



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA TsTxKB EN EL SISTEMA DE EXPRESIÓN
PET 3A**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO

PRESENTA

DANIEL LUNA LAVIADA

CIUDAD DE MÉXICO

AÑO 2018





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: ANA ADELA SÁNCHEZ MENDOZA

VOCAL: JOSÉ FEDERICO DEL RÍO PORTILLA

SECRETARIO: JUAN GÓMEZ DUEÑAS

1er. SUPLENTE: VANESSA REBECA MAYA AMPUDIA

2° SUPLENTE: JOSÉ CARLOS PAÉZ FRANCO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE BIOMACROMOLÉCULAS I, INSTITUTO DE QUÍMICA,
UNAM**

ASESOR DEL TEMA:

DR. JOSÉ FEDERICO DEL RÍO PORTILLA

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. GUSTAVO ALFREDO TITAX DELGADO

SUSTENTANTE:

DANIEL LUNA LAVIADA

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Se agradece por otorgado por DGAPA mediante el proyecto PAPITT con clave IN207016 y a CONACYT por el apoyo dado a través del proyecto con clave 166472. Financiamientos aportados para el desarrollo de investigación en el laboratorio de biomacromoléculas I del Instituto de Química de la U.N.A.M.

Abreviaturas

Acetonitrilo	ACN
Ácido desoxirribonucleico	ADN
Ácido nitriloacético	NTA
Cromatografía de Afinidad Metal-Quelato	CAMQ
Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	HPLC
Densidad óptica a 600 nm	OD ₆₀₀
<i>Escheriquia Coli</i>	<i>E.coli</i>
Espectrometría de Masas Asistida por matriz con analizador de iones de tiempo de vuelo	MALDI-TOF
Espectroscopía UV-Visible	UV-Vis
Extracción en fase sólida	EFS
Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido	IPTG
Lactosa	Lac
Miliunidad de absorbancia por sus siglas en inglés	<i>mAU</i>
Operón Lac	<i>O Lac</i>
Relación Masa/carga	m/Z
Resonancia Magnética Nuclear	RMN
Revoluciones por minuto	r.p.m.
Solución Amortiguadora de Ruptura celular	BL
<i>Tityus serrulatus</i>	<i>T.serrulatus</i>
Toxina recombinante <i>TsTxKβ</i>	<i>TsH</i>
Tris (hidroximetil) aminometano	Tris

Índice de figuras, tablas y ecuaciones

Figura. 1	1
Figura. 2	2
Figura. 3	2
Figura. 4	3
Figura. 5	4
Figura. 6.....	6
Figura. 7.....	7
Figura. 8.....	8
Figura. 9.....	8
Figura. 10.....	9
Figura. 11.....	11
Figura. 12.....	13
Figura. 13.....	14
Figura. 14	17
Figura. 15	18
Figura. 16	20
Figura. 17	21
Figura. 18	21
Figura. 19	22
Figura. 20	23
Figura. 21.....	24
Figura. 22.....	25
Figura. 23	26
Figura. 24	28
Figura. 25	28
Figura. 26	30
Figura. 27	30
Figura. 28	31
Figura. 29	32
Tabla. 1	19
Tabla. 2	24
Tabla. 3	27
Ecuación. 1	11
Ecuación. 2	12
Ecuación. 3	12

1	Introducción	1
2	Marco Teórico	2
2.1	Péptidos y proteínas	2
2.2	Estructura de las proteínas	3
2.1	Toxinas	4
2.2	Canales de potasio	5
2.3	Sistemas de expresión heteróloga	5
2.3.1	Ácido desoxirribonucleico (ADN)	5
2.4	Empleo de biología molecular para obtener la proteína deseada	6
2.5	Técnicas de Purificación	8
2.5.1	Cromatografía	8
2.5.2	Cromatografía de afinidad Metal-quelato (CAMQ)	8
2.5.3	Extracción en fase Sólida (EFS)	9
2.5.4	Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	9
2.6	Técnicas de caracterización	10
2.6.1	MALDI-TOF	10
2.6.2	Resonancia Magnética Nuclear de H ¹	11
2.6.3	Resonancia Magnética Nuclear para determinar estructura de proteínas	12
2.7	Toxina TsTxK β	13
3	Planteamiento del problema	15
4	Justificación del proyecto	15
5	Hipótesis	16
6	Objetivos	16
6.1	Objetivo General	16
6.2	Objetivos particulares	16
7	Metodología	17
7.1	Diseño Génico de la toxina recombinante <i>TsH</i>	17
7.1.1	Transformación	18
7.1.2	Cinética de producción	18
7.1.3	Inoculación e Inducción	19
7.1.4	Lisis celular y purificación	19
8	Resultados y análisis de resultados	20
8.1	Transformación	20
8.2	Producción	22
8.3	Purificación	23
8.4	Optimización de la purificación	25
8.4.1	Optimización de los métodos de purificación por medio de la CAMQ	26
8.5	Determinación de las condiciones para la EFS	27
8.6	Optimización de los gradientes en HPLC	27
8.6.1	Producción con cepa BL21 (DE3)	29
9	Conclusiones	33
10	Perspectivas	34
	Anexo I	37
	Anexo II Caracterización por técnicas espectroscópicas	38
	Anexo 3 Aminoácidos	39

1 Introducción

Los alacranes son arácnidos que han habitado la tierra durante aproximadamente 430 millones años. Estos animales moran en prácticamente todo el planeta; sin embargo, es más común encontrarlos en zonas muy cálidas como desiertos o selvas (Gopalakrishnakone et al. 2015; Possani 2005).

Su cuerpo se divide en 3 secciones: un cefalotórax, un abdomen y las extremidades (figura 1). El cefalotórax es la parte superior; está comprendida por la cabeza y el tórax, los cuales están recubiertos por un caparazón constituido por carcinina o queratina. El abdomen está comprendido por el mesozoma y por la cola, en donde se encuentran las vesículas secretoras de veneno y el aguijón (Gopalakrishnakone et al. 2015; Pucca et al. 2015; Flamini 2003; Martin-Eauclaire et al. 2016).

A lo largo de los años, los alacranes han adquirido distintos mecanismos de defensa, siendo el más trascendente el veneno; el cual es una mezcla de enzimas, sales y péptidos. Los péptidos son los compuestos más activos y son preferentemente toxinas. El veneno es inyectado a su víctima por el aguijón presente en la cola. De las 2100 especies que se conocen, solo 35 presentan toxicidad en los seres humanos (Martin-Eauclaire et al. 2016).



Figura. 1
Imagen del alacrán *Tityus serrulatus*.

El escorpión más mortífero de Brasil, es el *Tityus serrulatus* (figura 1) (*Ts*), coloquialmente llamado “Alacrán sierra amarilla” por las crestas que presenta en el mesozoma y en la cola, las cuales tienen similitud a los dientes de una sierra. Este alacrán llega a medir 7 cm de largo y por lo general habita en la zona sur del país. También se han encontrado especímenes en ciudades como San Paulo y Brasilia (Martin-Eauclaire et al. 2016).

Los síntomas de la picadura de este alacrán son: inflamación en la zona, parálisis, sudoración, vómito, hipertensión, alteraciones neurológicas, fallas cardiorrespiratorias, edema pulmonar y fallas circulatorias. Los síntomas descritos se atribuyen a las toxinas que interactúan con los canales iónicos de potasio (Martin-Eauclaire et al. 2016).

Desde el pasado, se ha estudiado el efecto de las toxinas del veneno sobre sobre la víctima para así desarrollar antídotos o para usar las cualidades tóxicas de algunos elementos del veneno para combatir enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer (Flores-Solís et al, 2016).

2 Marco Teórico

2.1 Péptidos y proteínas

Los péptidos y proteínas son las biomacromoléculas más abundantes en los seres vivos ya que constituyen más del 50% del peso de las células sin agua (Bradshaw 2006). Estas macromoléculas son cadenas poliméricas de aminoácidos enlazados por medio de enlaces peptídicos (amidas formadas por la condensación del carboxilo terminal de un aminoácido y la amina del siguiente aminoácido (figura 2).

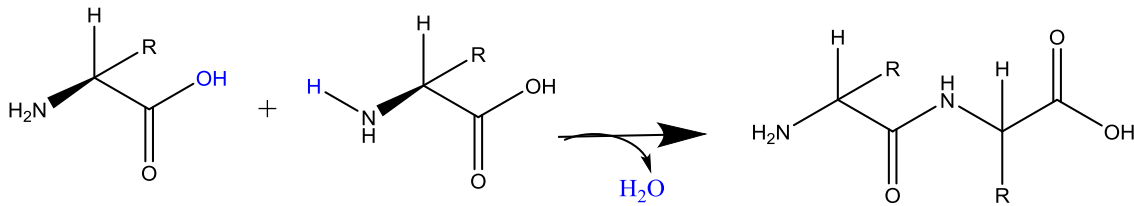


Figura. 2
Formación de un enlace peptídico.

Las proteínas están conformadas por numerosas combinaciones de 20 aminoácidos (Anexo III), donde estos aminoácidos tienen un carbono alfa (C_{α}) con una estereoisomería L. El C_{α} está unido a un grupo amino ($-NH_2$), un grupo carboxilo ($-COOH$), un hidrógeno ($-H$) y un grupo $-R$ (que puede ser un H o una cadena lateral (figura 3).

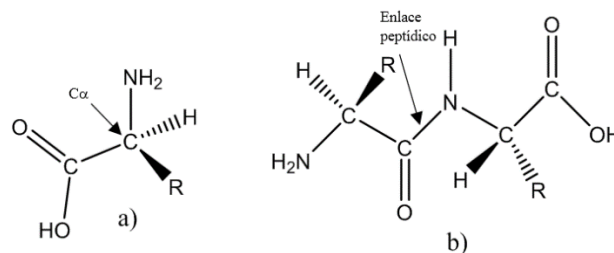


Figura. 3
a) Estructura general de un aminoácido. b) Ejemplo de un enlace peptídico.

La distinción entre los péptidos y las proteínas es algo ambigua, por la diferencia de puntos de vista con los autores; sin embargo, para este trabajo, se considerará la siguiente clasificación: un péptido es aquel polímero que esté constituido hasta por cien aminoácidos y una proteína es aquel polímero que sobre pase los 100 aminoácidos (Lawrence and Robertson, 2000; Lehninger and Cox, 2001; Stoker, 2010).

2.2 Estructura de las proteínas

El primer nivel de estructura estudia la unión covalente de los residuos la secuencia que presentan los aminoácidos a lo largo de una cadena polipeptídica y la posible conectividad de dos cisteínas unidas por la oxidación de los azufres, llamados enlaces disulfuro (figura 4) (Fallis 2013). En este nivel, no se estudia la disposición espacial que adopte una conformación específica.

Para leer la estructura primaria de una proteína se traducen a los aminoácidos del amino terminal al carboxilo terminal, siendo una secuencia única para cada proteína (Whitford, 2005).

El segundo nivel de estructura describe las conformaciones, resultado de interacciones a corto y a mediano alcance que un aminoácido tiene con otro dentro de una cadena específica. Estas interacciones promueven una secuencia repetitiva a lo largo del péptido, formando motivos estabilizados mediante puentes de hidrógeno, es decir, adquiere una conformación donde los ángulos de torsión de los enlaces peptídicos generan estructuras repetitivas como: α hélice u hoja β (van Holde, Johnson and Shing Ho, 2006; Walker and David, 2008; Fallis, 2013).

El nivel terciario se debe a la disposición tridimensional que presentan todos los átomos de la proteína (Lehninger and Cox, 2001). Se estudian las posibles conformaciones tridimensionales otorgadas por las interacciones a largo alcance de un aminoácido con otro de la misma cadena. Las interacciones suelen ser: interacciones no covalentes de un aminoácido de un motivo estructural con otro aminoácido de un motivo distinto, o puentes disulfuro formados con la oxidación de dos cisteínas en diferentes motivos estructurales. Mediante estas interacciones, varios dominios asociados y unidos covalentemente, presentan una orientación y configuración para realizar una actividad biológica determinada, conformación que se llama plegamiento (Lehninger and Cox, 2001).

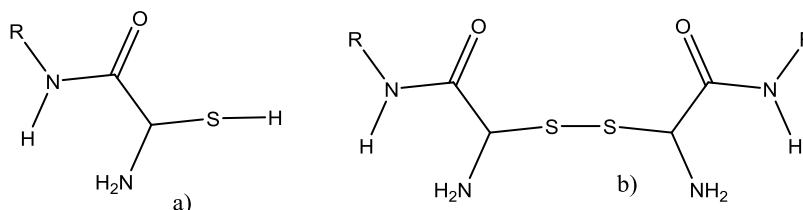


Figura. 4

a) Una cisteína reducida. b) Un puente disulfuro.

El último nivel es la estructura cuaternaria. Este nivel de estructura estudia la conformación tridimensional adquirida por las interacciones a largo alcance que presentan 2 o más cadenas polipeptídicas independientes con estructura terciaria definida (dominios), que forman un arreglo con actividad biológica (Fallis 2013; Nelson et al. 2011; Yamaguchi & Miyazaki 2014). Las interacciones que dirigen y

estructuran a los dominios son las mismas que estabilizan la estructura terciaria; éstas son el gran número de interacciones no covalentes. El arreglo de distintas cadenas polipeptídicas otorga al complejo una gran número de ventajas como el incrementar la actividad biológica que un solo complejo tendría, aumentar la eficiencia enzimática de un complejo al incrementar la cantidad de actividad biológica disminuyendo la cantidad de sustratos, prepara un sustrato para otro complejo enzimático, un arreglo estructural, entre otros (Lehninger and Cox, 2001; Whitford, 2005; Fallis, 2013). Todos los niveles enunciados se presentan visualmente en la figura 5.

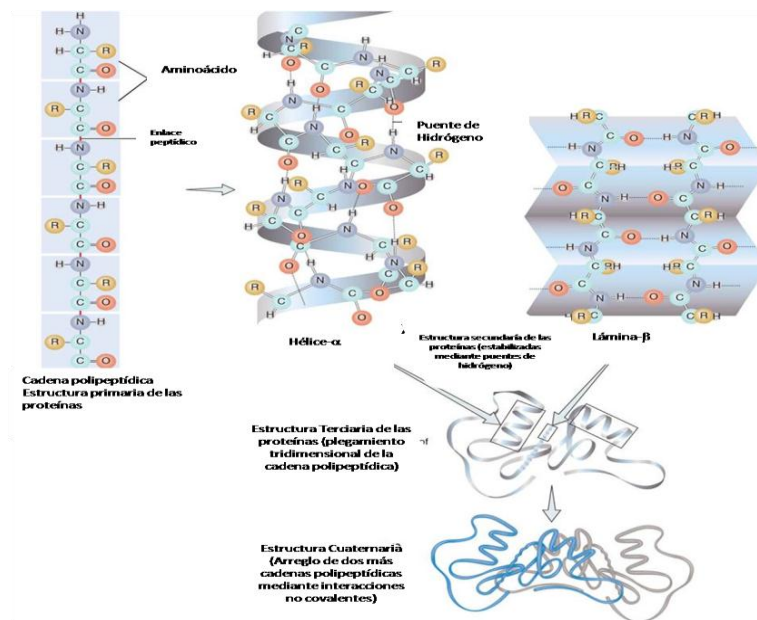


Figura. 5

Diferentes niveles de estructura de las proteínas imagen modificada de http://www.uaz.edu.mx/histo/TortorAna/ch02/02_22.jpg.

2.1 Toxinas

Una toxina se define como un compuesto químico que provoca falla sistémica en otro organismo. Las toxinas pueden ser complejos como péptidos y proteínas de gran número de aminoácidos, así como compuestos de bajo número de carbonos. Los péptidos tóxicos de alacrán con actividad en canales iónicos se clasifican según el canal que inhibe, la especie del alacrán que produce la toxina y el número de aminoácidos que ésta contiene (Zhu et al., 2010, Tytgat et al., 1999).

Esta clasificación se divide en 4 familias, dependiendo el canal que ataca:

- Familia I Péptidos inhibidores de canales de Sodio.
- Familia II Péptidos inhibidores de canales de Potasio.

- Familia III Péptidos Inhibidores de canales de Calcio.
- Familia IV Péptidos Inhibidores de canales de Cloro.

Donde la familia II se puede subdividir por el número de aminoácidos y por el número de puentes disulfuro presentes en el péptido. Con estos parámetros, se mencionará la clasificación Tytgat (Tytgat et al. 1999):

- α -KTx son péptidos de una cadena pequeña entre (23 y 43 aminoácidos). Este tipo de péptidos tienen el motivo estructural α/β y están estabilizados por tres o cuatro puentes disulfuro (Tytgat et al. 1999).
- β -KTx son péptidos de cadena entre 53 y 68 aminoácidos. Este tipo de estructura posiblemente presenta motivo de α/β y tienen 3 puentes disulfuro. Hasta el año 2015, se han descrito 20 diferentes péptidos con estas características y con una similitud en estructura primaria mayor al 50%. Además, se ha encontrado que algunas toxinas de esta clasificación tienen una secuencia de 6 a 8 aminoácidos, al cual se le denomina propéptido (Zhu et al. 2010).
- γ -KTx son péptidos de 36 a 46 aminoácidos con 3 o 4 puentes disulfuro. Este tipo de toxina ataca canales ERG y presenta el motivo estructural α/β .
- κ -KTx son toxinas con motivo estructural α/α (Chagot et al. 2005).

2.2 Canales de potasio

Los canales de potasio son proteínas hidrofóbicas. Éstas son proteínas transmembranales presentes en la mayoría de las células. Estas proteínas forman un poro que permite el paso selectivo a iones de K^+ del exterior de la membrana al interior de la célula (Martin-Eauclaire et al. 2016; Zhu et al. 2010; Labarca & Latorre 2005). Los canales, dependiendo de la señal fisiológica con la que se regulan, se clasifican en:

- Canales regulados por diferencia de potencial: estas proteínas transmembranales presentan un conjunto de 6 dominios estructurales que forman un poro. Ejemplo: Kv 1.1 Kv 1.2 (Labarca & Latorre 2005).
- Canales con combinación tándem: canales resultado de la combinación de los 2 poros, que pueden formar 4 arreglos de 6 dominios cada uno (Martin-Eauclaire et al. 2016; Zhu et al. 2010)(Labarca & Latorre 2005).

2.3 Sistemas de expresión heteróloga

2.3.1 Ácido desoxirribonucleico (ADN)

La célula almacena toda la información genética de la producción de las proteínas dentro del ácido desoxirribonucleico (ADN). El ADN se compone de un azúcar (desoxirribosa), una base nitrogenada (que puede ser púrica, como la adenina o

la guanina, o pirimidínica como la timina o la citosina) (figura 6) y grupo fosfato que los enlaza en forma de fosfodiéster (Walter & David, 2008). El ADN está constituido por dos cadenas de bases nitrogenadas, las cuales con complementarias de una base púrica y una base pirimidínica, que se estabilizan mediante puentes de hidrógeno formados por ambas bases. La complementariedad se da con la siguiente relación: adenina con timina y citosina con guanina (figura 6) (Lehninger and Cox, 2001; Whitford, 2005; Walker and David, 2008; Stoker, 2010).

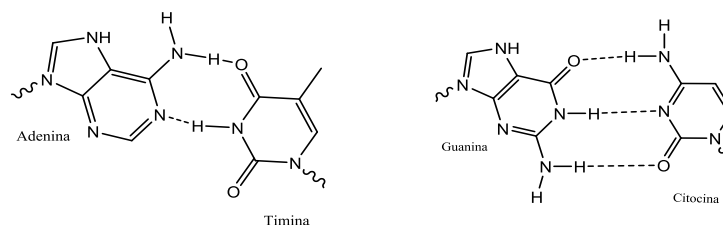


Figura. 6
Bases nitrogenadas (Walker & David 2008).

Esta macromolécula presenta dos funciones principales: la primera es preservar la información genética y transmitirla a las nuevas generaciones, y la segunda es servir de molde para poder generar las moléculas necesarias (ARN) para producir las proteínas que se requieran, como se mencionó anteriormente. La información es almacenada en secuencias específicas de 3 bases nitrogenadas, las cuales se leen de 3' a 5' (tomando de referencia los carbonos 3 y 5 de la desoxirribosa) (Horton et al., 2011, Walker & David, 2008).

2.4 Empleo de biología molecular para obtener la proteína deseada

El obtener la toxina nativa de un alacrán es un proceso arduo. La ordeña de los arácnidos se lleva a cabo mediante estímulos eléctricos, los cuales hacen que el espécimen secrete una mínima cantidad de veneno y se requiere que el animal repose al menos 2 semanas para ordeñarlo nuevamente (Gopalakrishnakone et al. 2015).

Se estima que, para obtener al menos 10 mg de toxina, se requiere ordeñar al menos 5,000 alacranes. Siendo esto muy complicado, se aísla la toxina de interés y se sintetiza mediante biología molecular.

El primer paso es secuenciar la composición de la proteína y traducir a un segmento de ADN, el cual se inserta en un organismo distinto para que este lo sobre exprese (Lehninger and Cox, 2001).

Para lograrlo, se requiere que el ADN deseado se coloque en una secuencia auto replicable como el factor T7, empleado en los vectores pET (Novagen® Inc.) entre dos sitios de restricción. El factor T7 es una secuencia de ADN proveniente del bacteriófago del mismo nombre, encargada de sintetizar la proteína T7/ARN polimerasa que, a su vez, permita que sobreexpresen una secuencia de ADN insertada entre los sitios de restricción establecidos (Novagen 2003). Para la expresión de la secuencia agregada al vector, se emplean cepas de *E. coli* dotadas por una secuencia de ADN de otro bacteriófago conocido como λ , el cual promueve la expresión de ARN polimerasa (figura 7) (Novagen, 2003).

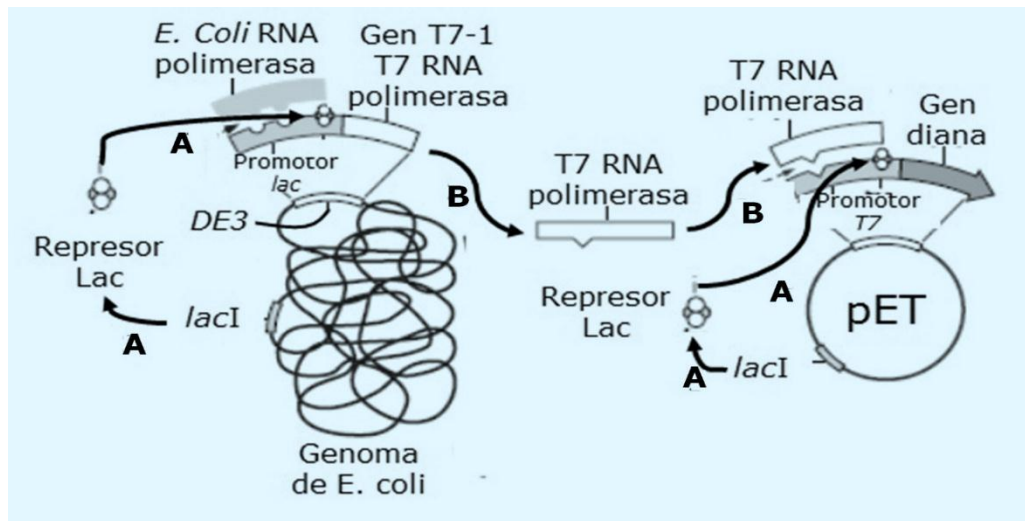


Figura. 7

Mecanismo de cómo funciona la inducción con IPTG del operón *Lac* (Novagen 2003).

Para poder regular la expresión de la proteína se emplea el operón de la lactosa. El operón de la lactosa (*O Lac*) es una secuencia de genes que permite medirse al agregar un inhibidor competitivo de la alolactosa, conocido como Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido o IPTG (figura 8). El inhibidor se une a la secuencia represora de este operón (*Lac O*) y deja libre el camino para que siga la traducción de la ARN polimerasa (Novagen 2003; Nelson et al. 2011; Sneppen & Zocchi 2005; Fallis 2013; Walker & David 2008).

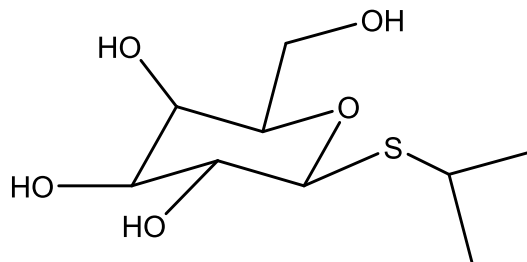


Figura. 8

Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).

El organismo más empleado es la *E. coli*. Esta bacteria tiene la ventaja que expresa proteínas de manera fidedigna, es decir, que no realiza modificaciones postraduccionales en las proteínas que produce. También es elegida por su fácil manipulación en el crecimiento de las colonias y por su fácil ruptura celular, para obtener la proteína deseada (Novagen 2003).

Una estrategia para la purificación de las toxinas recombinantes es adicionar a la toxina con secuencias únicas de aminoácidos que ayuden en la producción o purificación de lo deseado. Este es el caso de dotar a la proteína que se requiere con una cola de 6 histidinas para separarla posteriormente, por cromatografía de metal quelato (figura 9).

2.5 Técnicas de Purificación

2.5.1 Cromatografía

La cromatografía es un conjunto de técnicas para separar una mezcla en sus distintos componentes. Su fundamento son las distintas interacciones fisicoquímicas que presentan los analitos de una muestra contenidas en una fase móvil con una fase estacionaria. Al pasar la fase móvil a través de la fase estacionaria, los compuestos de la mezcla son retenidos y eluyen a distintas velocidades, permitiendo la separación de cada compuesto en distintas fracciones de disolvente (Christian 2006).

2.5.2 Cromatografía de afinidad Metal-quelato (CAMQ)

Esta es una técnica que consiste en dotar a la proteína con un grupo quelante (el conjunto de 6 histidinas). La proteína se hace pasar por una columna llamada Histag® (figura 9).

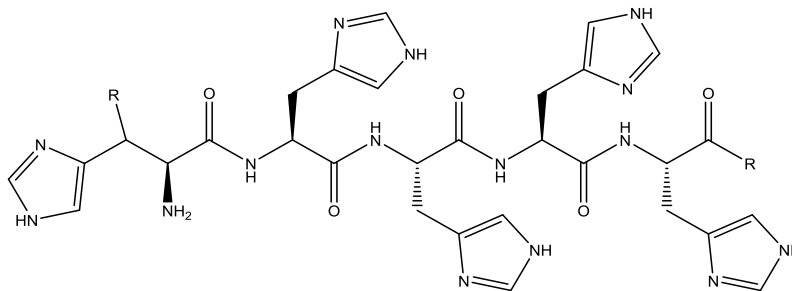


Figura. 9

Histag® (conjunto de 6 histidinas, adicionada a la proteína para poder retener en columna de afinidad metal quelato).

La proteína con la modificación se coordina a un metal que forma complejos octaédricos, soportado a una fase estacionaria de agarosa químicamente modificada en una fase como el ácido nitriloacético (*NTA*) (figura 10). En el proceso cromatográfico se descarta todo aquello que tiene poca o nula afinidad por el metal (Manuscript & Nanostructures 2008; Bornhorst & Falke 2000).

Para poder eluir a la proteína de interés de la fase estacionaria, se hacen pasar concentraciones de imidazol a través de la columna, este compuesto tiene mayor afinidad a coordinarse con el metal y desplaza a la proteína que se había complejoado al metal (Hengen 1995).

Por lo general se emplean los siguientes metales: Níquel²⁺, Cobalto²⁺, Cobre²⁺ y Cinc²⁺.

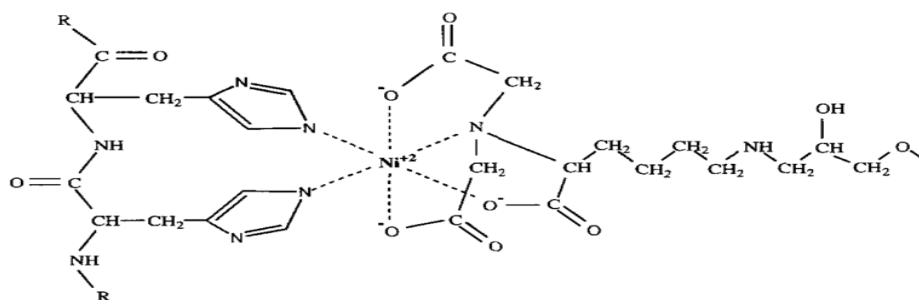


Figura. 10

Diagrama de cómo se lleva a cabo la complejación de la proteína en Ni²⁺ soportado en *NTA* (Bornhorst & Falke, 2000).

En este proyecto se empleó el Níquel²⁺ como metal quelante.

2.5.3 Extracción en fase Sólida (*EFS*)

Esta técnica de purificación es una cromatografía en la cual se emplea una fase estacionaria de polidimetilsilohexano o PDMS modificada con una cadena hidrofóbica (Phenomenex, 2005). Como fase móvil se requiere un compuesto de polaridad media miscible con el agua, para que ocurra la partición entre la mezcla y el PDMS químicamente modificado. En este proyecto se emplea como un método de purificación de péptidos al descartar algunos péptidos que se retendrán en la columna del *HPLC*.

2.5.4 Cromatografía de líquidos de alta resolución (*HPLC*)

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia es unas de las técnicas más empleadas en la actualidad. Esta es una cromatografía que se puede desarrollar de dos maneras: en fase normal o en fase reversa. La fase normal consiste

separar compuestos polares y la fase reversa se emplea para la separación de compuestos poco polares (Christian 2006).

Las proteínas son compuestos hidrófobos por lo que la separación es en fase reversa (Bradshaw 2006; Jungbauer et al. 2004; Gopalakrishnakone et al. 2015); es decir, se coloca una columna poco polar, generalmente se emplea una columna de (PDMS), con sílice modificada con distintos compuestos de cadena lateral, las más empleadas para la separación son las columnas C4, C5, C12, C18 y columna de fenilos. Las proteínas por lo general, están disueltas en distintas soluciones amortiguadoras. Las proteínas se encuentran cargadas, lo que no permite que tengan cuasi-equilibrios con la columna de fase reversa. Para contrarrestar esto se usa ácido trifluoro acético en bajas concentraciones (alrededor de 0.5%)(Bradshaw 2006).

2.6 Técnicas de caracterización

2.6.1 MALDI-TOF

La espectrometría de masas es una herramienta esencial para toda caracterización de compuestos químicos. Su fundamento es formar iones de un compuesto con un haz láser, los cuales se separan por relación masa carga, y se identifican a través de una respuesta eléctrica. El incidir un rayo láser sobre una molécula promueve la fragmentación de la misma con un patrón característico, es decir, se generaran determinados iones de relación m/Z distintos que tendrán una abundancia particular. La gráfica de la abundancia en función de m/Z , es llamado espectro de masas (Silverstein M. Robert, Webster X. Francis 2005).

Con una macromolécula, no es recomendable una ionización fuerte, ya que se generarían una cantidad inimaginable de iones que al graficarse no darán mayor información de conectividad. Una alternativa a esto es una técnica de ionización suave, con la cual solo se formará un solo ion con el que se puede determinar la masa molar de las macromoléculas. En el análisis de proteínas la más usada es la ionización por desorción asistida por láser de una matriz (*MALDI*). La matriz es un compuesto orgánico y aromático, de masa molar pequeña con capacidad de absorber un rayo láser, y formar un cocrystal con el analito de interés, para que la molécula sea ionizada. Sobre la matriz se hace incidir un láser de longitud de onda en el intervalo del UV sobre el cocrystal formado, haciendo que el compuesto aromático de la matriz absorba la mayoría del haz láser, provocando que la matriz en su conjunto se excite y se generen iones protonados. El láser otorga un exceso de energía rápidamente a la muestra, la cual se eleva a temperaturas cercanas a 1000°C, permitiendo que una evaporación casi instantánea. El vapor acarrea moléculas neutras del analito, donde se transfiere energía de las moléculas protonadas de la matriz a las del analito, que presentan mayor afinidad a protones de las moléculas protonadas de la matriz, generando un ion $[M+H]^+$ (Greaves & Roboz 2014).

La selección de la matriz a usar depende de la cantidad de energía que se quiera suministrar, por ejemplo, para el análisis de péptidos con masa menor a 10 KDa se usa el ácido alfa-ciano-hidroxicinámico (Greaves & Roboz 2014).

Este análisis de masas es usado para conocer las propiedades estructurales primarias de la cadena peptídica, proporcionando la masa molar de la macromolécula. La masa molecular puede dar la información del estado de oxidación de los puentes disulfuro. Mediante esta técnica es posible encontrar la conectividad de los puentes disulfuro si se hidroliza la proteína enzimáticamente de forma selectiva.

2.6.2 Resonancia Magnética Nuclear de H¹

Los núcleos atómicos están constituidos de protones y neutrones. Los núcleos que presentan un número impar de nucleones, presentan un espín distinto de 0. Todas las partículas cargadas tiene esta propiedad cuántica (Keeler 2010). Al someter los núcleos de momento angular de espín 1/2 en un campo magnético externo, se alinearán a favor o en contra del campo, generando dos niveles poblacionales con poca energía (figura 11). Para que la transición energética de un estado energético a otro, se requieren grandes longitudes de onda, como ondas de radio para llevarse a cabo (Requena & Zúñiga 2008).

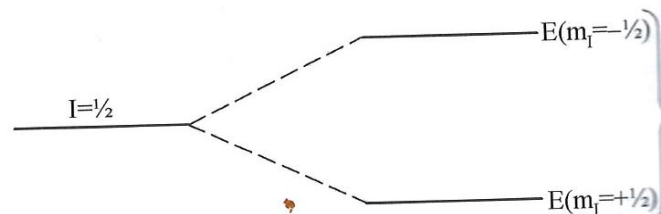


Figura. 11

Diagrama de diferencia energética entre poblaciones a favor y en contra del campo magnético (Requena & Zúñiga 2008).

Según la teoría cuántica de Planck (ecuación 1), la transición de un estado energético a otro, requiere una frecuencia específica.

$$\Delta E = \frac{hc}{\lambda} = h\nu$$

Ecuación. 1

Energía según teoría cuántica de Planck donde (h) es la constante de Planck, (λ) es la longitud de onda (c) es la velocidad de la luz y (ν) es la frecuencia (Requena & Zúñiga 2008).

La energía para efectuar la transición de los niveles energéticos generados por el campo magnético externo es proporcional a la constante giromagnética de cada núcleo (γ), al campo magnético externo (B_0), y al ambiente químico (δ) en el cual se encuentra un núcleo. Esta relación se le conoce como las frecuencias de Larmor (eq.2).

$$\nu = -\frac{1}{2\pi}\gamma(1 + \delta)B_0$$

Ecuación. 2

Frecuencias de Larmor donde (γ) es la constante giromagnética del núcleo, (δ) es el desplazamiento químico y (B_0) es el campo magnético suministrado (Requena & Zuñiga, 2005).

Dependiendo del ambiente químico del núcleo, se requiere una energía distinta para la transición energética debido a los efectos paramagnéticos y diamagnéticos, generados por la densidad electrónica que envuelve al núcleo (Mermin et al. 1978), a esta propiedad se le llama desplazamiento químico (δ). Sustituyendo la frecuencia de Larmor (eq.2) en la ecuación de Planck (eq.1) la energía de la transición energética queda:

$$\Delta E = \left(-\frac{h}{2\pi}\gamma(1 + \delta) \right) B_0 = -\hbar(\gamma(1 + \delta)B_0$$

Ecuación. 3

Igualdad de las ecuaciones 1 y 2 (Silverstein M.Robert, Webster X. Francis, 2005; Requena and Zúñiga, 2008; Keeler, 2010,).

2.6.3 Resonancia Magnética Nuclear para determinar estructura de proteínas

El ^1H es el núcleo más observado en RMN por su sensibilidad y su abundancia natural. Idealmente, cada ^1H puede tener un ambiente químico particular y único (figura 15) (Creighton, 1993). En realidad, las señales de ^1H se traslapan, puesto que gran parte de los hidrógenos contenidos en los aminoácidos se encuentran en ambientes químicos similares (Batas and Chaudhuri, 1996; Creighton, 1993; Walker and David, 2008); sin embargo, la presencia de interacciones con el medio que rodea al polipéptido, así como la conformación presente en la proteína debida

a interacciones a corto y largo alcance, permite que cada hidrógeno tenga un ambiente químico particular. El protón de una proteína plegada, posee más interacciones que un protón de una proteína desplegada (Wüthrich *et al.*, 1982; Wüthrich, 2001; Lehninger and Cox, 2001). Las interacciones presentes se deben a las interacciones de un protón con los protones vecinos que se encuentra a 2 o 3 enlaces de distancia, llamada acoplamiento (J) y con las interacciones dipolo-dipolo que generan una transferencia de polarización de un núcleo a otro (acoplamiento dipolar) (Leerle, 2005).

En las proteínas, el espectro de resonancia magnética nuclear de protón puede informar si se tiene un plegamiento adecuado. Se puede determinar, al encontrar múltiples señales bien definidas o resueltas con relativa dispersión en la región de 7-10 p.p.m. debidas a puentes de hidrógeno generados por los protones de residuos laterales con el nitrógeno de una amina y la interacción que tiene un protón con otro (figura 12). Por ejemplo, dos núcleos equivalentes como el protón aromático ϵ^1 de la fenilalanina y el protón aromático ϵ^2 de la tirosina, pueden observarse en señales separadas si se logra un ambiente químico distinto (estabilización por un puente de hidrógeno) y se logra que los anillos aromáticos no roten a gran velocidad con respecto a la escala de tiempo de la RMN (Wüthrich *et al.*, 1982; Creighton, 1993).

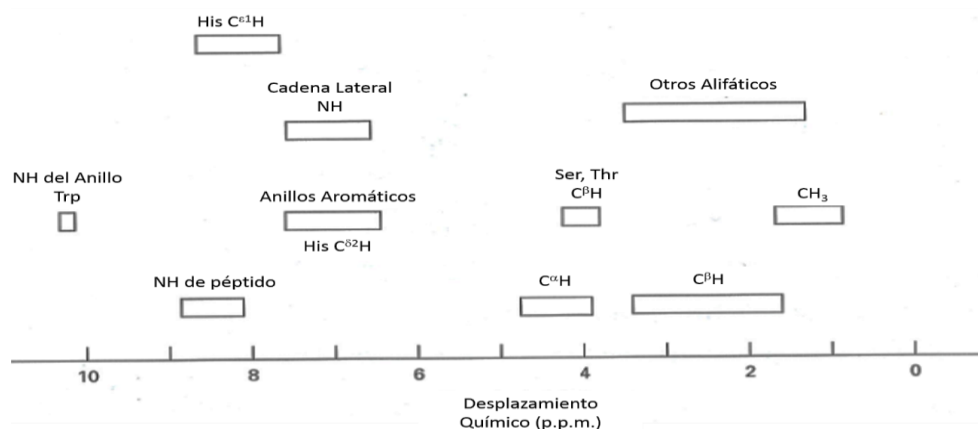


Figura. 12
Desplazamiento químico de los protones de los aminoácidos en proteínas desplegadas (Creighton, 1993).

2.7 Toxina TsTxK β

La *TsTxK β* es un péptido de 60 aminoácidos (figura 13); fue aislado del veneno del *T. serrulatus* por primera vez en 1994 (Legros, Céard, Bougis, & Martin-Eauclaire, 1998; Rowosky, Krueger, Collinst, & Blaustein, 1994). El

descubrimiento de este péptido propuso una nueva familia de toxinas bloqueadoras de canales de potasio, ya que las familias ya conocidas planteaban que debían tener una longitud de entre 23 y 43 aminoácidos con motivos estructurales de α/β (Legros et al. 1998). Este paradigma fue roto cuando se encontraron secuencias de aminoácidos parecidas a las escorpinas, péptidos de 60 aminoácidos, se agregaron a la familia KTx (Zhu et al. 2010).

La primera toxina de la familia II fue la *TsTxK β* (Rowosky et al. 1994), ésta toxina presenta las características de posiblemente de tener motivo estructural α/β .



Figura. 13
Secuencia de la *TsTxK β* , P69940 de Uniprot.net.

3 Planteamiento del problema

El problema a resolver es producir la mayor cantidad posible de la toxina $TsTxK\beta$, de manera soluble y con un plegamiento estable.

4 Justificación del proyecto

El siguiente proyecto tiene la finalidad de optimizar la producción de una toxina recombinante de la $TsTxK\beta$ con un plegamiento definido.

Para producir esta toxina se plantea emplear un vector simple (pET3a) para generar grandes cantidades de $TsTxK\beta$ únicamente. Con ello se evitan problemas propios de usar vectores que requieren múltiples pasos de purificación, lo que genera una disminución en el rendimiento. Entre los problemas destacan:

- Producir la toxina proteína de fusión con proteína chaperona en grandes cantidades y tener gran pérdida en el corte enzimático para separar la toxina.
- La adición de cofactores para el corte enzimático que pueden promover la precipitación de la proteína.
- Realizar un segundo corte químico para obtener solo la toxina deseada, lo que implica otro proceso de purificación.

Con los resultados obtenidos en esta tesis y con estudios posteriores se espera generar las cantidades suficientes para poder obtener la estructura terciaria de la toxina $TsTxK\beta$, la cual no se ha determinado hasta la fecha.

Al proponer y modelar los motivos estructurales que proporcionan el plegamiento adecuado para la inhibición de canales de potasio, se podrían establecer posibles antídotos para esta toxina. Incluso, se podrían plantear terapias para enfermedades crónico-degenerativas, en las cuales se tengan células que sobreexpresen canales iónicos de potasio. Así mismo, se podría buscar otros blancos biológicos de la toxina $TsTxK\beta$.

5 Hipótesis

La proteína *TsTxKβ* será expresada de manera soluble, lo cual implica que tendrá un plegamiento estable definido y tendrá 3 enlaces disulfuro formados. Además se incrementará los rendimientos al evitar un paso adicional en la producción y en la purificación de esta toxina.

6 Objetivos

6.1 Objetivo General

- Producir la toxina *TsTxKβ* sin proteína chaperona dentro de la proteína de fusión, empleando el vector pET3a y observar si se tiene un plegamiento de la toxina recombinante.

6.2 Objetivos particulares

- Probar el sistema de expresión de la toxina recombinante en una cepas específica
- Optimizar tiempo, temperatura y concentraciones de inductor para la producción de la toxina recombinante.
- Purificación de la toxina en cromatografía afinidad metal-quelato (CAMQ), así como en cromatografía líquida de alta resolución (*HPLC*).
- Caracterizar la toxina por técnicas espectroscópicas.

7 Metodología

7.1 Diseño Génico de la toxina recombinante *TsH*

A continuación se muestran los mapas génicos de la *TsTxK β* , la cual denominaremos con (*TsH*).

Se diseñó el plásmido de trabajo (figuras 14 y 15):

```
      5      10      15      20      25      30      35      40      45      50
catatgaaactggtggcgctgatccccgaacgaccagctgcgtagcattctgaaagcggtg
  H M K L V A L I P N D Q L R S I L K A V

      55      60      65      70      75      80      85      90      100  105
gttcacaaggttgcgaaaacccaattcggttgcccggcgtagcaggggctattgcaacgac
  V H K V A K T Q F G C P A Y E G Y C N D

      110     115     120     125     130     135     140     145     150  155
cactgcaacgatatcgagcgttaaggacgggtgaatgccacggctttaagtgcaaatgcgcg
  H C N D I E R K D G E C H G F K C K C A

      160     165     170     175     180     190
aaagatatgcaccaccaccaccactaaggatcc
  K D M H H H H H H - G S
```

Figura. 14
Secuencia TsH.

Este gen fue sintetizado por la compañía Gen script.

Para el generar la toxina *TsTxK β* recombinante se decidió insertarla en el vector pET 3a, el cual es un vector simple, es decir este vector solo proporciona resistencia a un antibiótico y sin proteínas chaperonas. La construcción se insertó dentro de los sitios de restricción *BamHI* y *NdeI*. Además, se adicionó una cola de 6 histidinas para facilitar la purificación de la proteína (figuras 14 y 15).

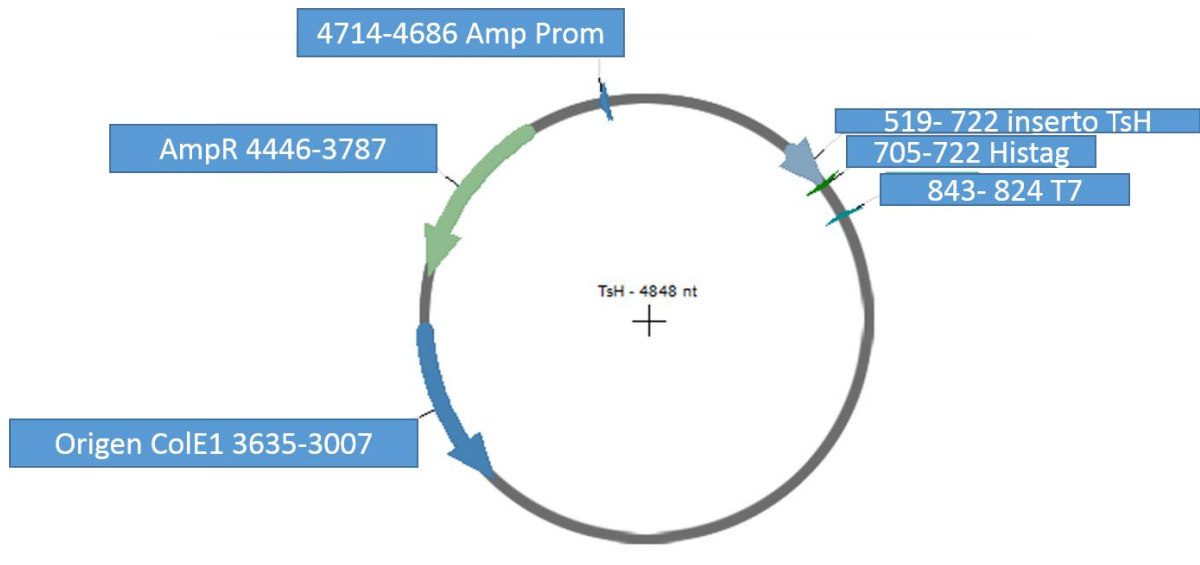


Figura. 15
 Construcción del vector *TsH* elaborada en el programa Serial Cloner 2.6, (Amp R) Resistencia a la ampicilina, (6 His) Histag, (T7) inserto de T7.

7.1.1 Transformación

Se procedió a evaluar la producción de toxina en las cepas mediante cinéticas de producción.

Se probaron 4 diferentes Cepas Rosetta®, BL21 (DE3), BL21 (DE3) Trx y C41®. Estas cepas se transformaron con 1.5 μL de plásmido vía choque térmico. Estas colonias fueron sembradas en cajas *petri* con medio LB al cual se le añadió 20 μL de ampicilina 1000X; se dejaron crecer 18 h a una temperatura de 37°C.

7.1.2 Cinética de producción

Se tomó una colonia cultivada en cajas *petri* aislada y se sembró en un cultivo de 5mL durante 16 h. El cultivo se dejó crecer en incubadora rotatoria (200 r.p.m., 37°C) hasta que se obtuviera una OD₆₀₀ de 0.6 y se indujo con 0.5 mM de IPTG, a una temperatura de 37°C y los inóculos se dejaron 12 h en incubación.

Empleando las metodologías establecidas dentro del grupo de trabajo, se decidió emplear la cepa BL21 (DE3). Esta cepa tiene la característica de sobre expresar proteínas en ambiente reductor. Se procedió a transformar un glicerol de células competentes de 50 μL , con 3 μL del plásmido de *TsH*, vía choque térmico.

7.1.3 Inoculación e Inducción

A partir de un preinóculo de una cepa aislada de la transformación, se produjo un cultivo de 50 mL de medio LB por 16 hrs a 37 °C, a 50 µL de ampicilina 1000X. Se tomó 40 mL del cultivo anterior y se agregaron 1500 mL de medio LB con 1.5 mL de ampicilina 1000X. La metodología en el grupo de trabajo indica que se produzca la proteína recombinante con una concentración de IPTG de 0.5 mM, a una temperatura de 37°C en un periodo de 3 horas. Se recolectaron las células con centrifugación a 6500 r.p.m.

7.1.4 Lisis celular y purificación

Se resuspendió los botones celulares en una solución de 50 mL de *buffer* de lisis (50 mM de Tris pH 8.0, 300 mM de NaCl) adicionado con urea 4 M. Se procedió a lisar con una sonda ultrasónica con pulsos de 20 segundos de ultrasonido a una potencia de 51 Watts, intercalados con descansos de 40 segundos a concluir un tiempo de 15 min. Se ultracentrifugó a 17000 r.p.m. durante 45 min. Se filtró el sobrenadante con membrana 0.45 µm Durapore®. Se procedió a purificar con CAMQ y se eluyó con *BL* con imidazol en concentraciones de 25, 300 mM.

Se concentraron las muestras por medio de una *EFS*, la cual se usó con una columna Strata® C18, equilibrada con H₂O-*TFA* 0.05%. Se le aplicaron lavados con mezcla Agua-ACN de los siguientes porcentajes de ACN 0, 25 y 65%. Las muestras fueron resuspendidas en *buffer* de lisis pH 8 y cargadas en un gel de poliacrilamida al 14%. Estas fracciones fueron liofilizadas y resuspendidas en *BL* pH 8 inyectadas en *HPLC*, equipado con una columna C4 Phenomenex® Júpiter C4 300A y con el siguiente gradiente de agua ACN (tabla 1).

Tiempo	% Agua	% ACN
0	85	15
5	85	15
30	5	95
35	5	95
45	85	15
z	85	15

Tabla.1
Gradiente para elución de
toxina TSH en el sistema 1.

8 Resultados y análisis de resultados

Se procedió a buscar a la cepa inductora, así como las condiciones para hacer la expresión óptima de la proteína.

8.1 Transformación

Con base en los resultados mostrados en el gel (figura 16), se estableció que la cepa C41® era la mejor para poder trabajar el sistema. A continuación, se decidió hacer una cinética de expresión más específica usando solo la cepa C41®. Se tomaron muestras de sobrenadante y de la masa celular al momento de inducir, a las 4, 6, 8, 16, 20 y 24 horas de inducción.

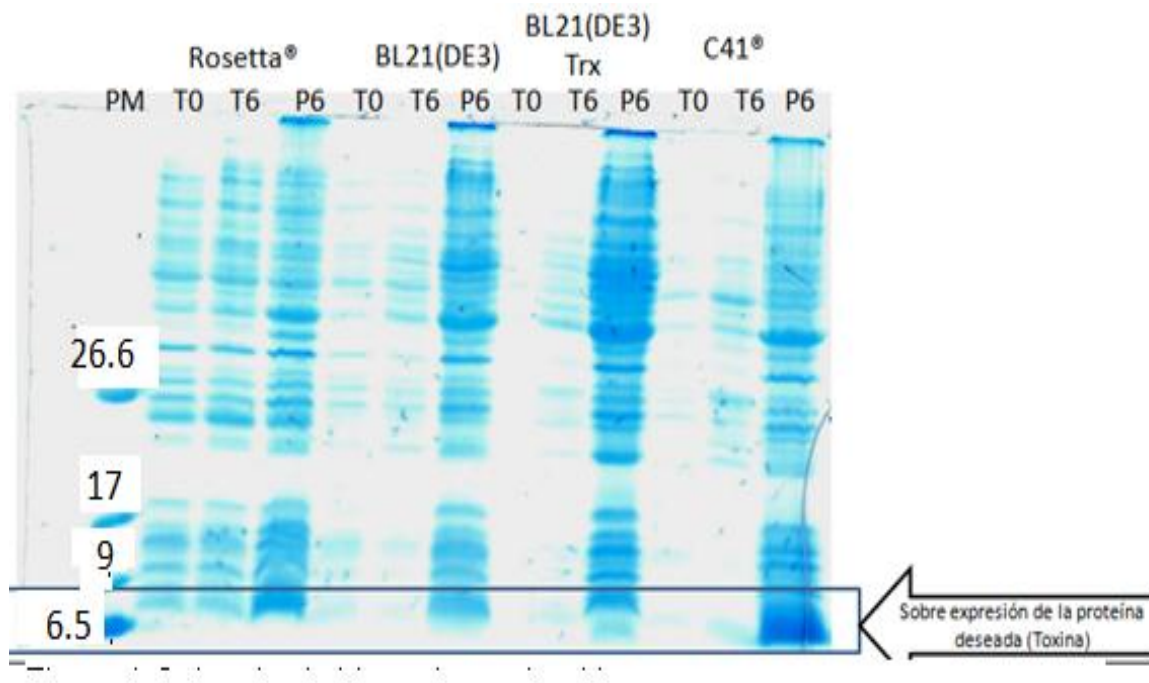


Figura. 16

Geles de cinéticas de producción en cepas: Rosetta, C41 BL21 (DE3), BL21 (DE3) Trx.

(PM) Marcador de pesos moleculares.

(T0) Muestra del sobrenadante tomado al momento de la inducción.

(T6) Muestra del sobrenadante tomado a las 6 h de la inducción.

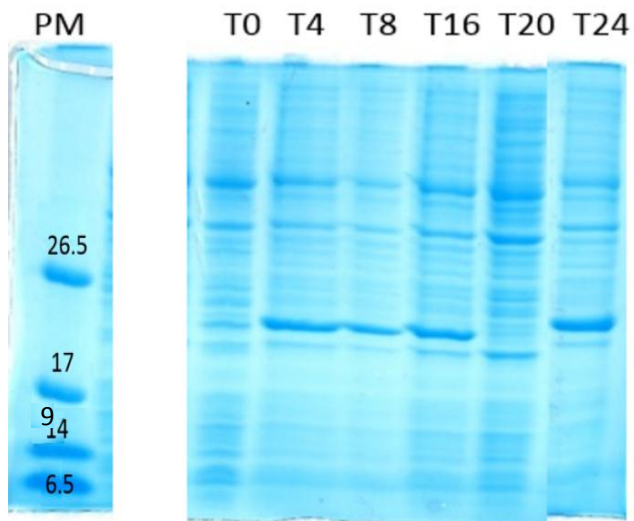


Figura. 17

Gel de cinética de TSH en C41, fracción soluble muestras tomadas:
 (PM) Marcador de pesos moleculares.
 (T4) muestra a las 4 hrs.
 (T8) muestra a las 8 hrs.
 (T16) muestra a las 16 hrs.
 (T20) muestra a las 20 hrs.
 (T24) muestra a las 24 hrs.

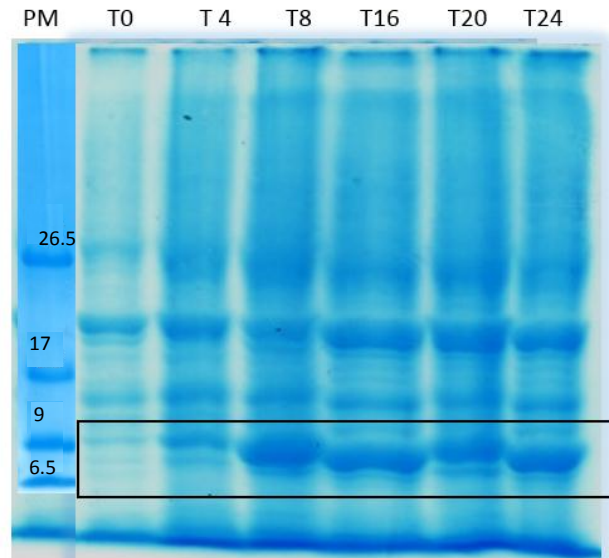


Figura. 18

Gel de cinética de TSH en C41, fracción insoluble:
 (PM) Marcador de pesos moleculares.
 (T4) muestra a las 4 hrs.
 (T8) muestra a las 8 hrs.
 (T16) muestra a las 16 hrs.
 (T20) muestra a las 20 hrs.
 (T24) muestra a las 24 hrs.

Con la siguiente información (figuras 17 y 18), se notó que la proteína se sobre expresaba, pero esta se iba a la fracción del precipitado (el pellet).

Por la expresión observada entre los tiempos de 4h y 8h, se decidió hacer una cinética más corta tomando de tiempo límite 6 h y como mínimo 2h (figura 19).

Con esta información se decidió que la producción se llevaría 6h a 37 °C, con concentración de 0.5 mM de IPTG y se realizaría la lisis en 50mL de BL con urea 4 M para intentar solubilizar lo más posible los agregados de proteína producidos.

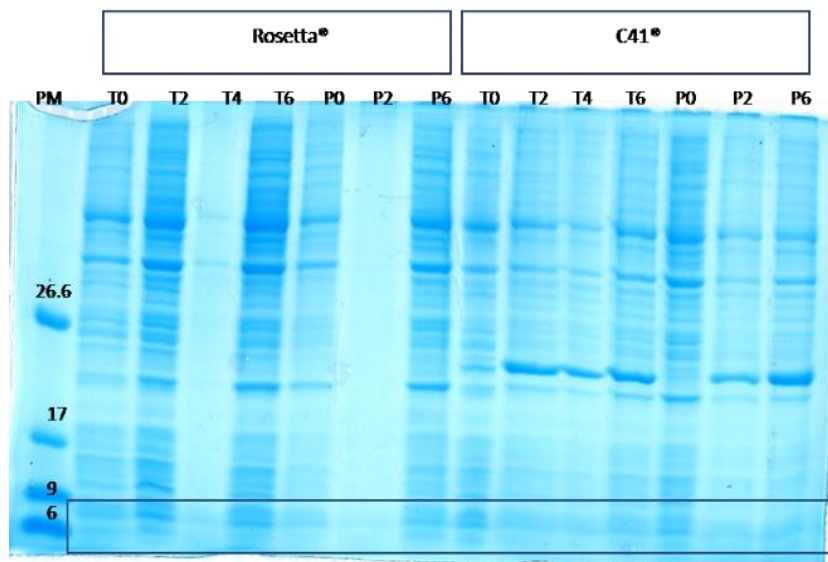


Figura. 19

Geles de cinéticas de producción en cepas C41® y Rosetta®

(PM) Marcador de pesos moleculares.

(T0) Muestra del sobrenadante tomado al momento de la inducción.

(TN) Muestra del sobrenadante tomado a las N h de la inducción.

(PN) Muestra del pellet tomado a las N h de la inducción.

8.2 Producción

Se trabajó con 1.5 L para obtener el péptido de interés. El preinóculo se dejó crecer 16h; de éste se tomaron 50 mL de cultivo y se agregaron a los 1.5 L de medio LB adicionado con 1500 μ L de ampicilina 1000X. Se dejó crecer a una OD_{600} de 0.6 para poder inducir con 1500 μ L de ITPG. Se siguió incubando con agitación (180 r.p.m.) durante 6 h. El cultivo se centrifugó en un equipo Cole-Beckham 5 min a una velocidad angular de 6500 r.p.m. La masa celular fue resuspendida en 50 mL de *buffer* de lisis (50 mM Tris-Cl pH 8, con 300 mM de NaCl). Esta suspensión se lisó a 0° con sonda ultrasónica pulsos ultrasónicos de 51 *Watts* cada 20 s intercalados por descansos de 40 s hasta completar un tiempo total de 10 min de ultrasonificado. La suspensión ya ultrasónica se centrifugó a 17000 r.p.m. durante 45 min.

8.3 Purificación

En la primera producción que se realizó se observó que la proteína se sobre-expresaba en gran cantidad en fracción insoluble, por lo cual se planteó purificar por separado las fracciones soluble e insoluble (figura 20). Se decidió hacer un segundo ultrasonicado con el mismo programa que el primero, solo que se agregaron 50mL de BL con urea 4 M para resuspender la mayor parte de la fracción insoluble. En ambas purificaciones se filtró el centrifugado a través de membrana de 0.45 μm Durapore® (Milipore®, Merck), para evitar que la columna se ocluyera con precipitados. Se equilibró a las columnas Hitrap® con 5 volúmenes de columna (25mL), del respectivo BL de las fracciones.

Se eluyó la suspensión filtrada a través de la columna y se aplicaron eluciones de 5 volúmenes de BL con concentraciones de 25 mM y 300 mM de imidazol (figura 20).

Se recogió el eluato de 300 mM de imidazol y se concentró mediante EFS (Strata C18, Phenomenex®) equilibrada con H₂O adicionada con 0.05% de ácido trifluoroacético (TFA). Se eluyeron con las siguientes mezclas de H₂O/ACN con 0.05% TFA, 100%, 40% y 25%.

La primera elución fue para retirar la urea, y los posteriores de 35% y 45% para remover péptidos no deseados. Se procedió a obtener la elución de 65% donde se esperaba la proteína y la fracción de 75% donde aún aparecía la toxina. Por último, se eluyó con 100% de acetonitrilo. Este eluato corresponde a las fracciones no plegadas y proteínas de mayor masa molar. Todas las fracciones se liofilizaron y se re suspendieron en 4mL de BL para su inyección en el cromatógrafo de alta resolución. Las muestras fueron filtradas por membrana de 0.22 μm .

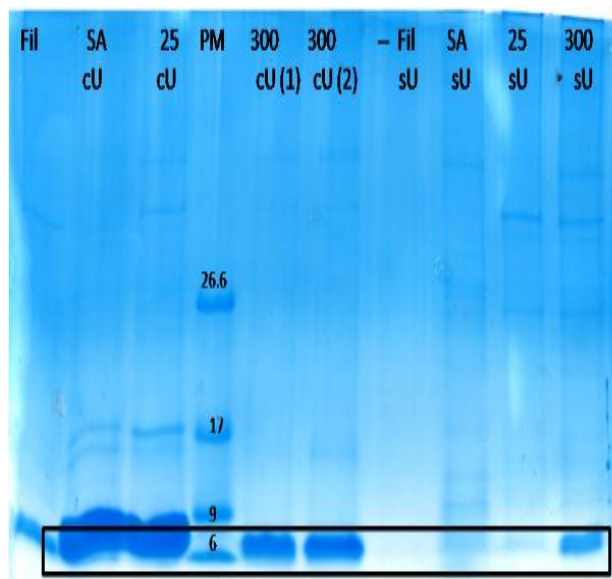


Figura. 20

Gel poliacrilamida al 15% mostrando la ruptura de las células y elución de la CLAM C41: (PM) Marcador de pesos moleculares. (Fil sU) en el filtrado. (SA sU) Sin afinidad por la Hitrap®. (25 sU) eluato de 25 mM de imidazol. (300 sU) eluato de mM de imidazol. (Fil) filtrado de Solución Amortiguadora con urea 4M. (SA cU) Sin afinidad Hitrap® con urea 4M. (25 cU) eluato de 25 mM de imidazol urea 4M. (300 cU) eluato 300 mM de imidazol con urea 4M.

Se inyectó 1 mL de resuspendido en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) con gradiente (tabla 4 y figura 26), marca Varian® modelo Polaris 210 con modulo binario de disolventes y con detector de UV-Vis. Se empleó el gradiente (tabla 4).

Tiempo	% Agua	% ACN
0	85	15
5	85	15
15	50	50
18	50	50
24	85	15

Tabla. 2
Gradiente para TSH a flujo de 1 mL/min.

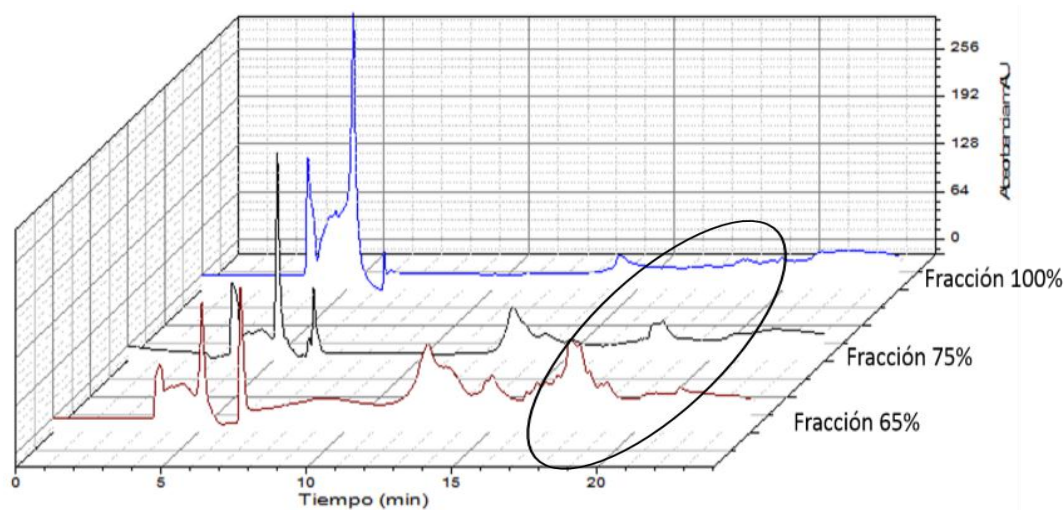


Figura. 21
Cromatogramas de las inyecciones de las fracciones de C41® eluidas en mezcla ACN/H₂O 65%, 75% y 100% en EFS.

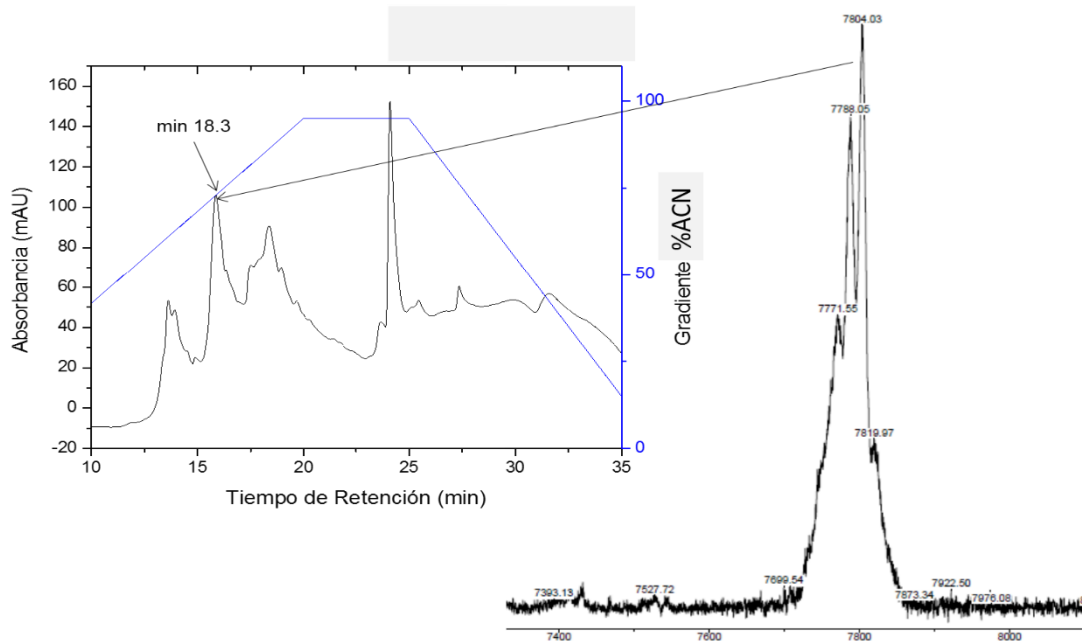


Figura. 22
Cromatograma de la fracción de 75% ACN con pico correspondiente al min 18.3 con su masa molar obtenida en MALDI-TOF.

Se recolectó el pico correspondiente al 18.3 min (figuras 21 y 22) y se analizó por *MALDI-TOF*. La masa obtenida fue de la toxina con puentes disulfuro formados: 7,804 Da (figura 22).

Estos experimentos muestran que se obtuvo la proteína con puentes disulfuro; sin embargo, la cantidad de la muestra fue muy pequeña para poder caracterizarla toxina por dicroísmo o por RMN H^1 . En la purificación de *CAMQ*, aparentemente se obtuvo una gran cantidad de proteína. Sin embargo, también se observó que fue insoluble, ya que al inyectarse al *HPLC* la cantidad que este separa es mínima.

8.4 Optimización de la purificación

Se purificó el sobrenadante por medio de *CLAM* y se procedió a resuspender nuevamente el pellet en *buffer* de lisis, adicionado con 4 M de urea, para la solvatar la toxina de interés (figura 23).

Esta resuspensión se dejó en agitación durante 1 h y se procedió a diluir solo la urea hasta alcanzar una concentración de 1 M. Esta solución fue filtrada. Se tomó muestra del filtrado y fue cargado en un gel de poliacrilamida de 15%. Este gel se mostrará en la siguiente sección ya que es referencia para observar la proteína.

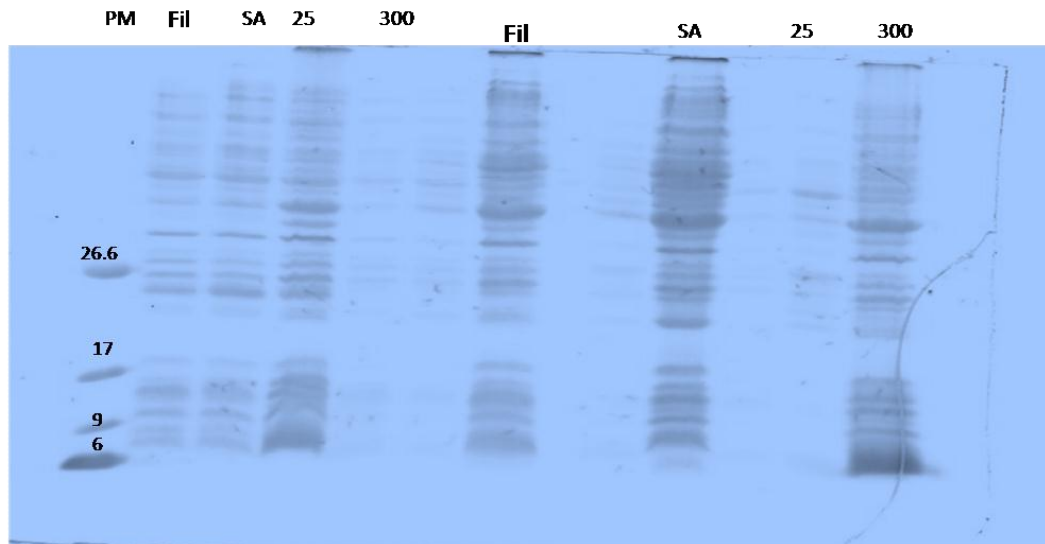


Figura. 23

Purificación mediante Hitrap® del resuspendido con urea 4M de la Toxina TSH.

(PM) marcador de pesos moleculares.

(Fil) Filtrado para ingresar a CAMQ.

(SA) Sin afinidad en CAMQ.

(25 mM) Eluato de 25 mM de Imidazol.

(300 mM) Eluato de 300 mM de Imidazol.

8.4.1 Optimización de los métodos de purificación por medio de la CAMQ

El lisado resuspendió y filtrado se hizo pasar a través de la columna de afinidad metal-quelato Hitrap® cargada con 100 mM de cloruro de níquel (II), equilibrada previamente con *buffer* de lisis.

La proteína fue sometida al siguiente gradiente de *buffer* de lisis con las concentraciones de imidazol: 0 mM, 25 mM, 300 mM (figura 23).

Se muestra que la proteína eluye con cierto grado de pureza al comparar la proteína filtrada con la proteína no retenida en la columna; el eluato de 25 mM de imidazol muestra que se retiran aún más impurezas.

Con esta información se procede a eluir a través de una columna de extracción en estado sólido equilibrada con agua con 0.05% de TFA.

8.5 Determinación de las condiciones para la *EFS*

En este paso se optimizaron los lavados para eliminar más impurezas que hayan logrado retenerse en la Hitrapp® y que no se haya eluído en las distintas fracciones de imidazol; además, este paso quita la urea 0.5 M de la solución y prepara a la muestra para ser ingresadas al cromatógrafo de líquidos. Se preparó y equilibró una columna para *EFS Strata® C18*. Se lavaron los péptidos de la columna de *EFS* con un gradiente de mezclas de agua-acetonitrilo adicionados con 0.05% de *TFA* 0%, 25%, 35%, 45%, 65%, 75% y 85%. Se liofilizó las muestras, para ser disueltas en *buffer* (50mM de Tris pH 8.0, con NaCl 200 mM), para su inyección en el cromatógrafo de líquidos.

8.6 Optimización de los gradientes en *HPLC*

Para la purificación de la toxina, se decidió hacer un gradiente de elución que fuera en un inicio lo más polar posible y que soportara la columna sin que tuviera un daño severo- Al final, la elución tendría que ser lo más apolar que se pudiera, en un tiempo reducido. Se optimizó el siguiente gradiente de agua-acetonitrilo con 0.05% de *TFA* (tabla5 y figura 24).

Tiempo (min)	% Agua	% ACN
0	85	15
5	85	15
20	5	95
25	5	95
35	85	15

Tabla. 3
Gradiente para obtener la proteína TsH a flujo de 1mL/min.

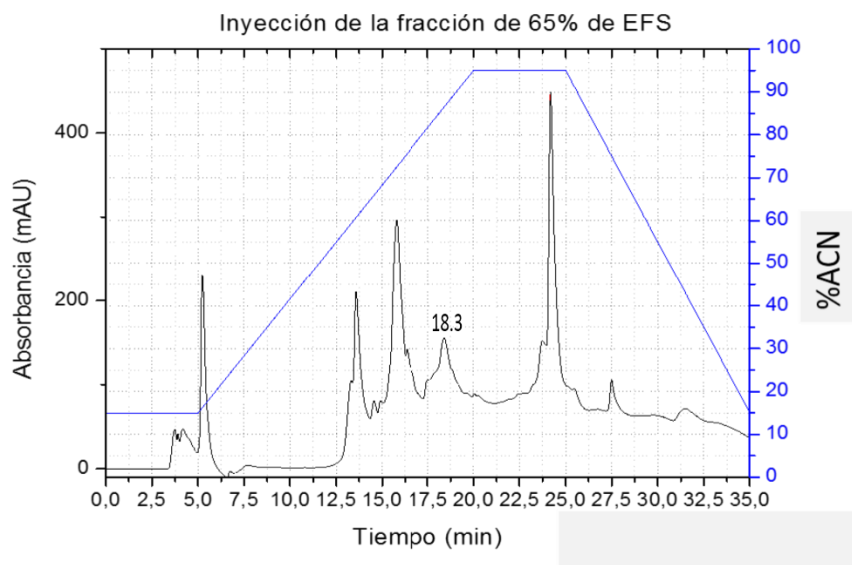


Figura. 24
 Inyección de la fracción de 65% de EFS del nuevo sistema C41® comparado con el gradiente para purificación de toxina Tsh.

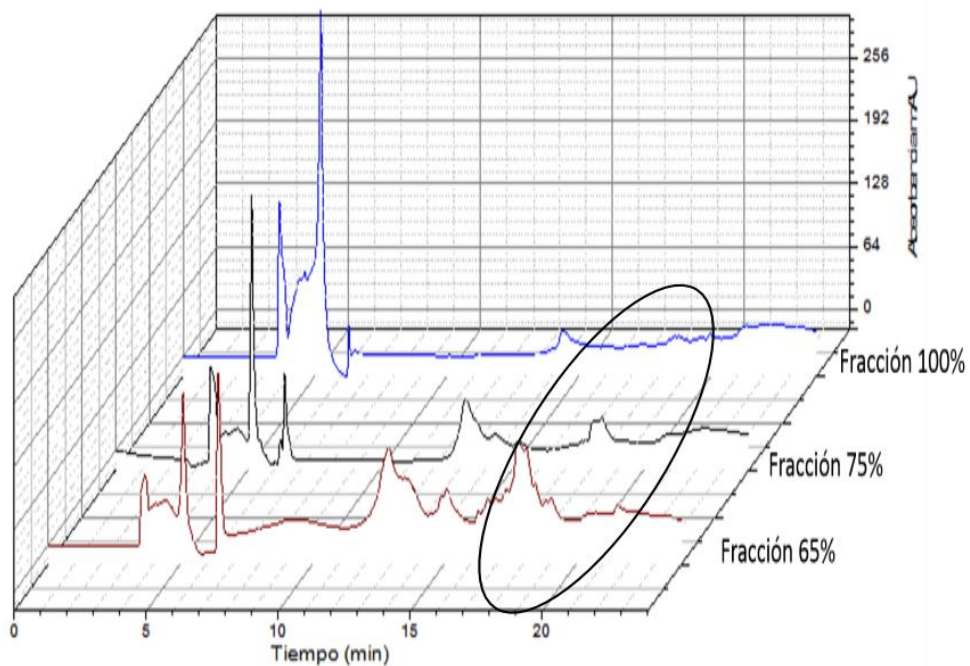


Figura. 25
 Cromatogramas de las fracciones del nuevo sistema C41® que tenían urea 4M y fueron eluidas por EFS.
 Una vez definidas estas condiciones, se inyectaron las fracciones obtenidas tras la EFS (figuras 24 y 25) y se percató que en las fracciones de 35%, 45%, 65% y 85 % se obtenían un pico bien definido en el minuto 18, (84% de ACN), el cual fue

colectado y se procedió a liofilizar para determinar la masa del péptido con *MALDI-TOF*.

Los picos correspondientes al minuto 18, eluidos con 80% ACN/H₂O presentan una masa de 7,804 Da en este tiempo de retención; también, se observaron 3 picos mayoritarios: un pico en 14.3 min, otro en 15.5 min y el 18. El pico mayoritario se obtuvo en el minuto 24.8, por lo cual, se procedió a tomar espectrometría de masa y se determinó que sería la toxina *TsTxKβ*. Sin embargo, se puede afirmar que se encuentra desplegada puesto que el porcentaje de acetonitrilo requerido para eluir era 94% figura 14; esto se debe a que las partes hidrófobas se encontraban expuestas y estas estaban adheridas a la columna. La adhesión de una proteína desplegada a una columna de fase reversa se debe a que las cadenas laterales de los aminoácidos no polares incrementan los cuasi-equilibrios con la fase estacionaria. Una proteína con un plegamiento definido tiene los residuos polares expuestos al disolvente que la rodea y aglomera a las cadenas laterales de los aminoácidos poco polares, de tal manera que se reduzcan las interacciones con el disolvente.

Concluidas las inyecciones de las fracciones de 65 y 75% se realizó una corrida de blanco a la columna, en la cual no se obtuvieron péptidos que fueran solubles en 95% de acetonitrilo. Sin embargo, al eluir con una solución de Isopropanol/acetonitrilo 2:1 se observa la fracción correspondiente a un pico que tenía cerca de 3000 mAU. Esto implica que la columna tenía péptidos que estaban desplegados y que se requería un eluyente menos polar que el acetonitrilo para poder eluirlos.

La cantidad de proteína no se pudo cuantificar.

8.6.1 Producción con cepa BL21 (DE3)

Se procedió a producir con una metodología establecida previamente en el grupo de trabajo. Se empleó la cepa BL21 (DE3) con las mismas condiciones de tiempo, temperatura e inductor para la producción de la toxina recombinante.

A continuación se muestra gel de las eluciones de la Hitrap®. Se observa una proteína en la concentración de 300 mM con peso molecular entre 14 y 6.5 que es la toxina de interés (figura 32).

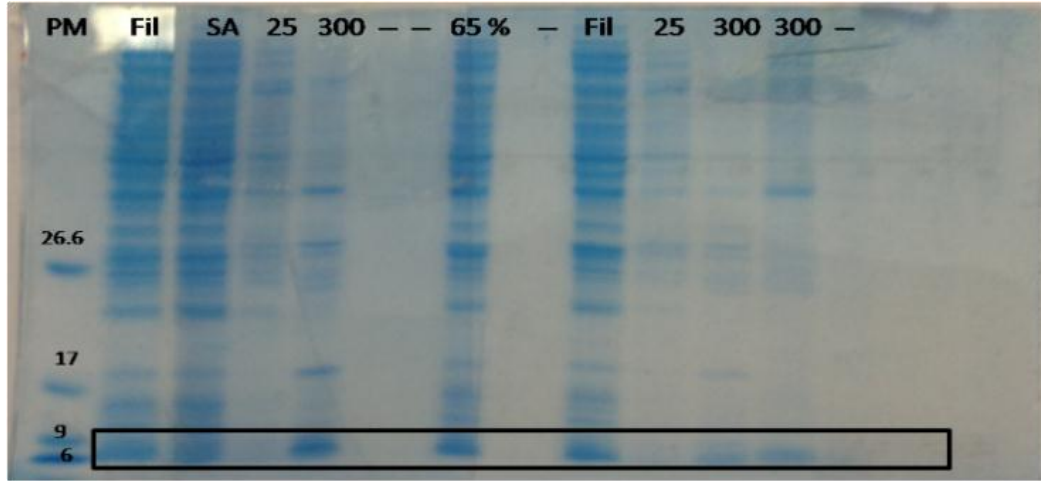


Figura. 26

Gel poliacrilamida 15% mostrando las proteínas TSH producidas en BL21 (DE2).

(PM) Marcador de pesos moleculares.

(Fil) en el filtrado.

(SA) lo no retenido por la Hitrapp®.

(25) el eluato con 25 mM de imidazol.

(300) el eluato de 300 mM de imidazol.

(65%) fracción eluída de EFS con 65% ACN.

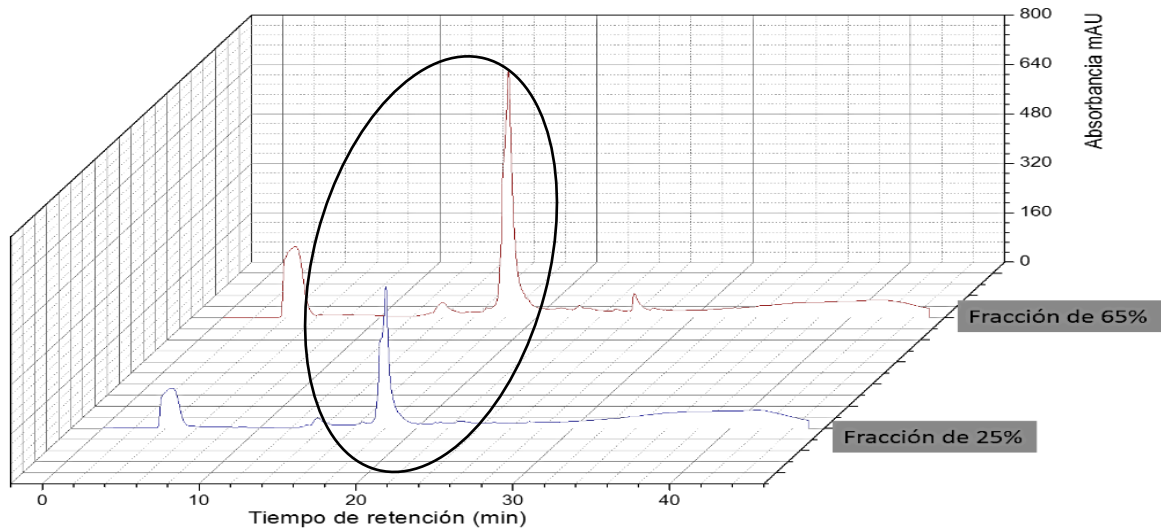


Figura. 2

Cromatograma de la purificación sistema BL21 (DE3) de las fracciones de 25% y 65% obtenidas en la EFS.

El gel (figura 26), muestra proteína con masa aproximada de 7 kDa en las fracciones eluidas de la Hitrapp de 300 mM de imidazol. Esta fracción se procedió a separar a través de *EFS* con una columna Strata C18® de la marca Phenomenex®, activada con ACN y equilibrada con H₂O. Se observó que se separan algunos péptidos.

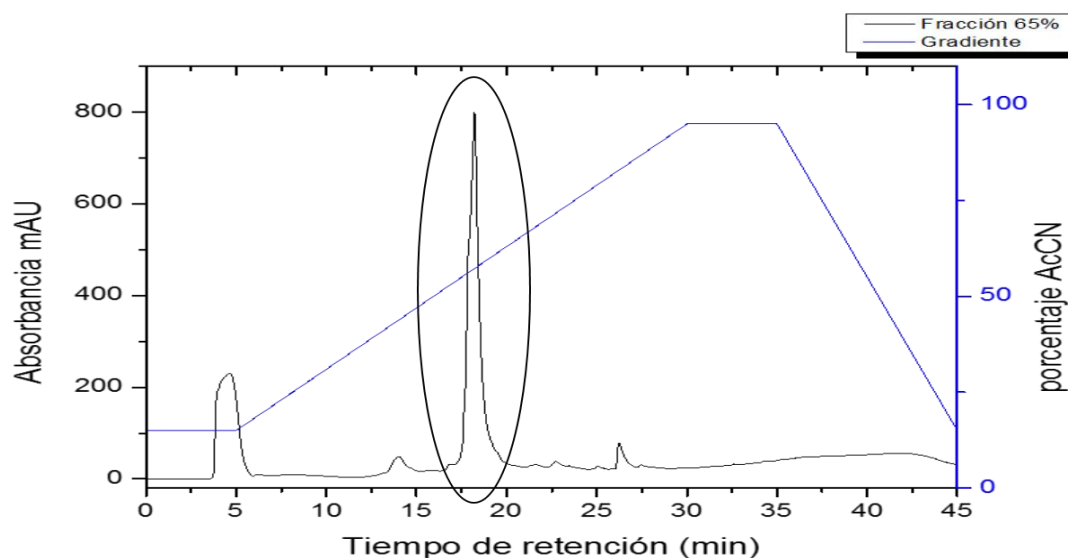


Figura. 28
Cromatograma de la fracción de 15% ACN contrastado con gradiente del sistema BL21 (DE3).

Además, este paso sirve como método de preconcentración para inyectarse al *HPLC* (figura 27 y 28).

Se procedió a recolectar el pico obtenido en el minuto 18.3 (figuras 27 y 28) de ambas inyecciones y se procedió a liofilizar para poder determinar la masa, la cual fue de 7804.2 Da, lo cual indica presencia de la toxina *TsH* con formación de 3 puentes disulfuro.

La masa neta liofilizada fue de 0.1 mg y se procedió a resuspenderla en 125 μ L de H₂O adicionada de 5% de D₂O.

Se procedió a ingresar al equipo de RMN Varian de 500 MHz, con Scans 32 y supresión de agua DPFGE.

Se muestra el espectro de protón (figura 29).

Instituto de Química, UNAM
Supresión de agua DPGSE
Gustavo TSH
64 scans
14/09/2016
Pulse Sequence: water_f2

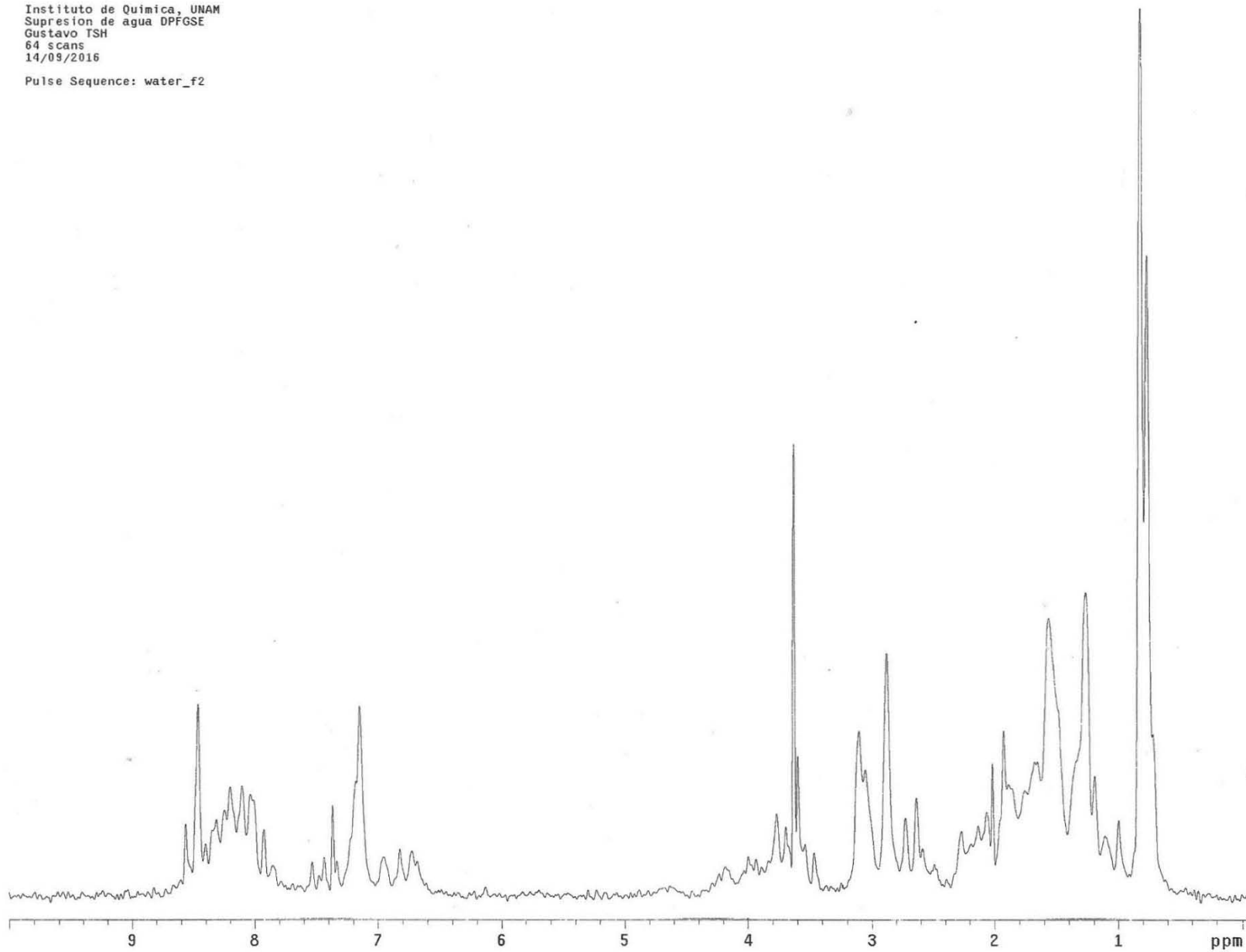


Figura. 29
Espectro de Resonancia Magnética Nuclear H¹ de la toxina *TsH*.

Con el espectro de RMN ^1H , se observa que la toxina no tiene un plegamiento definido, esto se puede afirmar por la poca dispersión de las señales en la zona de las amidas y aromáticos en 7-9 p.p.m., así como la poca dispersión de las señales en la zona de los metilos comprendida entre 0 y 2 p.p.m.

Este sistema obtuvo un rendimiento de proteína de 0.075 mg por litro de cultivo LB.

9 Conclusiones

Con el sistema de expresión C41, se puede concluir que:

- La toxina que se trató de producir se presenta en cuerpos insolubles, por tanto se asume que no se tiene un plegamiento definido en la proteína.
- Se puede afirmar que la toxina $TsTxK\beta$ fue producida por los cromatogramas, los geles de electroforesis y la masa obtenida en *MALDI-TOF*.
- La toxina $TsTxK\beta$ requiere un replegamiento o vector que le proporcione modificaciones postraduccionales.

Con el sistema de expresión BL21 (DE3) se puede concluir que:

- Se produjo la toxina con puentes disulfuro y sin un plegamiento definido. Sin embargo, no se pudo reproducir el experimento.

10 Perspectivas

- Optimizar condiciones de producción para intentar producir la toxina soluble desde el momento de producción.
- Realizar un método de replegamiento para la toxina.
- Incrementar los rendimientos de la toxina para poder hacer experimentos de RMN ^1H bidimensionales.

Referencias

1. Batas, B. & Chaudhuri, J.B., 1996. Protein refolding at high concentration using size-exclusion chromatography. *Biotechnology and bioengineering*, 50(1), pp.16–23.
2. Bornhorst, B.J.A. & Falke, J.J., 2000. Reprint of: Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Protein Expression and Purification*, 326(1992), pp.238–254.
3. Bradshaw, T.P., 2006. Introduction to Protein and Peptide HPLC- A Users Guide. , pp.11–87.
4. Chagot, B. et al., 2005. An unusual fold for potassium channel blockers: NMR structure of three toxins from the scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *The Biochemical journal*, 388(Pt 1), pp.263–271.
5. Christian, G.D., 2006. *Química Analítica 6° ed.*, México, D.F.: McGraw-hill. pp. 574-648.
6. Creighton, T.E., 1993. *Protein Structure: A Practical Approach*, IRL Press at Oxford University Press. pp. 278-296.
7. Fallis, A., 2013. *Biochemistry for Dummies*, Wiley Publishing, Inc. pp.53-96
8. Flamini, R., 2003. Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: Polyphenols. *Mass Spectrometry Reviews*, 22(4), pp.218–250.
9. Gopalakrishnakone, P. et al., 2015. Scorpion venoms. *Scorpion Venoms*, pp.1–575.
10. Greaves, J. (Director of M.S.F. & Roboz, J., 2014. *Mass spectrometry for the novice*, CRC Press. pp. 68-71.
11. Hengen, P.N., 1995. Purification of His-Tag fusion proteins from *Escherichia coli*. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(7), pp.285–286.
12. van Holde, K.E., Johnson, W.C. & Shing Ho, P., 2006. *Principles of Physical Biochemistry 2° ed.*, Pearson Prentice Hall. pp. 40-52.
13. Jungbauer, A., Kaar, W. & Schlegl, R., 2004. Folding and refolding of proteins in chromatographic beds. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(5), pp.487–494.
14. Keeler, J., 2010. *Understanding NMR Spectroscopy, 2°ed.*, John Wiley & Sons Inc. pp. 1-50.
15. Labarca, R. & Latorre, P., 2005. *Potassium Channels and their modulators, 2° ed.* J. m. Evans et al., eds., Taylor & Francis Ltd.
16. Lawrence, E. & Robertson, M., 2000. *Protein structure and function*,
17. Legros, C. et al., 1998. Evidence for a new class of scorpion toxins active against K⁺ channels. *FEBS Letters*, 431(3), pp.375–380.
18. Lehninger, A. & Cox, D., 2002. *Principios de bioquímica 4° ed.*, Madrid: Omega. pp. 75-77, 825-887.
19. Manuscript, A. & Nanostructures, S.P.C., 2008. NIH Public Access. *Nano*, 6(9), pp.2166–2171.
20. Martin-Eauclaire, M.F. et al., 2016. Potassium channel blockers from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* (Lutz and Mello, 1922). *Toxicon*, 119, pp.253–265
21. Mermin, N.D. et al., 1978. *Solid State Physics.*, New York: Hartcourt College Publishers. Nelson et al., 2011. *Principles of Biochemistry*,
22. Novagen, 2003. *pET System Manual Novagen pET System Manual Novagen.* Biosystems, pp.1–68.
23. Possani, L.D., 2005. El alacrán y su piquete. In *Dirección General de Divulgación*

Referencias

- de la Ciencia. UNAM, México. pp. 12–24.
24. Pucca, M.B. et al., 2015. Tityus serrulatus venom - A lethal cocktail. *Toxicon*, 108, pp.272–284.
 25. Requena, A. & Zúñiga, J., 2008. *Espectroscopía* Pearson & P. Hall, eds., Pearson Prentice Hall. pp. 385-395.
 26. Rowosky, R. et al., 1994. Tityustoxin Ka blocks voltage-gated noninactivating K⁺ channels and unblocks inactivating K⁺ channels blocked by α -dendrotoxin in synaptosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, pp.1475–1479.
 27. Silverstein M.Robert, Webster X. Francis, K.J.D., 2005. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. Organic Chemistry, pp.1–550.
 28. Sneppen, K. & Zocchi, G., 2005. *Physics in molecular biology*,
 29. Stoker, H.S., 2010. *General, Organic, and Biological Chemistry*, 4 ed. Houghton Mifflin, pp. 604, 614-636.
 30. Tytgat, J. et al., 1999. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: β -KTx molecular subfamilies. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20(11), pp.444–447.
 31. Wüthrich, K. et al., 1982. Sequential resonance assignments as a basis for determination of spatial protein structures by high resolution proton nuclear magnetic resonance. *Journal of Molecular Biology*, 155(3), pp.311–319.
 32. Walker, S. & David, M., 2008. *Biochemistry DeMYSTiFieD*, 2 ed. Wiley and sons Inc. pp. 67-98.
 33. Whitford, D., 2005. *Proteins-Structure and Function*, J. Wiley & Sons. pp. 3343-3346.
 34. Wüthrich, K., 2001. The way to NMR structures of proteins. *Nature Structural Biology*, 8(11), pp.923–925.
 35. Yamaguchi, H. & Miyazaki, M., 2014. Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. *Biomolecules*, 4(1), pp.235–51.
 36. Zhu, S. et al., 2010. MeuTXK β 1, a scorpion venom-derived two-domain potassium channel toxin-like peptide with cytolytic activity. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1804(4), pp.872–883.

Anexo I

Medio LB

Por cada litro de medio:

- 10 g de Triptona
- 5 g de Extracto de Levadura
- 10 g de NaCl

Ampicilina 1000X

- Disolver en matraz aforado de 50 mL, 50 g de ampicilina con Agua Mili-Q.
- Filtrar bajo campana de flujo laminar y con membrana de nitro celulosa 0.2 μm en tubos de micro centrifuga de 2 mL, llenando con 1.7 mL.

Cloranfenicol

- Disolver 17 mg de Cloranfenicol en un matraz volumétrico de 50.0 mL con 50 mL de mezcla etanol-agua 70%.
- Filtrar bajo campana de flujo laminar y con membrana de nitro celulosa 0.2 μm en tubos de micro centrifuga de 2 mL, llenando con 1.7 mL.

Kanamicina 1000X

- Disolver 30 mg de Kanamicina en un matraz volumétrico de 50.0 mL con 50 mL de agua Mili-Q.
- Filtrar bajo campana de flujo laminar y con membrana de nitro celulosa 0.2 μm en tubos de micro centrifuga de 2 mL, llenando con 1.7 mL.

Anexo II Caracterización por técnicas espectroscópicas

Por MALDI-TOF

- Tomar una fracción de la proteína obtenida y disolver en una acuosa con 15% de acetonitrilo y 0.05% de ácido trifluoroacético.
- Determinar la relación correcta de la mezcla anterior con solución saturada de matriz (en este caso se emplea ácido alfa-ciano-hidroxicinámico).
- Colocar en la platina para el equipo.
- Colocar platina en el equipo y esperar a que se llegue al vacío necesario 0.005 torr.
- Aplicar el método adecuado con la atenuación requerida para la muestra
- Observar el pico 7804 en *TsH*.

Por RMN H

- Tomar 1 mg de muestra y resuspender en 125 μ L de agua miliQ® con 5% de agua deuterada en un tubo de resonancia marca Shigemi®.
- Ajustar los shims y los transientes necesarios para observar el espectro de protón de la muestra.

Anexo III Aminoácidos

Tabla de aminoácidos

Tomada de:

[https://ka-perseus-](https://ka-perseus-images.s3.amazonaws.com/a731845316020e1cc1389307fc163ffc38efffe8.png)

[images.s3.amazonaws.com/a731845316020e1cc1389307fc163ffc38efffe8.png](https://ka-perseus-images.s3.amazonaws.com/a731845316020e1cc1389307fc163ffc38efffe8.png).

AMINOÁCIDO					
Grupos R no polares, alifáticos	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{H} \end{array}$ <p>Glicina</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Alanina</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Valina</p>		
	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Leucina</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{S} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Metionina</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Isoleucina</p>		
	Grupos R polares, sin carga	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$ <p>Serina</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Treonina</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array}$ <p>Cisteína</p>	
		$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{C} - \text{H} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_2\text{N}^+ \quad \text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_2 \end{array}$ <p>Prolina</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_2\text{N} \quad \text{O} \end{array}$ <p>Asparagina</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_2\text{N} \quad \text{O} \end{array}$ <p>Glutamina</p>	
		Grupos R cargados positivamente	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$ <p>Lisina</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{C} = \text{NH}_2^+ \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ <p>Arginina</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C} - \text{NH} \\ // \quad \backslash \\ \text{H} \quad \text{CH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{NH}^+ \end{array}$ <p>Histidina</p>
			Grupos R carga negativa	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COO}^- \end{array}$ <p>Aspartato</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COO}^- \end{array}$ <p>Glutamato</p>
Grupos R no polares, aromáticos				$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ <p>Fenilalanina</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{OH} \end{array}$ <p>Tirosina</p>