **Incorporation of post-translational modified amino acids as an approach to increase both chemical and biological diversity of conotoxins and conopeptides.** *Amino Acids*, 46(1), 125-151.

25.- Blobel, G., & Dobberstein, B. (1975). **Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma.** *J. Cell Biol*, 67, 835-851.

26.- Robinson, S. D., & Norton, R. S. (2014). **Conotoxin gene superfamilies.** *Marine drugs*, 12(12), 6058-6101.

27.- Santos, A. D., McIntosh, J. M., Hillyard, D. R., Cruz, L. J., & Olivera, B. M. (2004). **The A-superfamily of conotoxins structural and functional divergence.** *Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 17596-17606.

28.- Azam, L., & McIntosh, J. M. (2009). **Alpha-conotoxins as pharmacological probes of nicotinic acetylcholine receptors.** *Acta pharmacologica Sinica*, 30(6), 771-783.

29.- Craig, A. G., Zafaralla, G., Cruz, L. J., Santos, A. D., Hillyard, D. R., Dykert, J., ... & Sporning, A. (1998). **An O-glycosylated neuroexcitatory Conus peptide.** *Biochemistry*, 37(46), 16019-16025.

30.- Ramilo, C. A., Zafaralla, G. C., Nadasdi, L., Hammerland, L. G., Yoshikami, D., Gray, W. R., ... & Miljanich, G. (1992). **Novel. alpha.-and. omega.-conotoxins and Conus striatus venom.** *Biochemistry*, 31(41), 9919-9926.

31.- Peng, C., Ye, M., Wang, Y., Shao, X., Yuan, D., Liu, J., ... & Chi, C. (2010). **A new subfamily of conotoxins belonging to the A-superfamily.** *Peptides*, 31(11), 2009-2016.

- 32.- Sharpe, I. A., Gehrmann, J., Loughnan, M. L., Thomas, L., Adams, D. A., Atkins, A., ... & Lewis, R. J. (2001). **Two new classes of conopeptides inhibit the α 1-adrenoceptor and noradrenaline transporter.** *Nature neuroscience*, 4(9), 902-907.
- 33.- Loughnan, M., Nicke, A., Jones, A., Schroeder, C. I., Nevin, S. T., Adams, D. J., ... & Lewis, R. J. (2006). **Identification of a Novel Class of Nicotinic Receptor Antagonists DIMERIC CONOTOXINS VxXIIA, VxXIIB, and VxXIIC FROM CONUS V EXILLUM.** *Journal of Biological Chemistry*, 281(34), 24745-24755.
- 34.- Loughnan, M. L., Nicke, A., Lawrence, N., & Lewis, R. J. (2009). **Novel α D-Conopeptides and Their Precursors Identified by cDNA Cloning Define the D-Conotoxin Superfamily†‡.** *Biochemistry*, 48(17), 3717-3729.
- 35.- Imperial, J. S., Bansal, P. S., Alewood, P. F., Daly, N. L., Craik, D. J., Sporning, A., ... & Olivera, B. M. (2006). **A novel conotoxin inhibitor of Kv1. 6 channel and nAChR subtypes defines a new superfamily of conotoxins.** *Biochemistry*, 45(27), 8331-8340.
- 36.- Green, B. R., Bulaj, G., & Norton, R. S. (2014). **Structure and function of μ -conotoxins, peptide-based sodium channel blockers with analgesic activity.** *Future medicinal chemistry*, 6(15), 1677-1698.
- 37.- Al-Sabi, A., Lennartz, D., Ferber, M., Gulyas, J., Rivier, J. E., Olivera, B. M., ... & Terlau, H. (2004). **κ M-conotoxin RIIIK, structural and functional novelty in a K⁺ channel antagonist.** *Biochemistry*, 43(27), 8625-8635.
- 38.- Chen, P., Dendorfer, A., Finol-Urdaneta, R. K., Terlau, H., & Olivera, B. M. (2010). **Biochemical Characterization of κ M-RIIIJ, a Kv1. 2 Channel Blocker EVALUATION OF CARDIOPROTECTIVE EFFECTS OF κ M-CONOTOXINS.** *Journal of Biological Chemistry*, 285(20), 14882-14889.
- 39.- Ferber, M., Sporning, A., Jeserich, G., DeLaCruz, R., Watkins, M., Olivera, B. M., & Terlau, H. (2003). **A novel Conus peptide ligand for K⁺ channels.** *Journal of Biological Chemistry*, 278(4), 2177-2183.
- 40.- Ekberg, J., Jayamanne, A., Vaughan, C. W., Aslan, S., Thomas, L., Mould, J., ... & Adams, D. J. (2006). **μ O-conotoxin MrVIB selectively blocks Nav1. 8 sensory neuron specific sodium channels and chronic pain behavior without motor deficits.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(45), 17030-17035.

- 41.- Lubbers, N. L., Campbell, T. J., Polakowski, J. S., Bulaj, G., Layer, R. T., Moore, J., ... & Cox, B. F. (2005). **Postischemic administration of CGX-1051, a peptide from cone snail venom, reduces infarct size in both rat and dog models of myocardial ischemia and reperfusion.** *Journal of cardiovascular pharmacology*, 46(2), 141-146.
- 42.- FAINZILBER, M., GORDON, D., HASSON, A., SPIRA, M. E., & ZLOTKIN, E. (1991). **Mollusc-specific toxins from the venom of *Conus textile neovicarius*.** *European Journal of Biochemistry*, 202(2), 589-595.
- 43.- Zugasti-Cruz, A., Maillo, M., López-Vera, E., Falcón, A., de la Coteria, E. P. H., Olivera, B. M., & Aguilar, M. B. (2006). **Amino acid sequence and biological activity of a γ -conotoxin-like peptide from the worm-hunting snail *Conus austini*.** *Peptides*, 27(3), 506-511.
- 44.- Craig, A. G., Jimenez, E. C., Dykert, J., Nielsen, D. B., Gulyas, J., Abogadie, F. C., ... & McIntosh, J. M. (1997). **A Novel Post-translational Modification Involving Bromination of Tryptophan IDENTIFICATION OF THE RESIDUE, L-6-BROMOTRYPTOPHAN, IN PEPTIDES FROM *Conus imperialis* AND *Conus radiatus* VENOM.** *Journal of Biological Chemistry*, 272(8), 4689-4698.
- 45.- Peng, C., Tang, S., Pi, C., Liu, J., Wang, F., Wang, L., ... & Xu, A. (2006). **Discovery of a novel class of conotoxin from *Conus litteratus*, It14a, with a unique cysteine pattern.** *Peptides*, 27(9), 2174-2181.
- 46.- England, L. J., Imperial, J., Jacobsen, R., Craig, A. G., Gulyas, J., Akhtar, M., ... & Olivera, B. M. (1998). **Inactivation of a serotonin-gated ion channel by a polypeptide toxin from marine snails.** *Science*, 281(5376), 575-578.
- 47.- Teichert, R. W., Jimenez, E. C., & Olivera, B. M. (2005). **α S-conotoxin RVIIIa: a structurally unique conotoxin that broadly targets nicotinic acetylcholine receptors.** *Biochemistry*, 44(21), 7897-7902.
- 48.- Sharpe, I. A., Gehrmann, J., Loughnan, M. L., Thomas, L., Adams, D. A., Atkins, A., ... & Lewis, R. J. (2001). **Two new classes of conopeptides inhibit the α 1-adrenoceptor and noradrenaline transporter.** *Nature neuroscience*, 4(9), 902-907.
- 49.- Rigby, A. C., Lucas-Meunier, E., Kalume, D. E., Czerwiec, E., Hambe, B., Dahlqvist, I., ... & Furie, B. C. (1999). **A conotoxin from *Conus textile* with unusual posttranslational modifications reduces presynaptic Ca^{2+} influx.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(10), 5758-5763.

- 50.- Peng, C., Liu, L., Shao, X., Chi, C., & Wang, C. (2008). **Identification of a novel class of conotoxins defined as V-conotoxins with a unique cysteine pattern and signal peptide sequence.** *Peptides*, 29(6), 985-991.
- 51.- Lu, A., Yang, L., Xu, S., & Wang, C. (2014). **Various conotoxin diversifications revealed by a venom study of *Conus flavidus*.** *Molecular & Cellular Proteomics*, 13(1), 105-118.
- 52.- Yuan, D. D., Liu, L., Shao, X. X., Peng, C., Chi, C. W., & Guo, Z. Y. (2008). **Isolation and cloning of a conotoxin with a novel cysteine pattern from *Conus characteristicus*.** *Peptides*, 29(9), 1521-1525.
- 53.- Jimenez, E. C., Shetty, R. P., Lirazan, M., Rivier, J., Walker, C., Abogadie, F. C., ... & Olivera, B. M. (2003). **Novel excitatory *Conus* peptides define a new conotoxin superfamily.** *Journal of neurochemistry*, 85(3), 610-621.
- 54.- Mondal, S., Babu, R. M., Bhavna, R., & Ramakumar, S. (2006). **I-conotoxin superfamily revisited.** *Journal of Peptide Science*, 12(11), 679-685.
- 55.- Liu, Z., Xu, N., Hu, J., Zhao, C., Yu, Z., & Dai, Q. (2009). **Identification of novel I-superfamily conopeptides from several clades of *Conus* species found in the South China Sea.** *Peptides*, 30(10), 1782-1787.
- 56.- Akondi, K. B., Muttenthaler, M., Dutertre, S., Kaas, Q., Craik, D. J., Lewis, R. J., & Alewood, P. F. (2014). **Discovery, synthesis, and structure–activity relationships of conotoxins.** *Chemical Reviews*, 114(11), 5815-5847.
- 57.- Fan, C. X., Chen, X. K., Zhang, C., Wang, L. X., Duan, K. L., He, L. L., ... & Tytgat, J. (2003). **A novel conotoxin from *Conus betulinus*, κ -BtX, unique in cysteine pattern and in function as a specific BK channel modulator.** *Journal of Biological Chemistry*, 278(15), 12624-12633.
- 58.- Aguilar, M. B., Pérez-Reyes, L. I., López, Z., de la Coteria, E. P. H., Falcón, A., Ayala, C., ... & Escobar, L. I. (2010). **Peptide sr11a from *Conus spurius* is a novel peptide blocker for Kv1 potassium channels.** *Peptides*, 31(7), 1287-1291.
- 59.- Kaufenstein, S., Huys, I., Lamthanh, H., Stöcklin, R., Sotto, F., Menez, A., ... & Mebs, D. (2003). **A novel conotoxin inhibiting vertebrate voltage-sensitive potassium channels.** *Toxicon*, 42(1), 43-52.
- 60.- Jing, Z. H. U., Gomez, B., Watanabe, I., & Thornhill, W. B. (2005). **Amino acids in the pore region of Kv1 potassium channels dictate cell-surface**

protein levels: a possible trafficking code in the Kv1 subfamily. *Biochemical Journal*, 388(1), 355-362.

61.- Gilquin, B., Racapé, J., Wrisch, A., Visan, V., Lecoq, A., Grissmer, S., ... & Gasparini, S. (2002). **Structure of the BgK-Kv1. 1 complex based on distance restraints identified by double mutant cycles Molecular basis for convergent evolution of Kv1 channel blockers.** *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37406-37413.

62.- Mondal, S., Vijayan, R., Shichina, K., Babu, R. M., & Ramakumar, S. (2005). **I-superfamily conotoxins: Sequence and structure analysis.** *In silico biology*, 5(5, 6), 557-571.

63.- Merrifield, R. B. (1963). Solid phase peptide synthesis. I. **The synthesis of a tetrapeptide.** *Journal of the American Chemical Society*, 85(14), 2149-2154.

64.- Baneyx F (1999) **Recombinant protein expression in *Escherichia coli*.** *Current Opinion in Biotechnology* 10:411–421.

65.- Pines, O., & Inouye, M. (1999). **Expression and secretion of proteins in *E. coli*.** *Molecular biotechnology*, 12(1), 25-34.

66.- Prinz, W. A., Åslund, F., Holmgren, A., & Beckwith, J. (1997). **The Role of the Thioredoxin and Glutaredoxin Pathways in Reducing Protein Disulfide Bonds in the *Escherichia coli* Cytoplasm.** *Journal of Biological Chemistry*, 272(25), 15661-15667.

67.- White, C. E., Kempf, N. M., & Komives, E. A. (1994). **Expression of highly disulfide bonded proteins in *Pichia pastoris*.** *Structure (London, England)*, 2(11), 1003-1005.

68.- Galesi, A. L., Pereira, C. A., & Moraes, Â. M. (2007). **Culture of transgenic *Drosophila melanogaster* Schneider 2 cells in serum-free media based on TC100 basal medium.** *Biotechnology journal*, 2(11), 1399-1407.

69.- Becker, S., & Terlau, H. (2008). **Toxins from cone snails: properties, applications and biotechnological production.** *Applied microbiology and biotechnology*, 79(1), 1-9.

70.- Mullis, K. (1990). **Recombinant DNA and molecular cloning.** (pp. 180-231). *Scientific American*.

71.- Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P., & Claverys, J. P. (2014). **Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control.** *Nature Reviews Microbiology*, 12(3), 181-196.

- 72.- Bergmans, H. E., Van Die, I. M., & Hoekstra, W. P. (1981). **Transformation in *Escherichia coli*: stages in the process.** *Journal of bacteriology*, 146(2), 564-570.
- 73.- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). **Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges.** *Recombinant protein expression in microbial systems*, 7.
- 74.- Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A. D., Heyneker, H. L., Bolivar, F., & Boyer, H. W. (1977). **Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin.** *Science*, 198(4321), 1056-1063.
- 75.- Müller-Hill, B. (1996). ***The lac operon*** (pp. 66-67). New York:: Walter de Gruyter.
- 76.- Hansen, L. H., Knudsen, S., & Sørensen, S. J. (1998). **The effect of the lacY gene on the induction of IPTG inducible promoters, studied in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*.** *Current microbiology*, 36(6), 341-347.
- 77.- Nilsson, J., Ståhl, S., Lundeberg, J., Uhlén, M., & Nygren, P. Å. (1997). **Affinity fusion strategies for detection, purification, and immobilization of recombinant proteins.** *Protein expression and purification*, 11(1), 1-16.
- 78.- Bucher, M. H., Evdokimov, A. G., & Waugh, D. S. (2002). **Differential effects of short affinity tags on the crystallization of *Pyrococcus furiosus* maltodextrin-binding protein.** *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 58(3), 392-397.
- 79.- Klose, J., Wendt, N., Kubald, S., Krause, E., Fechner, K., Beyermann, M., ... & Rothmund, S. (2004). **Hexa-histidin tag position influences disulfide structure but not binding behavior of in vitro folded N-terminal domain of rat corticotropin-releasing factor receptor type 2a.** *Protein science*, 13(9), 2470-2475
- 80.- Chant, A., Kraemer-Pecore, C. M., Watkin, R., & Kneale, G. G. (2005). **Attachment of a histidine tag to the minimal zinc finger protein of the *Aspergillus nidulans* gene regulatory protein AreA causes a conformational change at the DNA-binding site.** *Protein expression and purification*, 39(2), 152-159.
- 81.- Hammarström, M., Hellgren, N., van den Berg, S., Berglund, H., & Härd, T. (2002). **Rapid screening for improved solubility of small human proteins**

produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. *Protein Science*, 11(2), 313-321.

82.- Kapust, R. B., & Waugh, D. S. (1999). **Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused.** *Protein Science*, 8(08), 1668-1674.

83.- Davis, G. D., Elisee, C., Newham, D. M., & Harrison, R. G. (1999). **New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*.** *Biotechnology and bioengineering*, 65(4), 382-388.

84.- LaVallie, E. R., DiBlasio, E. A., Kovacic, S., Grant, K. L., Schendel, P. F., & McCoy, J. M. (1993). **A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm.** *Biotechnology*, 11, 187-193.

85.- Smith, D. B., & Johnson, K. S. (1988). **Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase.** *Gene*, 67(1), 31-40.

86.- Baker, R. T. (1996). **Protein expression using ubiquitin fusion and cleavage.** *Current Opinion in Biotechnology*, 7(5), 541-546.

87.- Butt, T. R., Edavettal, S. C., Hall, J. P., & Mattern, M. R. (2005). **SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins.** *Protein expression and purification*, 43(1), 1-9.

88.- Costa, S. J., Almeida, A., Castro, A., Domingues, L., & Besir, H. (2013). **The novel Fh8 and H fusion partners for soluble protein expression in *Escherichia coli*: a comparison with the traditional gene fusion technology.** *Applied microbiology and biotechnology*, 97(15), 6779-6791.

89.- Costa, S. J., Coelho, E., Franco, L., Almeida, A., Castro, A., & Domingues, L. (2013). **The Fh8 tag: a fusion partner for simple and cost-effective protein purification in *Escherichia coli*.** *Protein expression and purification*, 92(2), 163-170.

90.- Bird, L. E. (2011). **High throughput construction and small scale expression screening of multi-tag vectors in *Escherichia coli*.** *Methods*, 55(1), 29-37.

91.- Jenny, R. J., Mann, K. G., & Lundblad, R. L. (2003). **A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa.** *Protein expression and purification*, 31(1), 1-11.

- 92.- Blommel, P. G., & Fox, B. G. (2007). **A combined approach to improving large-scale production of tobacco etch virus protease.** *Protein expression and purification*, 55(1), 53-68.
- 93.- Parks, T. D., Leuther, K. K., Howard, E. D., Johnston, S. A., & Dougherty, W. G. (1994). **Release of proteins and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase.** *Analytical biochemistry*, 216(2), 413-417.
- 94.- Tropea, J. E., Cherry, S., & Waugh, D. S. (2009). **Expression and purification of soluble His 6-tagged TEV protease.** *High T throughput Protein Expression and Purification: Methods and Protocols*, 297-307.
- 95.- Kapust, R. B., Tözsér, J., Copeland, T. D., & Waugh, D. S. (2002). **The P1' specificity of tobacco etch virus protease.** *Biochemical and biophysical research communications*, 294(5), 949-955.
- 96.- Hwang, P. M., Pan, J. S., & Sykes, B. D. (2014). **Targeted expression, purification, and cleavage of fusion proteins from inclusion bodies in *Escherichia coli*.** *FEBS letters*, 588(2), 247-252.
- 97.- Rais-Beghdadi, C., Roggero, M. A., Fasel, N., & Reymond, C. D. (1998). **Purification of recombinant proteins by chemical removal of the affinity tag.** *Applied biochemistry and biotechnology*, 74(2), 95-103.
- 98.- Miroux, B., & Walker, J. E. (1996). **Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels.** *Journal of molecular biology*, 260(3), 289-298.
- 99.- Mergulhao, F. J. M., Summers, D. K., & Monteiro, G. A. (2005). **Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*.** *Biotechnology advances*, 23(3), 177-202.
- 100.- De Marco, A. (2009). **Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*.** *Microbial cell factories*, 8(1), 1.
- 101.- Gustafsson, C., Govindarajan, S., & Minshull, J. (2004). **Codon bias and heterologous protein expression.** *Trends in biotechnology*, 22(7), 346-353.
- 102.- Hartley, D. L., & Kane, J. F. (1988). **Properties of inclusion bodies from recombinant *Escherichia coli*.** *Biochemical Society Transactions*, 16(2), 101-102.

- 103.- Carrio, M. M., & Villaverde, A. (2002). **Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies.** *Journal of biotechnology*, 96(1), 3-12.
- 104.- Packman, L. C., Borges, A., & Perham, R. N. (1988). **Amino acid sequence analysis of the lipoyl and peripheral subunit-binding domains in the lipoyl acetyltransferase component of the pyruvate dehydrogenase complex from *Bacillus stearothermophilus*.** *Biochemical Journal*, 252(1), 79-86.
- 105.- Lucast, L. J., Batey, R. T., & Doudna, J. A. (2001). **Large-scale purification of a stable form of recombinant tobacco etch virus protease.** *Biotechniques*, 30(3), 544-6.
- 106.- Stewart, E. J., Åslund, F., & Beckwith, J. (1998). **Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins.** *The EMBO journal*, 17(19), 5543-5550.
- 107.- Messens, J., & Collet, J. F. (2006). **Pathways of disulfide bond formation in *Escherichia coli*.** *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38(7), 1050-1062.
- 108.- Hartl, F. U., & Hayer-Hartl, M. (2002). **Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein.** *Science*, 295(5561), 1852-1858.
- 109.- De Marco, A., Vigh, L., Diamant, S., & Goloubinoff, P. (2005). **Native folding of aggregation-prone recombinant proteins in *Escherichia coli* by osmolytes, plasmid-or benzyl alcohol-overexpressed molecular chaperones.** *Cell stress & chaperones*, 10(4), 329-339.
- 110.- Caspers, P., Stieger, M., & Burn, P. (1994). **Overproduction of bacterial chaperones improves the solubility of recombinant protein tyrosine kinases in *Escherichia coli*.** *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 40(5), 635-644.
- 111.- Kondo, A., Kohda, J., Endo, Y., Shiromizu, T., Kurokawa, Y., Nishihara, K., ... & Fukuda, H. (2000). **Improvement of productivity of active horseradish peroxidase in *Escherichia coli* by coexpression of Dsb proteins.** *Journal of bioscience and bioengineering*, 90(6), 600-606.
- 112.- De Marco, A., Deuerling, E., Mogk, A., Tomoyasu, T., & Bukau, B. (2007). **Chaperone-based procedure to increase yields of soluble recombinant proteins produced in *E. coli*.** *BMC biotechnology*, 7(1), 1.

- 113.- Baldwin, R. L. (1986). **Temperature dependence of the hydrophobic interaction in protein folding.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(21), 8069-8072.
- 114.- Makhatadze, G. I., & Privalov, P. L. (1995). **Energetics of protein structure.** *Advances in protein chemistry*, 47, 307-425.
- 115.- Schellman, J. A. (1997). **Temperature, stability, and the hydrophobic interaction.** *Biophysical journal*, 73(6), 2960.
- 116.- Lewis, R. J., & Garcia, M. L. (2003). **Therapeutic potential of venom peptides.** *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(10), 790-802.
- 117.- Bücherl, W., Buckley, E., & Deulofeu, V. (1971). **Venomous animals and their venoms.**
- 118.- Zhan, J., Chen, X., Wang, C., Qiu, J., Ma, F., Wang, K., & Zheng, S. (2003). **A fusion protein of conotoxin MVIIA and thioredoxin expressed in *Escherichia coli* has significant analgesic activity.** *Biochemical and biophysical research communications*, 311(2), 495-500.
- 119.- Pi, C., Liu, J., Wang, L., Jiang, X., Liu, Y., Peng, C., ... & Xu, A. (2007). **Soluble expression, purification and functional identification of a disulfide-rich conotoxin derived from *Conus litteratus*.** *Journal of biotechnology*, 128(1), 184-193.
- 120.- Bruce, C., Fitches, E. C., Chougule, N., Bell, H. A., & Gatehouse, J. A. (2011). **Recombinant conotoxin, TxVIA, produced in yeast has insecticidal activity.** *Toxicon*, 58(1), 93-100.
- 121.- Hernandez-Cuebas, L. M., & White, M. M. (2012). **Expression of a biologically-active conotoxin PrIIIE in *Escherichia coli*.** *Protein expression and purification*, 82(1), 6-10.
- 122.- Spiezia, M. C., Chiarabelli, C., & Polticelli, F. (2012). **Recombinant expression and insecticidal properties of a *Conus ventricosus* conotoxin-GST fusion protein.** *Toxicon*, 60(5), 744-751.
- 123.- Gao, B., Zhangsun, D., Wu, Y., Lin, B., Zhu, X., & Luo, S. (2013). **Expression, renaturation and biological activity of recombinant conotoxin GeXIVAWT.** *Applied microbiology and biotechnology*, 97(3), 1223-1230.
- 124.- Gao, B., Zhangsun, D., Hu, Y., Wu, Y., Sheng, L., Fang, L., ... & Luo, S. (2013). **Expression and secretion of functional recombinant μ O-conotoxin MrVIB-His-tag in *Escherichia coli*.** *Toxicon*, 72, 81-89.

- 125.- Estrada Sour, O. (2013) **Estrategias para la producción de una conotoxina por DNA recombinante** (tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- 126.- Shagger, H., & von Jagow, G. (1987). **Tricine-SDS-PAGE for the separation of proteins in the 1–100 kDa range.** *Anal Biochem*, 168, 368-379.
- 127.- Sticke, D. F., Presta, L. G., Dill, K. A., & Rose, G. D. (1992). **Hydrogen bonding in globular proteins.** *Journal of molecular biology*, 226(4), 1143-1159.
- 128.- Privalov, P. L., & Gill, S. J. (1988). **Stability of protein structure and hydrophobic interaction.** *Advances in protein chemistry*, 39, 191-238.
- 129.- Burley, S. K., & Petsko, G. A. (1988). **Weakly polar interactions in proteins.** *Advances in protein chemistry*, 39, 125-189.
- 130.- Betz, S. F. (1993). **Disulfide bonds and the stability of globular proteins.** *Protein Science*, 2(10), 1551-1558.
- 131.- Kumar, S., & Nussinov, R. (2002). **Close-range electrostatic interactions in proteins.** *ChemBioChem*, 3(7), 604-617.
- 132.- Al-Haggar, M., Madej-Pilarczyk, A., Kozłowski, L., Bujnicki, J. M., Yahia, S., Abdel-Hadi, D., ... & Puzianowska-Kuznicka, M. (2012). **A novel homozygous p. Arg527Leu LMNA mutation in two unrelated Egyptian families causes overlapping mandibuloacral dysplasia and progeria syndrome.** *European Journal of Human Genetics*, 20(11), 1134-1140.
- 133.- Brandts, J. F., Halvorson, H. R., & Brennan, M. (1975). **Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues.** *Biochemistry*, 14(22), 4953-4963.
- 134.- Fischer, G., Bang, H., & Mech, C. (1984). **Nachweis einer Enzymkatalyse für die cis-trans-Isomerisierung der P eptidbindung in prolinhaltigen Peptiden.** Akademie-Verlag.
- 135.- Schmid, F. X. (1993). **Prolyl isomerase: enzymatic catalysis of slow protein-folding reactions.** *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 22(1), 123-143.
- 136.- Hayano, T., Takahashi, N., Kato, S., Maki, N., & Suzuki, M. (1991). **Two distinct forms of peptidylprolyl-cis-trans-isomerase are expressed separately in periplasmic and cytoplasmic compartments of *Escherichia coli* cells.** *Biochemistry*, 30(12), 3041-3048.

137.- Grathwohl, C., & Wüthrich, K. (1976). **The X-Pro peptide bond as an nmr probe for conformational studies of flexible linear peptides.** *Biopolymers*, 15(10), 2025-2041.

138.- Keiler, K. C., Silber, K. R., Sauer, R. T., Downard, K. M., Papayannopoulos, I. A., & Biemann, K. (1995). **C-terminal specific protein degradation: Activity and substrate specificity of the Tsp protease.** *Protein Science*, 4(8), 1507-1515.

139.- Parsell, D. A., Silber, K. R., & Sauer, R. T. (1990). **Carboxy-terminal determinants of intracellular protein degradation.** *Genes & development*, 4(2), 277-286.

11. – Anexos

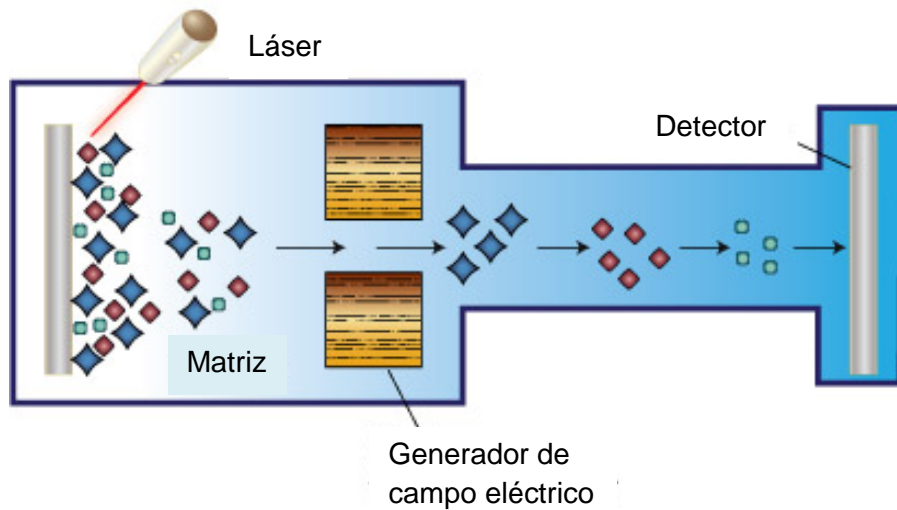
11.1. – MALDI-TOF

MALDI-TOF, por sus siglas en inglés, MALDI (*desorción/ionización láser asistida por matriz*) y TOF (*tiempo de vuelo*), es una técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas. Se usa principalmente para detectar y analizar biopolímeros, como: oligosacáridos, nucleótidos y proteínas.

La metodología utilizada en MALDI-TOF está dividida en tres pasos. Primero, se mezcla la muestra a analizar con una *matriz*, que es un compuesto orgánico, con el propósito de facilitar el proceso de ionización. La matriz utilizada debe ser soluble en agua, no tiene que ser muy volátil o químicamente muy agresiva. La matriz y el analito deben de mezclarse perfectamente para que la técnica pueda llevarse a cabo. Las proporciones óptimas están en el rango de 1:1000 a 1:10,000 (analito-matriz), es decir, las moléculas del analito están rodeadas totalmente por la matriz. Después, la mezcla es colocada en una placa de acero inoxidable y se deja evaporar, quedando la muestra en estado sólido. El segundo paso consiste en someter a la muestra al vacío e irradiarla con un láser UV (337 nm por 0.5-20 ns). La energía del láser es absorbida por la matriz, provocando su ablación y llevando consigo al analito; durante este proceso el analito es ionizado. Por último, la mezcla gaseosa que se originó es sometida a un campo eléctrico que acelera las partículas hasta un detector. El tiempo que las partículas tardan en llegar al detector es directamente proporcional a su tamaño, por lo tanto, las partículas más pequeñas llegarán primero. El detector del espectrómetro calcula esto como la relación *masa/carga* (m/z) y ya que esta técnica produce, generalmente, iones con una sola carga, el espectro muestra las masas de los compuestos analizados en *Daltons*. La altura de los picos depende del número de iones detectados para cada compuesto.

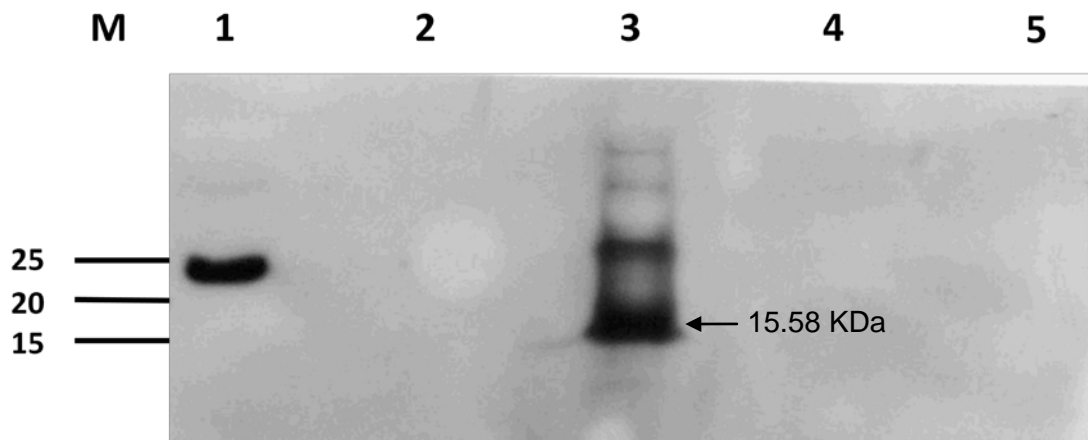
Al tratarse de un método de ionización suave, los iones que se generan no son fragmentados y es posible analizarlos más fácilmente. Además, no se utiliza calor

para ionizar, lo que permite salvaguardar la integridad del analito, en especial de muestras sensibles a la temperatura, como las biomoléculas.



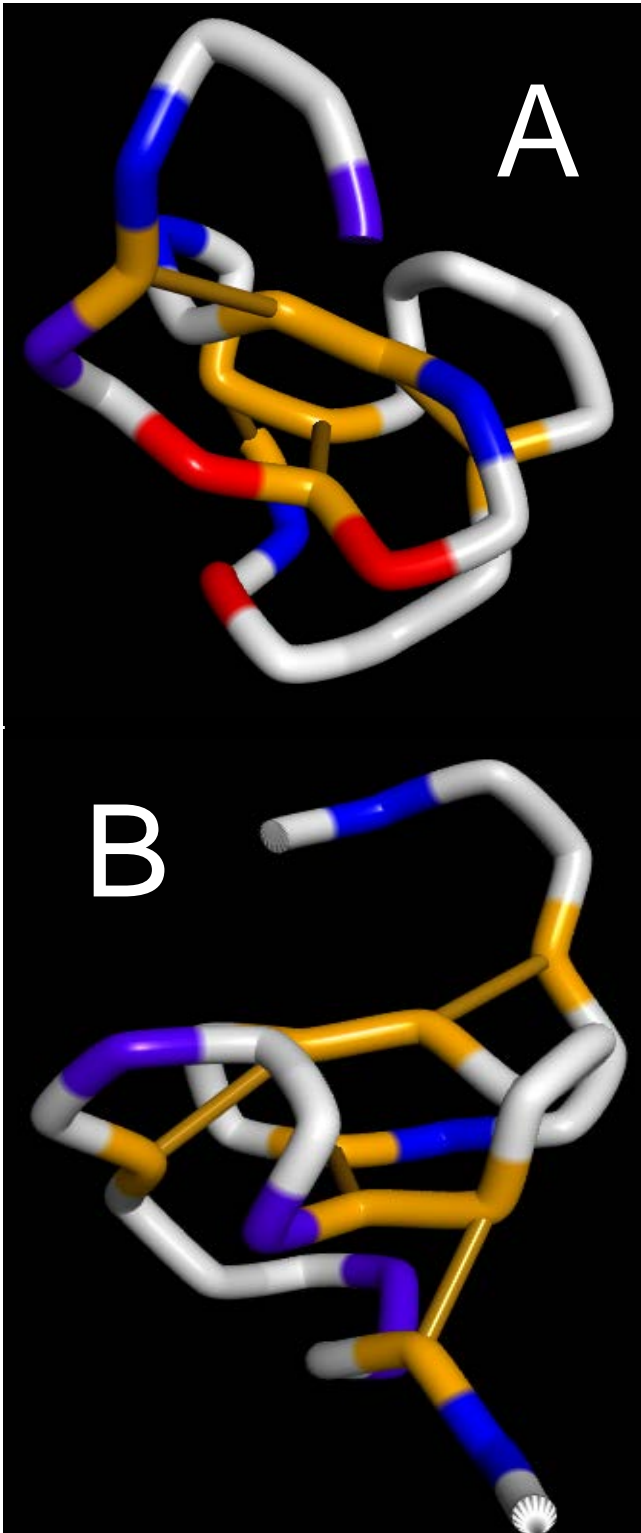
Esquema típico de MALDI-TOF

11.2.- *Western Blot* (anti-His-tag) de la proteína de fusión His-Lipo-ViTx



Western Blot de la proteína de fusión His-Lipo-ViTx. **Carril M**, marcador de peso molecular; **carril 1**, Cargado de la muestra, **carril 2**, Lavado con 10mM de Imidazol, **carril 3**, Elución con 250 mM de Imidazol (proteína de fusión), **carril 4**, Lavado con 250 mM de Imidazol, **carril 5**, Lavado con agua desionizada.

11.3.- Modelos estructurales de las conotoxinas ViTx y Sr11a



Modelos estructurales de las conotoxinas Sr11a (A) y ViTx (B). Los residuos positivos y negativos están coloreados de azul y rojo respectivamente. Las prolinas están coloreadas de morado. Las cisteínas y los enlaces disulfuro están coloreados de amarillo.

Para regularizar la estructura se realizó una dinámica molecular clásica utilizando el programa GROMACS con un modelo de agua tipo TIP4P (Transferible Intermolecular Potential Four Points). La temperatura fue 298 K. El tiempo de simulación fue de 1ns.