

00562 13
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA, DEPARTAMENTO DE RECONOCIMIENTO
MOLECULAR Y BIOESTRUCTURA UNAM, CUERNAVACA, MORELOS



**EXPRESION DE LA TOXINA RECOMBINANTE HELOTERMINA (HLTX) DEL VENENO DE
Heloderma horridum horridum, UTILIZANDO DOS DIFERENTES SISTEMAS DE EXPRESION
(PROCARIONTE Y EUCARIONTE)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

P R E S E N T A

LILIANA PARDO LOPEZ

Cuernavaca, Morelos. Septiembre 1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

264414



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.

Esta tesis es para mi madre que me enseñó a luchar por las cosas que quiero, por supuesto también le pertenece a Denise, a Marco y a mi padre.

Esta tesis también es para mis amigos: Xochitl, Claudio, Paulina, María, Victor, Alexei y Claudia por sus indiscutibles amistades y muy especialmente para Jordi, por estar siempre.

Agradecimientos

Al Dr. Lourival D. Possani a quien le debo mis primeras cosechas en el laborioso terreno de la Investigación Científica. Su apoyo, su rigor científico y sus invaluable aportaciones hicieron que este trabajo culminara en una tesis de maestría.

A Fredy Coronas por su valiosa ayuda técnica y a Alexei Licea por todos sus consejos y horas invertidas en este trabajo.

Un agradecimiento especial para todos los Possanis y anexos (Barbara), que de una u otra forma contribuyeron a la culminación de la tesis.

A los que adentro y afuera viven y se desviven,
mueren y se desmueren.

M. Benedetti.

Esta tesis se realizó bajo la dirección de los Drs. Baltazar Becerril Luján y Lourival Domingos Possani, en el Departamento de Reconocimiento Molecular y Bioestructura del Instituto de Biotecnología UNAM, ubicado en Cuernavaca Morelos México. La expresión en baculovirus fue realizada en el departamento de Regulación Genética de la compañía Schering-Berlin, Alemania y contó con la supervisión del Dr. Bernard Heandler y el Dr. Wolf-Ditter Schleuning.

Este trabajo fue financiado en parte por Howard Hughes Medical Institute (No. 75197-527107) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (No. 4734-N) concedidos al laboratorio del Dr. Lourival D. Possani. La alumna recibió beca de maestría del CONACyT No. 96124.

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Lourival Domingos Possani Postay

Dr. Baltazar Becerril Luján

Dr. Alejandro Alagón Cano

Dr. Jorge Nieto Sotelo

M. en C. Beatriz Palmeros

JURADO DE EXAMEN

Presidente. Dr. Lourival Domingos Possani Postay

Secretario. Dr. Baltazar Becerril Luján

Vocal. Dr. Eduardo Horjales Reboredo

Suplente. Dr. Jose Luis Puente García

Suplente. Dr. Ernesto Méndez Salinas

INDICE

I PRESENTACIÓN	1
II LISTA DE ABREVIATURAS	2
III RESUMEN	3
IV INTRODUCCIÓN	
Heloderma y componentes del veneno	4
Canales Iónicos	16
Super Familia CRISP	19
ANTECEDENTES	24
OBJETIVOS	32
MATERIALES Y METODOS	33
I Sistema de expresión procarionte	33
I.1 Clonación del cDNA de la HLTX en el vector pCSP105	33
I.2 Expresión de la helotermina en células de E. coli	39
I.3 Purificación de la proteína de fusión	42
II Sistema de expresión eucarionte	46
II.1 Clonación de HLTX en el vector pFastBac	47
II.2 Expresión de la helotermina en células de insecto	52
RESULTADOS Y DISCUSION	57
Sistema procarionte	57
Sistema eucarionte	69
CONCLUSIONES	86
PERSPECTIVAS	87
BIBLIOGRAFIA	88
ANEXO (amortiguadores y medios).....	98

PRESENTACION

El presente trabajo aborda la expresión de la toxina helotermina (HLTX) utilizando dos diferentes sistemas: uno procarionte (células bacterianas) y otro eucarionte (células de insecto), así como la expresión de un dominio de la HLTX.

La primera parte la forman 3 capítulos introductorios:

- a) La biología del *Heloderma* (organismo donde fue aislada la toxina HLTX) y los componentes del veneno del *Heloderma*.
- b) Introducción de los canales iónicos.
- c) Introducción de la superfamilia CRISP.

La segunda parte la comprenden los antecedentes que sirvieron de base para exponer los objetivos de este trabajo.

La tercera parte es una serie de metodologías utilizadas para cumplir los objetivos del trabajo.

La cuarta parte la forman los resultados experimentales y la discusión de los mismos, así como las conclusiones y las perspectivas del trabajo.

ABREVIATURAS

ACF	adyuvante completo de Freund
AIF	adyuvante incompleto de Freund
β -ME	beta-mercaptoetanol
BSA	albúmina de suero bovino (siglas en inglés)
DNTPs	desoxirribonucleótidos trifosfato
EDTA	ácido etilen diamino tetra acético (siglas en inglés)
ELISA	ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (siglas en inglés)
EtBr	bromuro de etidio (siglas en inglés)
HLTX	helotermina
HLTXp	helotermina purificada del veneno de Heloderma
HLTXr	helotermina recombinante
IPTG	isopropiltiogalactopiranosido
LB	medio Luria (siglas en inglés)
MSC	sitio de clonación múltiple (siglas en inglés)
PBS	solución salina amortiguadora (siglas en inglés)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés)
PAGE-SDS	electroforesis en gel de poliacrilamida-sodio dodecil sulfato (siglas en inglés)
PHI	péptido histidina isoleucina
P.I.	punto isoelectrico
P. M.	peso molecular
FSP	factor secretorio pancreático
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio
SET	sacarosa, Tris-HCl y EDTA
SSC	solución salina concentrada (citrato trisódico y NaCl)
TBE	amortiguador de Tris-boratos
VIP	péptido intestinal vasoactivo (siglas en inglés)
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido

RESUMEN

En el presente trabajo se expresó la proteína helotermina (HLTX) del veneno de *Heloderma horridum horriudm* (monstruo de cuentas). Esta toxina cuenta con un efecto hipotérmico en ratones, letargia y parálisis parcial de miembros. Además la HLTX bloquea canales de Ca^{2+} sensibles a rianodina incorporados en bicapas planas (Morrissette y cols. *Biophys. J.* 68:2280-2288, 1995). Este último efecto se considera importante ya que la helotermina podría ser una valiosa herramienta en el estudio de los canales mencionados. La HLTX cuenta con 16 cisteínas, 10 de las cuales se encuentran en el C-terminal, esto sugiere fuertemente la existencia de dos diferentes dominios. Se propone que cada dominio pueda tener una función diferente. La HLTX fue expresada en dos diferentes sistemas:

Sistema procarionte, utilizando células de *E. coli* a las que se les introdujo el vector pCSP105 (bajo el control del promotor de *lac UV*). Este vector contiene un gen de resistencia a ampicilina y está diseñado para expresar una proteína de fusión con el producto del gen 9 del fago T7.

Sistema eucarionte, usando dos diferentes líneas celulares de insecto: Sf9 y "high five". Las células de insecto fueron infectadas con baculovirus recombinantes que contenían el cDNA de la HLTX con su propio péptido señal y una cola de histidinas para su posterior purificación. En este mismo sistema se expresó un supuesto dominio N-terminal.

Análisis por inmunodetección demostraron que tanto la proteína de fusión HLTX/proteína 9 obtenida de bacterias, como la HLTX y el dominio N-terminal obtenidos de células de insecto, fueron reconocidos por anticuerpos producidos contra la HLTX nativa.

INTRODUCCION

Mitos y folklore del Heloderma

La fama del Heloderma como animal venenoso se ve aumentada por los mitos de que ha sido objeto. A continuación se narran algunas de las capacidades venenosas que erróneamente se le han atribuido al Heloderma (datos obtenidos del Boletín del Museo Americano de Historia Natural, 1956). Sumichrast (1864) reportó que el cuerpo del animal usualmente tenía un olor fuerte y desagradable, más intenso en la época de reproducción; posteriormente Duges (1899) relacionó este olor con la saliva y Van Denburgh lo relacionó con el veneno. Los indios Apache de Arizona le atribuyeron al aliento del animal propiedades venenosas (Bendire 1887); Jackson (1941) explicó estas creencias diciendo que el aliento del animal, aunque es desagradable y fétido, no es más peligroso que la exhalación de la boca de cualquier otra criatura que se alimenta de huevos y roedores. Otra de las características erróneas que se le han atribuido al Heloderma es que escupe veneno, los indios mexicanos lo llaman "escupidor" y piensan que su venenosa saliva los defiende de sus enemigos (Brennan, 1942). La explicación que Borgert (1943) le da a esto, es que el Heloderma no cuenta con colmillos especializados que arrojan el veneno como las cobras, por lo que una pequeña cantidad de veneno es acarreada a los labios y es rociada cuando el animal esta excitado y expela el aire de sus pulmones. También se le atribuyen capacidades de picar con la cola (Herrera, 1895) y de tener una lengua venenosa que actúa como telón de alacrán (Shufeldt, 1887).

Los indígenas de Guerrero, Oaxaca, Colima y Jalisco le atribuyen al Heloderma poderes sobrenaturales como: tener influencias sobre fenómenos del agua (lluvias, tormentas), en el ciclo menstrual o en la fortuna de la gente (Gadow 1905). Según Phisalix (1922), los aztecas pensaban que la mordida de Heloderma causaba locura; de alguna manera tenían conocimiento de los efectos del veneno, ya que en humanos causa serios disturbios mentales.

Algunas partes del cuerpo del animal se han reportado como afrodisiacos (carne del lomo), o como cura para la ceguera (lengua), (Hernández 1615., Borgert y Martín del Campo 1956).

DESCRIPCIONES ORIGINALES

Una de las primeras descripciones de un Helodermátido que se conoce es la de Hernández (1615), quien describió el "Acaltetepon" como un animal venenoso de la Nueva España. Este animal fue encontrado en "Cuauhnahuac" que significa enfrente del bosque, en la actualidad este lugar se llama Cuernavaca y es capital del estado de Morelos. La descripción que reporta Hernández no representa al Heloderma que hoy día conocemos, sin embargo conserva muchas de las características del *Heloderma horridum*. En 1834 Wiegmann propuso que se le llamara a ese espécimen *H. hernandesii*.

El *H. suspectum* fue descrito en 1869 por Cope. El espécimen se encontraba en la colección de la Academia de Historia Natural de Filadelfia clasificado como *H. horridum*, pero Cope notó que éste difería del *H. horridum* de la región de Sonora, México y lo clasificó como *H. suspectum* (Borgert y Martín del Campo 1956).

DISTRIBUCION DEL HELODERMA

Los reptiles tienen sólo una familia de lagartos venenosos: la Helodermatidae. En ella existen 2 subespecies: el monstruo de gila (*Heloderma suspectum*) y el escorpión o monstruo de cuentas (*Heloderma horridum*), también llamado entre los nativos como "iguana mensa". Este género cuenta con cinco subespecies: El *Heloderma suspectum suspectum* que se encuentra en Guaymas, Sonora y en el oeste del condado de Yavapai en el centro de Arizona. El *H. s. cinctum*, que habita en el sudoeste de los Estados Unidos (Río Colorado en Arizona y sudeste de Nevada y Utah). El *H. horridum horridum* que se encuentra en el área del Pacífico de México del sudeste de Sinaloa al extremo este del Istmo de

Introducción

Tehuantepec en Oaxaca. El *H. h. exasperatum* que se encuentra básicamente en el río Fuerte en el sudeste de Sonora y la porción adyacente de Sinaloa. Por último *H. h. alvarezii* el cual es conocido sólo en la parte central de Chiapas, pero posiblemente se extienda hasta Guatemala (Borgert y Martín del Campo 1956. Russel y Borgert 1981).

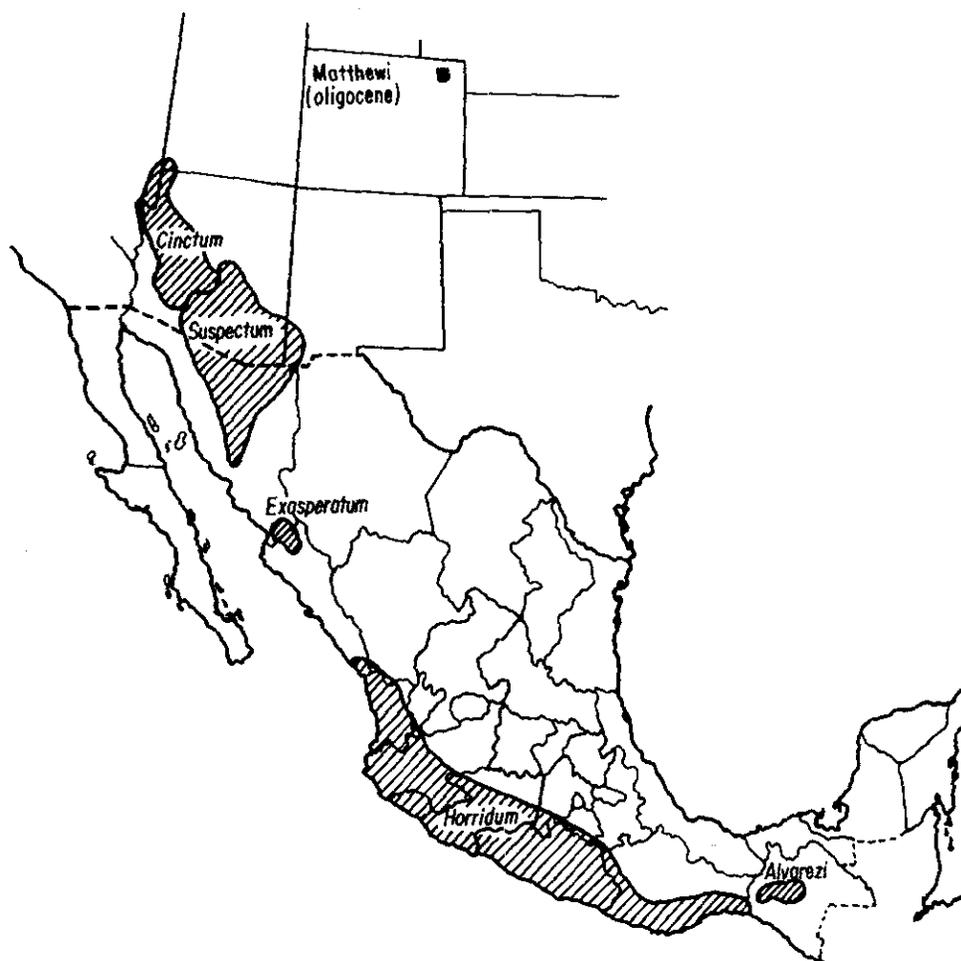


Fig 1. Estados de la Republica Mexicana y Estados Unidos donde habita el Heloderma.

EVOLUCION (restos fósiles)

Los lagartos de la familia Helodermatidae son los únicos saurios que tienen dientes surcados y glándulas venenosas. El primer resto fósil de lagartos relacionados a *Heloderma* fue reportado por Gilmore (1928). Este fósil consistía en una porción de la maxila superior con tres dientes surcados, similares a las especies existentes. Fue hallado en depósitos del Oligoceno de la zona de Oredon de la formación del río Blanco en el condado de Logan, noreste de Colorado y se le dio el nombre *H. matthew*. Otro resto fósil más primitivo del Eoceno tardío y Oligoceno temprano fue reportado por Hoffstetter (1954), encontrado en Phosphorites du Quercy de Francia. Este fósil al que se le dio el nombre de *H. gallicum*, consistía de 4 maxilas casi completas, una base dental sin dientes y algunas vértebras.

Los surcos de los dientes de *H. matthew* son comparables con los de *H. suspectum*, en cambio los surcos del fósil Europeo sugieren un aparato venenoso menos especializado (Borgert y Matín del Campo 1956. Yatkola, 1976).

BIOLOGIA DEL HELODERMA

Son organismos corpulentos de miembros cortos y con movimientos relativamente lentos, tienen cabeza triangular larga, piel granulosa y gruesa, cola redonda y larga (puede llegar a medir la mitad del total de cuerpo). Llegan a medir hasta 55 cm, son de hábitos nocturnos y viven de 10 a 25 años, se alimentan de pequeños mamíferos y de huevos de aves y reptiles. En general tienen pocos enemigos, de los cuales el hombre es el principal, razón por la cual se encuentra en peligro de extinción. Sus hábitos de vida no son conocidos aunque se les encuentra poco de noviembre a marzo. Estos lagartos ponen aproximadamente 4-7 huevos que son incubados alrededor de 117-130 días (Borgert y Martín del Campo, 1956).

APARATO VENENOSO

El aparato venenoso del *Heloderma* consiste en una serie de dientes caniculados (9 dientes, 16-18 maxilares, 8 premaxilares), dotados de conductos secretores y un par de glándulas venenosas que se localizan a cada lado de la mandíbula inferior. Cada glándula está compuesta por varios lóbulos y un tubo que acarrea el veneno a las ranuras de los dientes inferiores por capilaridad. Bajo estas condiciones el veneno puede ser mezclado con la saliva de la mandíbula superior y puede ser acarreado a las ranuras tanto de los dientes inferiores como superiores (Russel y Borgert 1981).

VENENO

La cantidad de veneno extraído varía de acuerdo al tamaño del animal, método de extracción e intervalos de tiempo entre extracciones. El veneno de *Heloderma* es una mezcla de saliva y productos de secreción de las glándulas venenosas (Mebs, 1968).

El veneno es importante en la alimentación del monstruo de cuentas, porque contiene enzimas digestivas que lo ayudan a digerir sus presas, ya que al igual que las serpientes se las comen enteras (Casas, 1974). Se han reportado diversos valores para la dosis letal media los cuales son mostrados en la tabla de abajo.

LD ₅₀ de Heloderma	0.82 µg/g ratón	3 mg/Kg ratón	1.35 mg/Kg rata	2 µg/g ratón	4 mg/kg ratón	0.45 mg/kg ratón
Vía de administración	No reportado	Intraperitoneal	Intracardiaca	Intravenosa	Subcutánea	Intravenosa
Referencia	Mebs y Raundonat 1966	Jonhson 1966	Patterson 1967	Tu y Murdock 1967	Stybiova 1967	Russell y Borgert 1981

Tabla 1. Dosis letal media reportadas para el veneno del *Heloderma*.

Introducción

Generalmente los síntomas aparecen 25 minutos después del envenenamiento. Los efectos fisiológicos que causa el veneno cuando se inyecta a ratones son cianosis, intoxicación, disnea, convulsiones esporádicas, hemorragia en el ojo y en el tracto gastrointestinal, congestión y edema pulmonar, falla respiratoria, hipotensión y taquicardia (Patterson 1967b Rusell y Borgert 1981).

COMPONENTES DEL VENENO

La composición del veneno es relativamente constante durante todo el año, a diferencia de otros organismos como serpientes y avispas en los que su composición varía de acuerdo a la estación del año. De una electroforesis del veneno total de *Heloderma horridum horridum* se obtuvieron 18 diferentes bandas (proteínas) (Alagón, 1982)

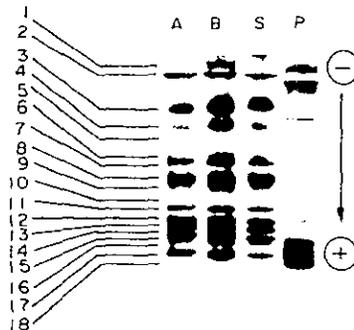


Fig 2. Electroforesis de veneno soluble de *Heloderma horridum* utilizando un gel cilíndrico de poliacrilamida. Los carriles A y B contienen 100 y 200 μg de veneno soluble respectivamente. Carril S y P 100 μg de fracción soluble y precipitado de veneno después del tratamiento ácido. Tomada de Toxicon, Alagón y cols. 1982.

Entre los componentes purificados del veneno de *Heloderma* se encuentran enzimas, péptidos y toxinas:

a) Enzimas

Calicreínas/Esterasas

Estudios comparativos del veneno de *H. horridum* y *H. suspectum* mostraron que tienen el mismo tipo de actividades enzimáticas (Tu y Murdock 1967, Styblova y Kornalik 1967). Mebs (1966) reportó que ambos venenos liberaban quinina de globulinas plasmáticas y de quinínogeno purificado, presentando simultáneamente actividad hidrolítica de esteres de arginina. Posteriormente se logró purificar del veneno de *Heloderma suspectum* una enzima liberadora de quinina de 76,000 Da (Mebs 1970). Alagón (1982) comparó sus resultados con Mebs (1970) y sugirió que la hidrolasa Bz-Arg-OEt que él describió del veneno de *H. horridum*, corresponde a la enzima liberadora de quinina reportada en el veneno de *H. suspectum*. Otra de las enzimas que se encontró en el veneno del *H. suspectum* (Mebs 1972) y de *H. horridum* (Alagón y cols.1986) es una hidrolasa ester etil-L-arginina-N-benzoil de 63 kDa llamada helodermatina. Esta glicoproteína pertenece a la familia de las serina-proteasas y su actividad sugiere una similitud con la familia de las calicreínas (liberadoras de quinina). Nikai (1992) aisló una esterasa más del veneno de *Heloderma*; esta hidrolasa de éster de arginina cuenta con 29 kDa y un P.I. de 4.4. Sus 269 aminoácidos guardan cierta homología con calicreínas de páncreas de puerco.

Hialuronidasas

En 1966 Mebs y Raudonat describieron que el veneno de *Heloderma* tenía actividad hialuronidasa. Duran-Reynal (1933) fue el primero en sugerir que la hialuronidasa promueve y acelera la difusión del veneno y la penetración a través de los tejidos de la víctima, pero no había evidencias científicas documentadas hasta que en 1983 que Tu y Hedon purificaron una hialuronidasa del veneno de

Heloderma. Esta hialuronidasa de 68 kDa no cuenta con actividad tóxica ni proteolítica pero si promueve la difusión de la hemorragia cuando un ratón es inyectado con toxina hemorrágica. El modo de acción de esta enzima se asemeja a las hialuronidasas de espermatozoides, dando una hidrólisis que libera di-, tri- y tetrasacáridos.

b) Péptidos

Helospectinas

Las helospectina I y II purificados del veneno de *Heloderma suspectum* y *H. horridum* son secretagogos pancreáticos de 37 y 38 aminoácidos respectivamente. Por su estructura y bioactividad forman parte de la superfamilia del Glucagon (Parker y cols. 1984., Vandermeers y cols. 1987).

Factor Secretorio Pancreático (FSP) Y Helodermina

Raufman y cols. (1982), observaron que el veneno del monstruo de Gila contenía una sustancia que incrementaba la secreción de una enzima pancreática, así como el incremento de AMPc. Esta sustancia también inhibía de una forma competitiva y dosis dependiente la unión de ¹²⁵I-VIP (Péptido Intestinal Vasoactivo marcado). Los autores concluyeron que el veneno contenía un factor que interactuaba con el receptor de VIP, y que además activaba la adenilato ciclasa estimulando así la secreción de la enzima amilasa en células acinares. Dos años después se demostró que ese factor interactúa principalmente con receptores de secretina del páncreas de rata (Guillet y cols. 1984). Se sugirió también que el veneno contenía un componente parecido a los péptidos secretina/VIP/PHI (Péptido Histidina Isoleucina), responsable de incrementar el AMPc y otro componente que estimulaba la liberación de amilasa por un mecanismo desconocido (Dehaye y cols. 1984). Finalmente, en ese mismo año Vandermeers y cols. descubrieron que eran dos elementos distintos: la helodermina y el Factor Secretorio Pancreático (Vandermeers y cols. 1984).

La helodermina es un péptido de 5900 Da obtenido del veneno de *H. suspectum*. Este péptido es responsable de la activación de la adenilato ciclasa reconociendo tanto a receptores de VIP como de secretina (aunque no se descarta la existencia de receptores específicos). La helodermina a diferencia de VIP o secretina, es inactiva en la secreción de amilasa (Vandermeers y cols. 1984, Robberecht y cols. 1984a, Hoshino y cols. 1984, Vandermeers y cols. 1987), existe además el potencial farmacológico de utilizar a la helodermina como un potente activador de la adenilato ciclasa cardíaca de humanos, por ser un agente menos ionotrópico o cronotrópico que el VIP (Robberecht y cols. 1984b).

El FSP es una proteína de 17500 Da que estimula la secreción de amilasa en acinis pancreático de rata, sin afectar los niveles de AMPc ya que no es capaz de activar la adenilato ciclasa (Dehaye y cols. 1984a). El FSP ejerce una actividad fosfolipasa A₂ estrictamente dependiente de calcio, la cual es termoestable, lipofílica y ácida. Estas características anexan al FSP a la lista de enzimas similares presentes en los venenos de serpientes, abejas y alacranes. (Dehaye y cols. 1984b).

Exendin-3 y -4

Por medio de ensayos químicos (reconocimiento de His¹) se aisló del veneno de *Heloderma horridum* un péptido de 4.2 kDa llamado exendin-3 (Engs y cols. 1990). Este es el tercer péptido con actividad endócrina, encontrado en la secreción exócrina de los lagartos. Siendo el primero la helospectina (exendin-1) y el segundo la helodermina (exendin-2). El exendin-3 tiene 39 aminoácidos y está amidado en el carboxilo terminal; presenta una homología de 32 y 26% con helospectina y helodermina respectivamente. A una concentración de 3µM, exendin-3 estimula el incremento en AMPc celular y la liberación de amilasa del acini pancreático de cuyo. Posteriormente se concluyó que exendin-3 interactúa por lo menos con 2 receptores en acini pancreático de cuyo. A altas

Introducción

concentraciones (100nM) el péptido interactúa con receptores VIP ya que estimula el incremento de AMPc y libera amilasa. A bajas concentraciones (0.1-3 nM) interactúa con un supuesto receptor para exendin, porque causa un pequeño incremento en AMPc y no libera amilasa (Raufman y cols. 1991, Eng y cols. 1992). Del veneno de *H. suspectum* se purificó el péptido exendin-4, el cual cuenta con 39 aminoácidos, difiriendo del exendin-3 por 2 sustituciones de aminoácidos (Eng y cols. 1992). A diferencia del exendin-3 no es secretagogo pancreático e interactúa exclusivamente con el receptor de exendin descrito por Raufman (1991). Muy probablemente la estimulación del receptor de exendin solo propicie el aumento de AMPc sin liberar amilasa (Malhotra 1992).

Tabla 2. COMPARACION DE SECUENCIA PRIMARIA DE LOS PEPTIDOS SEMEJANTES A VIP

Exendin-4	HGEGTFTSDLKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS#
Exendin-3	HSDGTFTSDLKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS#
Helospectina	HSDATFTA EYSKLLAKLALQKYLESILGSSTSPRPPSS
Helodermina	HSDAIFTEEYSKLLAKLALQKYLASILGSRTSPSS#
Secretina	HSDGTFTSELSRLRDSARLQRLQLGLV#
Glucagón	HSQGTFTSDYSKYLD SRR A QDFVQWLMNT
PHI	HADGVFTSDFSRLLGQLSAKKYLNSILN#
VIP	HSDAVFTDNYTRLR KQMAVKKYLNSILN

#amidado

FOSFOLIPASA A₂

Se aisló una fosfolipasa del veneno de *H. horridum* con un peso molecular aparente de 19 kDa. Esta fosfolipasa es de tipo A₂ porque hidroliza la unión 2 acil de 3-n-fosfoglicéridos, también cuenta con una actividad residual tipo B (Sosa y cols. 1986). La actividad fosfolipasa del veneno de *H. horridum* está posiblemente relacionada con la actividad fosfolipasa reportada del veneno de *H. suspectum* como se mencionó anteriormente (Dehaye y cols. 1984). Comparando secuencias del amino terminal de fosfolipasas de veneno de abeja, páncreas de bovino y venenos de serpientes, se encontró que la fosfolipasa de *H. horridum* es más homóloga a la fosfolipasa de veneno de abeja que a las de serpiente. Esto es interesante ya que se esperaría encontrar mayor homología entre secuencias de proteínas que pertenecen al mismo grupo como la clase reptilia que a otra clase menos relacionada como es la insecta (Sosa y cols. 1986). Se han encontrado cinco variantes de la fosfolipasa A₂ en el veneno de *Heloderma suspectum* que estimulan eficientemente la liberación de amilasa de acini pancreático de rata (Gómez y cols. 1989).

Huang y cols. (1994), purificaron una fosfolipasa A₂ de *Heloderma horridum* por un método diferente al reportado por Sosa y cols. (1986), obteniendo una enzima muy similar a la de estos autores, siendo ambas ricas en glicina, aspártico, ac. glutámico, leucina y alanina. Esta fosfolipasa muestra un efecto inhibitorio específico en la agregación plaquetaria inducida por epinefrina de plasma rico en plaquetas.

c) Toxinas

Gilatoxina

La gilatoxina fue la primera toxina de *Heloderma* reportada (Hedon y Tu 1981); esta proteína cuenta con un P.M. 35-37 kDa. La comparación de la secuencia primaria de la gilatoxina con otras proteínas reveló una homología significativa con la secuencia parcial de la horridotoxina (una toxina hemorrágica). También

muestra homología con la helodermatina (una enzima hipotensiva) y con otras calicreínas. La gilatoxina es una proteasa de tipo serina glicosilada, muestra moderada toxicidad 2.5 $\mu\text{g/g}$ a diferencia de otras calicreínas de reptil que carecen de letalidad. (Utaiincharoen y cols. 1993).

Toxina Horridum

Nikai y cols. (1988) purificaron la segunda toxina y la llamaron toxina horridum. Esta proteína pesa 31 kDa, tiene un P.I. de 3.9 y su dosis letal media es de 0.38 $\mu\text{g/g}$ (más toxica que el veneno total). Cuenta con 292 aminoácidos y es una glicoproteína de cadena simple que produce hemorragia en los órganos internos (intestino, hígado, riñón) y en ojos, además muestra efecto sobre la contracción en el músculo liso. Al igual que la gilatoxina cuenta con actividad hidrolítica de ésteres de arginina pero difiere de las enzimas parecidas a las calicreínas.

Toxina Letal

Komori y cols. (1988) purificaron la toxina letal, la cual es péptido de 28 kDa con 275 aminoácidos. Esta toxina es más letal que el veneno crudo (0.38 $\mu\text{g/g}$) y no cuenta con actividades hemorrágica, hemolítica, fosfolipásica y proteolítica de éster de arginina, pero sí con un efecto inhibitorio en la respuesta contráctil de la estimulación del músculo esquelético.

La última toxina reportada es la helotermina, pero de ésta hablaremos en antecedentes.

Toxina	P.M.	P.I.	LD ₅₀
Gilatoxina	35,000 Da	4.25	2.7 $\mu\text{g/g}$
Toxina letal	28,000 Da	3.9	0.135 $\mu\text{g/g}$
Horridum	31,000 Da		0.38 $\mu\text{g/g}$
Helotermina	25,500 Da	6.7	2.5 $\mu\text{g/g}$

Tabla 3. Diferencias de Peso Molecular, P. I. Y DL₅₀ de las 4 toxinas reportadas del veneno de Heloderma

CANALES IONICOS y TOXINAS

A continuación presento una introducción de canales iónicos para una mejor comprensión de los antecedentes, ya que la helotermina (objeto de este estudio) interactúa con canales de Ca^{2+} sensibles a rianodina.

Los canales iónicos son poros macromoleculares selectivos presentes en las membranas celulares. Originalmente fueron considerados sistemas de transporte altamente especializados, involucrados en la señalización eléctrica (células nerviosas y células musculares). Hoy día esto no es tan definitivo, ya que se han encontrado en células procariontes, células vegetales, organelos intracelulares y en tejidos no excitables como epitelios, eritrocitos y glándulas exócrinas (Hille, 1992).

Cada canal puede ser considerado como una molécula excitable y difiere de un simple poro acuoso ya que no está constantemente abierto, sino que su función biológica es activada en respuesta a estímulos específicos de la membrana, como voltaje, estimulación mecánica y unión a neurotransmisores o iones, dándole de este modo una capacidad controlada de cierre y apertura (Hille, 1992).

Los canales iónicos involucrados en la generación de las señales eléctricas se agrupan en dos clases 1) los canales a los que se les unen ligandos (receptor de acetilcolina, receptor del ácido gamma-aminobutírico, etc.) y 2) los canales iónicos sensibles a cambios de voltaje (Catterall, 1988).

Los canales sensibles a voltaje son altamente selectivos ya que sólo permiten el paso de algunos iones. Se sugiere que el poro puede estrecharse en algunos sitios del canal para hacer selectiva la permeabilidad de iones de tamaño y carga apropiada. La conductancia de iones a través de estos canales es de 10^7 por segundo, lo cual es 100 veces mayor que el paso de iones mediado por proteínas acarreadoras (Catterall, 1988).

La excitación y el señalamiento eléctrico en el sistema nervioso involucran el movimiento de iones a través de estos canales. Iones como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- parecen ser los responsables de toda esta acción. Uno de los grandes avances

de los ochentas fue la introducción de los métodos de genética molecular, con los cuales se han obtenido las secuencias de aminoácidos de los canales de sodio, calcio y potasio voltaje dependiente, revelando de este modo una similitud estructural significativa. Ahora se puede hablar de familias de canales iónicos que pueden haberse desarrollado por procesos de duplicación sucesiva de genes, mutación o selección de canales a partir de un ancestro común (Hille, 1992).

Los canales iónicos tienen como función mantener el potencial de membrana durante el reposo, generar señales eléctricas, facilitar el flujo de iones Ca^{2+} (segundo mensajero), controlar el volumen celular y regular el flujo neto de los iones a través de células epiteliales de tejidos secretorios (Hille, 1992). Controlan procesos fisiológicos tan importantes como la iniciación de la contracción muscular, la generación del latido del corazón, la conducción del impulso nervioso, la transmisión sináptica y la secreción de hormonas entre otros procesos celulares. Se sabe que algunas anomalías en ciertos canales iónicos son responsables de algunas enfermedades. La hiperexcitabilidad del músculo esquelético en la miotonía congénita es causada por una carencia de canales de Cl^- ; la autoinmunidad hacia los canales receptores de acetilcolina, causa miastenia grave. Estos ejemplos ilustran el importante papel que los canales iónicos juegan en una gran variedad de procesos celulares (Chandy y cols. 1985).

Un gran número de animales ponzoñosos entre ellos: anémonas, corales, alacranes, serpientes, arañas, abejas, peces, ranas, lagartos etc. producen toxinas. Estas toxinas causan bloqueo específico de diferentes tipos de receptores (incluidos los canales iónicos) de células musculares y nerviosas de sus presas. El efecto tóxico puede manifestarse también a través de actividades enzimáticas (fosfolipasas principalmente) o a través de la inhibición de enzimas importantes (acetilcolinesterasa) para el funcionamiento normal de la presa. Tales toxinas han servido como herramientas poderosas para el entendimiento de las funciones del sistema nervioso y muscular (Tipton y cols. 1994).

El hallazgo de toxinas que actúan sobre los canales iónicos ha permitido lograr

notables avances en el conocimiento de la identificación, purificación, mapeo estructural y caracterización funcional de éstos. El uso de las toxinas como sondas moleculares ha permitido identificar sitios de permeabilidad y selectividad iónica de algunos canales. También las propiedades farmacológicas de las toxinas han servido para evaluar la importancia fisiológica de un determinado canal (Tipton y cols. 1994).

Los canales liberadores de calcio o de rianodina (llamado así por el alcaloide de una planta que se pega al canal) son encontrados en células musculares cardíacas, esqueléticas, neuronas, células exocrinas, células del músculo liso, células epiteliales y linfocitos. En todos estos tipos celulares los canales liberadores de calcio juegan un papel central en la regulación de la concentración de calcio intracelular. El aumento de este ion dispara una cascada de eventos que culminan en la contracción del músculo, secreción de hormonas, activación de linfocitos y fertilización de huevos. Los canales de rianodina del retículo sarcoplásmico constituyen la mayor vía para liberación de calcio durante el proceso de excitación-contracción (proceso por el cual la depolarización inducida por neuronas del sarcolema, permite liberar calcio del lumen del retículo sarcoplásmico al citosol de células de músculo estriado), en el músculo esquelético y cardíaco (Bers y cols. 1991; Radermacher y cols. 1994). El alcaloide rianodina ha sido una invaluable herramienta en la caracterización funcional y estructural del canal de calcio sensible a rianodina, pero cuenta con algunas desventajas que a continuación menciono. La rianodina tiene una cinética de disociación extremadamente lenta que hace este efecto prácticamente irreversible. La unión de rianodina es compleja ya que existen sitios de unión de baja y alta afinidad. A bajas concentraciones (5-50 nM) la rianodina incrementa la probabilidad del tiempo de apertura del canal sin modificar su conductancia unitaria. A concentraciones intermedias (50 nM a 10 μ M) la rianodina deja al canal en un estado de subconductancia abierta. En altas concentraciones (mayores de 100 μ M), el alcaloide cierra completamente el canal de manera irreversible, dando resultados un poco ambiguos y de difícil interpretación

(Coronado y cols. 1994).

Se han caracterizado tres diferentes isoformas del canal: RyR1 es expresada predominantemente en músculo esquelético de mamíferos, mientras RyR2 es expresada predominantemente en músculo cardíaco. RyR3 aparece localizada en cerebro, músculo liso y células epiteliales. Son heterotetrámeros de alto peso molecular (2 millones de Da) (Takeshima y cols. 1989),

SUPERFAMILIA CRISP

PROTEINAS CRISP

Para un mejor entendimiento de esta tesis, anexo esta introducción de la super familia de proteínas secretorias ricas en cisteínas (CRISP), a la cual pertenece la proteína objeto de este trabajo (helotermia).

Los miembros de la familia CRISP, tienen una región C-terminal rica en cisteínas muy conservada. Han sido detectados en diferentes organismos: ratón, rata, humano, cerdo, reptil, así como en diferentes tejidos de epidídimo, glándulas salivales, glándulas venenosas, espermatozoides etc.

La DE/AEG (glicoproteína ácida del epidídimo), fue el primer miembro de la familia CRISP que se reportó. DE/AEG es un polipéptido de 31 kDa sintetizado principalmente en células del epidídimo de rata (Cameo y cols. 1976, Lea y cols. 1978). La función biológica de este péptido es desconocida pero su carboxilo terminal rico en cisteínas muestra secuencias consenso de metaloproteínas (ferrodoxina, rubredoxina y aspartato transcarbamilasa). Esta similitud sugiere fuertemente que la DE/AEG es una metaloproteínasa (Charest y cols. 1988). Una característica importante es que su RNAm es regulado por andrógeno (Brooks y cols. 1986, Charest y cols. 1988) ya que al castrar ratones machos esta proteína deja de producirse.

Se vuelve interesante especular el papel de AEG en la maduración de espermatozoides por su capacidad para unir metal, ya que el zinc es incorporado al flagelo del espermatozoide en los túbulos seminíferos del testículo durante la

Introducción

espermiogénesis y la eliminación de este metal permite el incremento de movilidad del espermatozoide (Calvin y cols. 1973, Charest y cols. 1988). Se ha reportado que después de la secreción en el lumen epididimal, AEG se une a la región postacrosomal de la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide mediante un posible receptor (Brooks y cols. 1983). También se reporta la existencia de receptores para DE/AEG en la membrana plasmática de óvulo de rata (Rochwerger y cols. 1992) y se ha involucrado en la formación de rosetas (agrupación de espermatozoides a partir de la cabeza) (Fornes y Burgos 1994). Estos resultados y estudios de inmunización indican que esta proteína está participando en procesos de fertilización (Cuasnicú y cols. 1984). Con la expresión de CRISP-1 en el epidídimo, la aparición paralela de motilidad y el aumento del potencial de fertilización del espermatozoide, se ha propuesto que CRISP1/DE/AEG juegan un papel directo en la maduración de espermatozoides (posiblemente en la adquisición de motilidad).

CRISP-1 es un polipéptido de 30 kDa, también ha sido llamado Aeg 1 (Mizuki y Kasahara 1992) y es la contraparte de DE/AEG en ratón. Esta proteína es expresada principalmente en la cauda del epidídimo y en menor cantidad en glándulas salivales (Mizuki y Kasahara 1992, Heandler y cols. 1993, Eberspaecher y cols. 1995). Se han encontrado varias diferencias entre la AEG de rata y la CRISP-1 de ratón: su punto isoeléctrico: 4 y 6.8 respectivamente y su capacidad de unirse a espermatozoides, la cual es nula en CRISP-1. Se han encontrado 5 diferentes subtipos de CRISP-1 en humano, uno de los cuales carece de la parte C-terminal rica en cisteínas (Krätzchmar y cols. 1996).

Eberspaecher y cols. (1995), reportaron a partir de estudios de los puentes disulfuros, una posible estructura secundaria para un dominio de CRISP-1, (fig 7). Ellos sugieren dos dominios: el dominio N-terminal que cuenta con 6 cisteínas formando 3 puentes disulfuro y el dominio C-terminal con 10 cisteínas formando 5 puentes disulfuro. El gen que codifica para la CRISP-1 está organizado en ocho exones y siete intrones, en la región promotora se encontraron secuencias

Introducción

consenso ARE (elementos que responden a andrógenos) y secuencias consenso para unión de factores de transcripción PEA3, Oct, GATA, CF1, AP y AP3 (algunos de estos factores de transcripción se han encontrado sólo en epidídimo y cerebro) (Krätzchmar y cols. 1996, Schwidetzky y cols. 1997)

La CRISP-2 ó Tpx-1 (Kasahara 1989), es un polipéptido no glicosilado que se expresa principalmente en el testículo y en menor cantidad en el epidídimo de ratón (Krätzchmar y cols. 1996). El gen de Tpx-1 fue mapeado en el cromosoma 17 y tiene su contraparte en humano TPX1 (Kasahara y cols. 1989), y en cuyo (Hardy y cols. 1988).

El autoantígeno 1 es una proteína específica de testículo y es el mayor antígeno en el acrosoma de espermatozoide de cuyo con un P.M. de 25 kDa. Es homólogo a la Tpx-1 87% (ratón) y a la TPX1 77% (humano), cuenta con 17 cisteínas (16 de las cuales están conservadas como en toda la familia CRISP), y no está glicosilada (Foster y Gerton 1996).

La CRISP-3 (Heandler y cols. 1993), primero llamada Aeg 2 (Mitzuki y Kasahara 1992) es abundantemente expresada en la glándula salival submandibular y es controlada por andrógenos. Su organización genómica consiste en 8 exones y 7 intrones y su región promotora contiene regiones que se relacionan con elementos que responden a andrógenos (ARE) (Schwidetzky y cols. 1995). La CRISP-3 es también expresada en líneas celulares pre B murinas y en médula ósea bajo el control de Oct (un factor de transcripción que se une a una secuencia de DNA que está conservada en todos los promotores de los genes de inmunoglobulinas). En este tejido, la CRISP-3 no es regulada por andrógenos a diferencia de la expresada en glándulas salivales (Pfisterer y cols. 1996).

Un componente más de esta superfamilia ha sido recientemente aislado del veneno de la serpiente *Trimeresurus mucrosquamatus*. La proteína de veneno

rica en cisteínas (CRVP) fue clonada de una librería de cDNA hecha a partir de las glándulas venenosas de la serpiente "Taiwan habu". La secuenciación de este cDNA reveló que consta de 1318 pb. La CRVP fue expresada en células de *E. coli* y esta proteína presentó un P. M. de 20 kDa (Chang y cols. 1997).

PROTEINAS PR

Las proteínas PR (relacionadas con la patogénesis) forman parte de una respuesta multicomponente de defensa en plantas expuestas a virus, viroides, hongos, bacterias y ciertos químicos. Estas proteínas guardan un 30 % de homología con las proteínas CRISP, solo que las PR no cuentan con el dominio C-terminal.

Las primeras PR fueron detectadas en hojas de tabaco que reaccionaban al virus de mosaico del tabaco con hipersensibilidad (Van Loon y Van Kammon 1970). Las proteínas PR fueron inicialmente definidas como polipéptidos con relativo bajo peso molecular, extraíbles selectivamente a bajo pH, altamente resistentes al ataque de enzimas proteolíticas y detectadas principalmente en el espacio intracelular (Van Loon 1985). Sin embargo, muchas PR no entran dentro de estos criterios, ahora se han clasificado diferentes tipos basados en su secuencia primaria y en análisis serológicos (Cornelissen y cols. 1987, Walter y cols. 1990). Se desconoce la función bioquímica de muchas PR, sólo se han identificado dos funciones: endoquitinasas (Legrand y cols. 1987) y 1,3- β -glucanasa (Kauffman y cols. 1987). Más recientemente la actividad de glucanhidrolasas ha sido asociada con las proteínas PR (Kombrink y cols. 1988). Las proteínas PR han sido descritas por lo menos en 20 especies de plantas incluyendo dicotiledóneas y monocotiledóneas. Estas proteínas también se inducen en plantas durante su floración, senescencia, estrés y plasmólisis (Kauffman y cols. 1990). Existen 2 isoformas la vacuolar y la extracelular y al parecer son productos de diferentes genes (Dixon 1991).

ANTIGENO 5

Existen otras proteínas relacionadas con las CRISP que provienen de insectos y causan alergia en humanos: antígeno 5 (Dol m VA y VB) del veneno de avispón, Ves v V del veneno de avispas (yellow jacket) y Pol a V del veneno de avispa común. La función biológica de estos péptidos es desconocida, pero tienen secuencias similares con las proteínas relacionadas con la patogénesis PR de 15 kDa y con las proteínas de epidídimo de mamíferos de 26 kDa (Lu y cols. 1993).

ANTECEDENTES

Los primeros antecedentes de este trabajo fueron reportados por Mochca-Morales y cols (1990), ellos aislaron una nueva toxina del veneno de *Heloderma horridum horridum*. La purificación fue hecha a través de una primera cromatografía de filtración en gel usando Sefadex G-75, seguida por una cromatografía de intercambio iónico en DE-celulosa y dos en Carboximetil Celulosa. Obtuvieron de esta forma un polipéptido de un peso molecular aparente de 25,500 al que llamaron helotermina (HLTX).

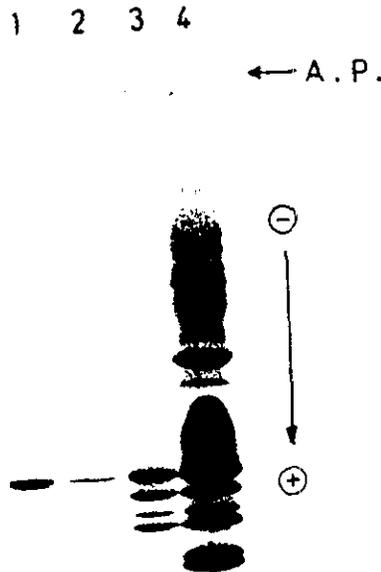


Fig 3. Análisis electroforético de fracciones obtenidas por cromatografía. SDS-PAGE 15% utilizado para analizar varias fracciones obtenidas de las cromatografías. Carril 1, 20 μg de helotermina purificada. Carril 2, 10 μg del pico obtenido de la columna DE-celulosa. Carril 3, 20 μg de proteína de la fracción II de Sefadex G-75. Carril 4 veneno soluble (50 μg). Tomada de Toxicon, Alagón y cols. 1982.

La LD₅₀ reportada para esta toxina es 2.5 µg/gr y al ser inyectada en ratones causa letargia, parálisis parcial de miembros y disminución en la temperatura del cuerpo. La figura de abajo muestra una representación gráfica de la disminución de la temperatura en 8 ratones inyectados intraperitonealmente con 30 µg de toxina (aprox. DL₅₀). La temperatura fue medida por vía intrarectal.

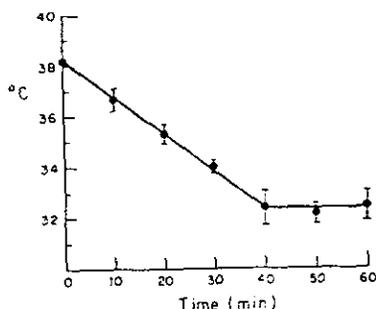


Fig 4. Efecto de la helotermina en la temperatura de cuerpo de ratón. 30 µg fueron inyectados por vía i. p. en 8 ratones de la cepa CD1. Se les tomó cada 10 minutos la temperatura intrarectal. En los primeros 40 minutos después de la inyección una disminución constante en la temperatura del cuerpo fue observada en todos los ratones, estabilizándose en 33-32 grados por 30 minutos. Tomada de Toxicon, Mochca-Morales y cols 1990.

El efecto de parálisis de miembros (Mochca-Morales 1991) sugería que un posible blanco de la toxina podía ser el acoplamiento de excitación-contracción. Se hicieron estudios con dos receptores que se ha propuesto están directamente involucrados en el acoplamiento de excitación-contracción del músculo cardíaco y esquelético. Dichos receptores son: el receptor de dihidropiridina de la membrana plasmática y el receptor de rianodina en membranas de retículo sarcoplásmico (RS) (McPherson y Campbell, 1993). Los resultados de competencia (fig 5) demostraron que la HLTX produce una fuerte inhibición (aproximadamente 50%) en la unión de ³H rianodina a su receptor en retículo sarcoplásmico de músculo esquelético. Esta inhibición fue usando una

concentración de 200 nM de HLTX, sin afectar la unión de (³H) PN200-110 a receptores de dihidropiridina tanto cardíacos como esqueléticos. Dos componentes fueron detectados en la interacción de la helotermina con el receptor de rianodina esquelético. Uno de alta afinidad que inhibe el 60% de la unión de rianodina con aparente afinidad de 20 nM y un componente con una baja afinidad que inhibe la unión de la rianodina en el rango micromolar. La toxina multifásica muestra una dosis dependencia en el RS esquelético y otra en RS cardíaco sugiriendo que varios sitios de la toxina interactúan en el receptor de rianodina (Morrissette y cols. 1995).

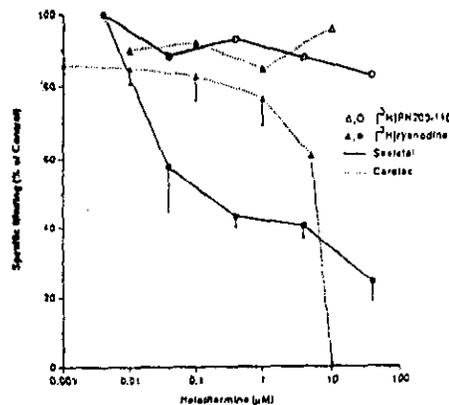


Fig 5. Desplazamiento de (³H) rianodina del retículo sarcoplásmico esquelético y cardíaco usando helotermina. Tomada de Biophysical Journal, Morrissette y cols. 1995.

Al ser el receptor de rianodina un canal de calcio y éste estar involucrado en el acoplamiento excitación-contracción, el efecto de la helotermina podría explicarse en términos de su efecto sobre dicho canal.

Por otro lado Morrissette y cols. (1994) reportaron que la helotermina inhibe el pegado de rianodina a vesículas de músculo esquelético de ratas. Concentraciones micromolares de HLTX disminuyen la probabilidad de apertura de los canales liberadores de Ca^{2+} incorporados en bicapas lipídicas.

Estudios electrofisiológicos con la HLTX probándola en axón gigante de calamar, células ganglionares de pollo y en células del corazón de ratas recién nacidas indicaron en principio que la helotermina no afecta los canales de Na^+ Ca^{2+} o K^+ dependientes de voltaje (Carbone E. y Possani L., Yatani y cols, datos no publicados. Mochca-Morales y cols. 1991). Sin embargo, posteriormente se demostró que la helotermina es un potente inhibidor de los canales de Ca^{2+} en células granulares del cerebro de ratas recién nacidas, ya que bloquea un 50% de la corriente de Ca^{2+} voltaje-dependiente por un mecanismo de acción rápida. La toxina no afecta la cinética de activación-inactivación de Ca^{2+} (Nobile y cols. 1994). Se han realizado otros estudios electrofisiológicos de la HLTX probándola en corrientes de K^+ de células granulares de cerebelo de rata recién nacida. Se ha demostrado que actúa con diferente afinidad en dos tipos de corrientes de K^+ presentes en las neuronas del sistema nervioso central (Nobile y cols 1994b).

Existen dos péptidos del veneno del alacrán *Pardinus imperator* que afectan canales de rianodina. Un inhibidor de 15 kDa (IpTx_i) que inhibe la unión de (³H) rianodina a RS tanto del músculo cardíaco como del esquelético con un ED₅₀ de 10 nM (Valdivia y cols. 1992, Zamudio y cols. 1997a). El segundo es un activador de 5 kDa (IpTx_a) que estimula la unión de rianodina al RS del músculo esquelético a concentraciones nanomolares, pero no al del músculo cardíaco. (Valdivia y cols, 1992. Zamudio y cols. 1997b. El-Hayek y cols. 1995).

Estos estudios son importantes ya que la purificación y caracterización molecular de ligandos que afectan dominios específicos del receptor de rianodina, pueden dar pistas de la estructura del poro, de su estado conformacional, y del control de la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} .

De una librería de cDNA hecha a partir de las glándulas venenosas del *Heloderma horridum horridum*, se obtuvieron dos clonas una de 1104 nucleótidos (Morrisette y cols. 1995) y una de 986 nucleótidos (Pardo, 1995). (GenBank no. de acceso U13619). De la secuencia de nucleótidos se dedujo la secuencia de aminoácidos obteniendo 242 aminoácidos. Esta secuencia coincidió con 5 secuencias cortas obtenidas previamente por determinación de aminoácidos de fragmentos generados por digestión trípica y corte químico. La helotermina cuenta con 16 residuos de cisteínas, un péptido señal de 19 aminoácidos y no contiene sitios potenciales de glicosilación (fig. 6).

TGTTGCACCAATCAGAGGGTGAGGCCCTCTCTAAACTTCCTGGTTTGATGACCAGCAACCCCTGAC	65
<u>L H Q S E G E A S P K L P G L M T S N P D</u>	15
CAACAAACGGAGATCACTGACAAAGCACAAATAACCTACGGAGAATAGTGGAAACCCACTGGCAGC	128
Q Q T E I T D K H N N L R R I V E P T A S	36
AACATGCTGAAGATGACATGGAGCAAT'AAGATGACACAAAATGCACAGCGCTCGGCCAACCAA	191
N M L K M T W S N K I A Q N A Q R S A N Q	57
TGCACCTTGGAGCACACTTCAAAGAAGAGAGAACAATAGATGGTGTAGACTGTGGAGAAAAT	254
C T L E H T S K E E R T I D G V E C G E N	78
CTCTCTCTTCAAGGGCCCTTACACATGGTCTTATGCCATTCAGAAATGGTTTGATGAAAGA	317
L F F S S A P Y T W S Y A I Q N W F D E R	99
AAATACTTTAGGTTTAAATATATGGACCAACTGCACAAAACGTCATGATGGCCATTACACTCAG	380
X Y F R F N Y G P T A Q N V M I G H Y T Q	120
GTGGTTTGGTATAGGCTTATGAACCTGGGTGTGCTATGCCCTACTGTCTGATCAGCCAACT	443
V V W Y R S Y E L G C A I A Y C P D Q P T	141
TACAAGTACTACCAAGTTTGGCAGTACTGCCAGGGGGAAACATTCGAAGCCGGAAAGTACACC	504
Y K Y Y Q V C Q Y C P G G N I R S R K Y T	162
CCGTATTCATAGGACCACCATGCCGGGATTGCCAGATGCTTGGCACAACGGATTTGGCACT	569
P Y S I G P P C G D C P D A C D N G L C T	183
AATCCATGCAAGCAAAATGATGTTTACAACACTGCCCAGACTTGAAGAAACAGGTGGGATGT	632
N P C K Q N D V Y N N C P D L K K Q V G C	204
GGCCATCCTATAATGAAGACTGCATGGCGACTTGCAAATGTCTGACAGAAATAAAA TGA	692
G H P I M K D C M A T C K C L T E I K <u>(fin)</u>	223
GTCTCCAGAATCAACTGATCATGCAAGTCACTCTCCITGCAATTAAGCAATAACCTGGATGCTT	755
TGCTAAATCAGGCTGTCAATTAGATTTGGGTATCCCTCCGTTAAAAATGTAGACCACATGACGG	818
ACATACACACACAAAATGCATAAGCGAATTAATTCATAACGTAATTTCAAAAATGTCCTCTTC	881
TATGTAACCTTTCCAGTTATTTTTTAAAGATCATGAGATTCGCTCTCTTTTTTATTTG	944
CAGCCAAATTTACTAAACTAATAAAGTTCATTCCTTGA	986

Fig 6. Secuencia nucleotídica del gen que codifica para la toxina helotermina. La secuencia subrayada en la parte superior corresponde al péptido señal truncado. La secuencia subrayada en la parte inferior corresponde a la señal de poliadenilación. Tomada de la tesis de licenciatura de Pardo, 1995.

En una comparación de secuencias utilizando el programa GCG de la Universidad de Wisconsin, observaron que la helotermina tenía homología significativa con proteínas secretoras ricas en cisteínas (CRISP). Un 46.3% con la proteína AEG, 45.5% con la proteína CRISP 1, 49.6% con la proteína CRISP 2, 41.5% con la proteína CRISP 3, 48,6% con CRVP (proteína de veneno rica en cisteína). Todas estas proteínas conservan los 16 residuos de cisteínas. Existen otras proteínas que guardan menor homología (30%) con la helotermina, como el antígeno 5 del veneno de insectos y las proteínas de plantas relacionadas con la patogénesis PR (Morrissette y cols. 1995. Chang y cols 1997).



Fig 6. Aliniamiento múltiple y comparación de secuencias en el programa GCG. Helotermina (HELO), toxina de *T. mucrosquamatus* (CRVP), proteína ácida del epidídimo de rata (AEG-rat), proteína de testículo de humano (TPX1-human), Glicoproteína específica de testículo de ratón (TPX1-mouse), Antígeno 5 de veneno de avispas (Dol m VA y VB), de yellow jacket (Ves v V) (Pol a V) y de proteínas relacionadas con la patogénesis (PRP-tobacco, PRP-tomato y PRP-barley). Los 16 residuos de cisteína están marcados con asteriscos. Tomada de Toxicon, Chang y cols. 1997.

Como se mencionó en la introducción, Ebespaecher 1995 propuso una representación esquemática de la estructura secundaria de la proteína CRISP 1. En esta figura se observan 2 dominios estructurales, el N-terminal conformado por 3 puentes disulfuro y el C-terminal que contiene 10 cisteínas y que se piensa forman 5 puentes disulfuro. Las proteínas de avispa y las PR de plantas no cuentan con el dominio carboxilo terminal.

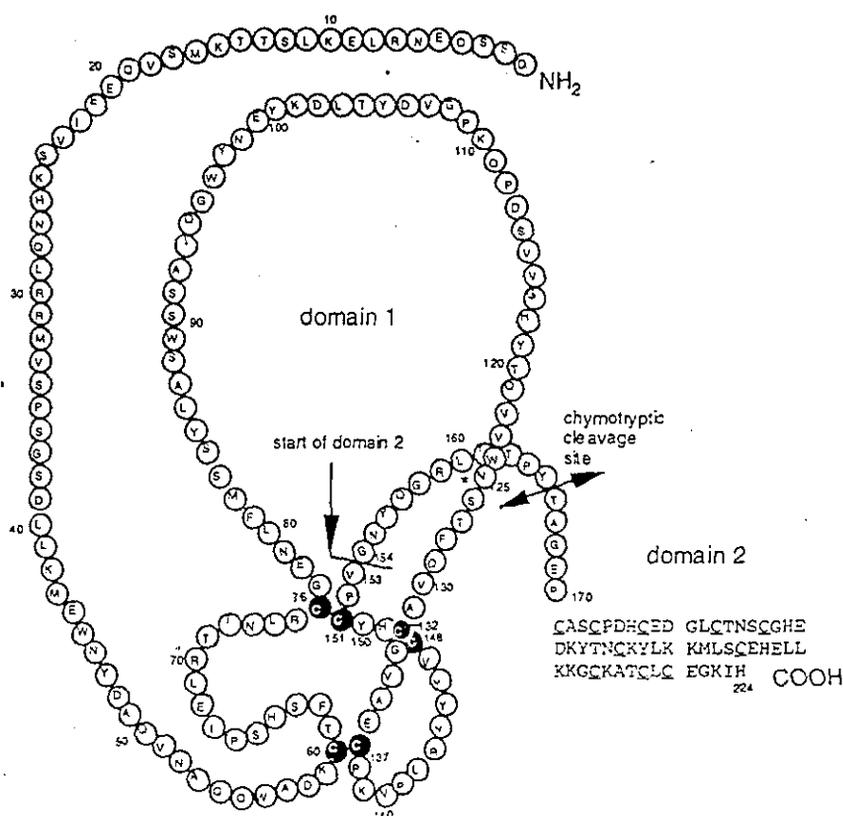


Fig 7. Representación esquemática de la estructura secundaria del dominio N-terminal de CRISP 1. Los residuos de cisteína se muestran en círculos negros. El límite entre dominios está representado con una línea recta entre la posición 153-154. Tomada del Mol. Reprod. Dev. Ebespaecher y cols. 1995.

Debido a las características funcionales de la HLTX que hasta ahora se han reportado: bloqueadora de canales de Ca^{2+} y disminuidora de la temperatura corporal, nos propusimos para este trabajo de maestría expresar a la toxina completa. De este modo tener una cantidad suficiente de HLTX que nos permitirá en un futuro, probar su función en ensayos electrofisiológicos más finos. Otra de las perspectivas es expresar la proteína en dominios separados, considerando que tal vez diferentes dominios estén asociados a diferentes funciones. En este trabajo nosotros expresamos un supuesto dominio N-terminal de HLTX, el cual cuenta con 6 cisteínas, las que probablemente estén formando 3 puentes disulfuro.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

EXPRESION DE LA TÓXINA RECOMBINANTE HELOTERMINA (HLTX) DEL VENENO DE *Heloderma horridum horridum* UTILIZANDO DOS SISTEMAS (EUCARIONTE Y PROCARIONTE).

OBJETIVOS ESPECIFICOS

I Obtención de anticuerpos policlonales contra la HLTX nativa

II Clonación del cDNA de HLTX en un vector de expresión procarionte

III Expresión de la HLTX recombinante en células de *E. coli*

IV Clonación del cDNA de HLTX y el dominio N terminal en un vector de expresión eucarionte

V Expresión de la HLTXr y el dominio N terminal r, en células de insecto

MATERIAL Y METODOS

OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES CONTRA HLTX

Previamente a la inmunización en conejos Nueva Zelanda blancos, se tomaron muestras de suero preinmune para su uso como control en los ensayos serológicos. Los anticuerpos contra HLTX se prepararon por inmunización vía subcutánea de un conejo. El protocolo de inmunización consistió en una primera inyección con 100 µg de HLTX (purificada mediante el protocolo de Mochca-Morales y cols. 1991) en 300 µl de PBS con un volumen igual de adyuvante Completo de Freund (ACF). Quince días después se le hizo una segunda inmunización pero ahora con 50 µg en 300 µl de PBS y 300 µl de Adyuvante Incompleto de Freund (AIF). Cuatro inmunizaciones similares fueron hechas cada 15 días. A partir de la tercera inmunización se sangró al conejo (2 ml) para medir el título por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Este ensayo de ELISA se llevó a cabo, pegando 5 µg/ml de toxina purificada de Heloderma (HLTXp) a una microplaca de fondo curvo (p96 maxisorp), posteriormente se incubó una hora a 37°C. Se bloquearon las uniones inespecíficas con PBS+BSA incubando 1 hora a 37°C. Posteriormente se le adicionó diferentes diluciones del suero policlonal levantado vs. HLTXp, y se incubó 1 hora a 37°C. Se le adicionó el segundo anticuerpo de cabra-anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa en una dilución 1:3000 y se incubó 1 hora a 37°C, para posteriormente revelar la reacción adicionando ortofenilendiamina (0.4 mg/ml) mas H₂O₂ al 30% disueltos en amortiguador de fosfatos 0.1M pH 5. Para el control positivo se utilizó un suero policlonal vs. HLTX previamente obtenido. Como control negativo se utilizó el suero preinmune. La sangría final se realizó una semana después de la sexta inmunización. Los sueros se prepararon permitiendo la coagulación de la sangre durante 3 horas a 37°C. Posteriormente se enfriaron los tubos durante 5 horas en hielo para favorecer la contracción del coágulo y se centrifugaron durante 20 minutos a 2000 g.

SISTEMA DE EXPRESION PROCARIONTE

1.1 Clonación del cDNA de la HLTX en el vector pSCP105.

1.1.1 Adición de sitios de restricción a la clona de cDNA de HLTX.

El cDNA de HLTX (obtenido de una genoteca hecha a partir de las glándulas del Heloderma) se clonó como proteína de fusión con la proteína 9 del fago T7, en el vector pCSP105, el cual tiene un promotor fuerte del fago T7, un sitio de clonación múltiple y resistencia a ampicilina.

Por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se adicionaron al cDNA de HLTX los sitios de restricción de las enzimas *Eco* RI, *Sal* I y *Bam* HI, además del sitio de corte del factor Xa. La reacción se realizó de forma automática en un aparato ciclador de temperatura (*Gen Amp PCR System 9600*, Perkin Elmer). Las condiciones fueron: temperatura de desnaturalización: 95°C 1 minuto; temperatura de alineación: 50°C 1 minuto y temperatura de extensión 72°C 2 minutos durante 30 ciclos.

Tabla 4. Oligonucleótidos usados para adicionar sitios de restricción al cDNA de HLTX.

Oligo	Secuencia
HLTX 1P	5' GAGTCGAC <u>GGATCC</u> ATCGAAGGTCGTGAGGCCTCTCCTAAACTTCCT 3' <i>Sal</i> I <i>Bam</i> HI Xa región 5' del <i>gen</i> HLTX
HLTX 2P	5' GGAATTC <u>TGA</u> TTTTATTTCTGTCAGACA 3' <i>Eco</i> RI FIN Cadena complementaria de la región 3' del <i>gen</i> HLTX

Sal I

1.1.2 Digestión de vector (pCSP105) e inserto (cDNA de HLTX) con enzimas de restricción y su purificación.

Se digirieron el cDNA de HLTX y el vector pCSP105 donado por C. Miller (Brandeis University), con las enzimas *Eco* RI y *Sa* I (Boehringer Mannheim). La reacción fue incubada a una temperatura de 37°C durante 1 hora.

Para la subclonación en el plásmido pKS (Stratagen , La Jolla, CA, USA) se digirió 1µg del plásmido con 1 µl de la enzima de restricción *Eco* RV (Boehringer Mannheim).

Después de la digestión con las enzimas de restricción se aplicaron las muestras en un gel al 1% de agarosa grado analítico (BIO RAD) disuelta en el amortiguador TBE 1X (ver amortiguadores). Los productos de la reacción de restricción se separaron aplicando una corriente de 100 volts por 25 minutos, en cámaras de electroforesis horizontales. Posteriormente se tiñó el gel con EtBr (bromuro de etidio) durante 20 segundos y usando una fuente de luz ultravioleta se reconocieron las bandas de DNA de interés. Estas bandas se cortaron para su posterior purificación mediante el sistema de GlassMax de la compañía Gibco BRL, con el cual en presencia de un agente caotrópico (Nal) el DNA se une a una membrana de silicato dejando pasar todos los contaminantes. Finalmente el DNA es eluido con 20 µl de agua usando centrifugación a 13,000 x g.

1.1.3 Reacción de ligación

Para estimar la cantidad de vector e inserto, se aplicaron 2 µl de ambos DNA purificados por GlassMax en un gel de agarosa al 1% al que le fueron aplicadas las mismas condiciones que se mencionaron en el paso 1.1.2.

Una vez estimadas las concentraciones se hicieron los cálculos para la ligación utilizando la enzima T4 DNA ligasa (Boehringer Mannheim). Las proporciones de vector/inserto fueron 1:1 y 1:5, en las cuales la cantidad absoluta de DNA de

plásmido fue 50-100 ng. La reacción se incubó a 16°C durante 12 horas. Como controles se utilizaron el plásmido sin ligar y el plásmido ligado sobre sí mismo.

I.1.4 Transformación en células de *E. coli* DH5 α y selección de clonas positivas

Para la transformación se utilizaron células de *E. coli* DH5 las cuales fueron preparadas por el método de Inoue y cols. (1990). En este método se creció la cepa DH5 a 18°C con agitación vigorosa por 8 horas. Se incubó 10 minutos en hielo y al término de ese tiempo se centrifugó 10 min a 2500 xg a 4°C. La pastilla de células que se formó, se resuspendió con el amortiguador TB frío (ver amortiguadores) y se incubó en hielo por 10 minutos. Posteriormente se le adicionó DMSO a una concentración final de 7%. Las células se distribuyeron en proporciones de 600 μ l, en criotubos y fueron guardadas en nitrógeno líquido.

Se utilizó el método de electroporación reportado por Dowe y cols. (1988). A una cámara de microelectroporación (BRL) se le adicionaron 20 μ l de células competentes y 1 μ l de reacción de ligación y se le aplicó una corriente de 2.4 Kv. Una vez electroporadas las células se les adicionó 1 ml de medio SOB (ver medios) y se incubaron por una hora a 37°C con una agitación de 250 rpm. Cuando las células cumplieron su tiempo de recuperación, se sembraron 200 μ l y 50 μ l en cajas con 40 μ g/ml de IPTG (SIGMA) y 100 μ g/ml de X-gal (USB) incubándolas a 37°C durante toda la noche.

Se utilizaron tres métodos para demostrar que las colonias bacterianas tenían el plásmido recombinante.

I.1.4.1 α -complementación. Muchos vectores de uso común tienen un segmento de DNA de *E. coli* que contiene la secuencia reguladora y la información que codifica para los primeros 146 aminoácidos del gen de la β -galactosidasa (*lacZ*). Dentro de esta región hay un sitio de clonación múltiple. Este vector es usado en células huésped que en su cromosoma tiene una región que codifica para la β -galactosidasa no funcional (porque le faltan los primeros 146 aminoácidos). La α -

complementación se da cuando estos dos fragmentos se unen. La bacteria Lac⁺ es fácilmente reconocida porque forma colonias azules en presencia de un sustrato cromogénico (X-gal). La bacteria recombinante forma colonias blancas, ya que cuando hay un inserto clonado en el sitio de clonación múltiple se interrumpe la síntesis del péptido de α -complementación. Por tanto la β -galactosidasa codificada en el cromosoma de la bacteria se trunca y no es funcional.

1.1.4.2 Análisis de restricción del DNA plasmídico. El DNA obtenido por preparación a mediana escala, es cortado con enzimas de restricción específicas. De este modo se identifican aquellas colonias que contienen plásmidos con el tamaño de inserto esperado.

1.1.4.3 Hibridación en colonia. En este método se utiliza una sonda radioactiva que pueda hibridar con los plásmidos contenidos en las colonias de bacterias.

Marcaje de oligonucleótido. Se usaron 1.5 μ l de oligonucleótido (0.54 μ g/ml), 5.5 μ l de agua, 1 μ l de amortiguador, 1 μ l P³² ATP (166 μ Ci/ μ l) y 1 μ l de enzima quinasa, teniendo un total de 10 μ l. La mezcla de marcaje se incubó durante 45 minutos a 37°C. Una vez concluido el tiempo de incubación se le adicionaron 90 μ l de amortiguador TE y se filtró en una columna de Sephadex G-75. La columna fue preparada en un tubo eppendorf de 1.5 ml (previamente equilibrada con TE). La filtración fue hecha centrifugando los 100 μ l de la mezcla radioactiva durante 1 minuto a 2000 rpm en una centrífuga clínica (Damos/IEC). Se agregaron 100 μ l de TE a la columna y se centrifugó con las condiciones anteriormente usadas, repitiéndose este paso 5 veces. Se estimó la cantidad de radioactividad presente en cada una de las 5 fracciones, utilizando un contador gamma (Beckman).

Preparación del filtro. Las colonias fueron parcialmente transferidas de cajas de LB con antibiótico a un filtro de nitrocelulosa donde fueron lisadas y el DNA desnaturalizado. Posteriormente se le adicionó la solución de prehibridación la cual consistió de Denhardtts 5X (100X contiene: ficoll, polivinilpirrolidona y

albúmina de suero bovino, todos al 2% P/V), SSC 5X, pirofosfato de sodio 0.05%, SDS 0.1%, DNA heterólogo (timo de ternera 100 µg/ml) y agua. Se incubó a 42°C por 30 minutos. Al concluir el tiempo de prehibridación se agregó la solución de hibridización (contiene lo mismo que la solución de prehibridación, pero en lugar de Denhardtts 5X, lleva 1X). Se adicionó el oligonucleótido marcado radioactivamente y se incubó a 42°C toda la noche. El filtro se lavó tres veces con SSC 5X, SDS 0.1% y pirofosfato de sodio 0.05%, posteriormente se sacó de la bolsa y se lavó con la misma solución pero sin SDS. Finalmente se expusieron toda la noche con una película para autorradiografía (Kodak X-OMAT AR) en un chasis apropiado. Esta autorradiografía se reveló y se fijó con los reactivos estándares para películas sensibles a rayos X.

1.1.5 Purificación de DNA plasmídico y secuenciación

Los tres pasos principales que se ocupan en todas las técnicas para purificar plásmido son: 1) crecimiento de cultivo bacteriano, 2) cosecha y lisis de bacterias y 3) purificación de DNA plasmídico.

Se procesaron alícuotas de 1.5 ml de cultivo en tubo "eppendorf", sedimentando el paquete celular por centrifugación y adicionando 1 ml de amortiguador SET (ver amortiguadores). Posteriormente se centrifugaron las células por 1 minuto a 13,000 rpm y se volvió a resuspender el precipitado celular en 150 µl de SET. Para eliminar el RNA se le adicionaron 5 µl de RNAsa incubando por 10 minutos. Para romper la pared celular se le adicionaron 350 µl de mezcla lítica (SDS 2%, NaOH 0.4 N V/V) incubando 10 minutos en hielo. Para precipitar el DNA cromosomal se le adicionaron 250 µl de amortiguador de acetato de sodio 3 M pH 4.8 y se incubó 10 minutos en hielo. Una vez transcurrido este tiempo se centrifugó 8 minutos y al sobrenadante se le adicionó un volumen igual de isopropanol y se repitió la centrifugación. Posteriormente se lavó el precipitado con etanol al 70% y la muestra se secó al vacío.

La secuencia nucleotídica se determinó usando el método de "terminación de cadena" (Sanger y cols. 1977). Este método se basa en el uso de 2',3'-dideoxinucléotidos (ddNTPs) y su incorporación dentro de una cadena creciente de DNA. La síntesis de las cadenas de DNA finaliza cuando los dideoxinucléotidos son incorporados. Esto es debido a que carecen de un grupo 3' OH, por lo que ya no se puede formar la próxima unión fosfodiéster. Para llevar a cabo este método se utilizó el paquete de Sequenasa (USB) y para la determinación de la secuencia se usaron oligonucleótidos del plásmido pPCSP105 que se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 5. Oligonucleótidos que empalman con el plásmido pCSP105, usados para secuenciar el cDNA de HLTX.

Oligo	Secuencia
PCSP1	5' CGTCGTCAAGTCCAAGTCGAACAGAAAGTAAT 3'
PSCP2	5' AGAACTTCTGCTTTCCCGGAGCACTA 3'

El tiempo de aplicación de corriente a geles fue variable según las necesidades de la lectura (entre 3 y 7 horas). La concentración de acrilamida fue de 7.5% con 8 M de urea. La preparación de los geles se hizo de acuerdo al protocolo de Maniatis y cols. (1989). Se calentaron las muestras antes de aplicarlas al gel (95°C). El gel fue previamente calentado a 50°C y una vez puestas las muestras en el orden GACT se les aplicó una corriente equivalente a 2000 volts. El gel se expuso en un chasis para autorradiografía con una película Kodak X-OMAT AR durante toda la noche, para posteriormente revelarla con técnicas convencionales para películas de rayos X.

1.2 Expresión de helotermina como proteína de fusión

1.2.1 Transformación en células BL21 e identificación de colonias positivas

La cepa de *E. coli* BL21 (DE3) contiene un lisógeno del fago lambda, el cual cuenta con el gen de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor de *lacUV5*, inducible por lactosa (misma que sustituimos por el inductor IPTG).

La construcción pCSP105/proteína 9/HLTX fue introducida en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) siguiendo la metodología del inciso 1.1.4.

La identificación de las clonas positivas se hizo mediante un análisis de restricción (ver inciso 1.1.4.1) y una hibridación en colonia (ver inciso 1.1.4.3)

1.2.2 Expresión de la proteína de fusión proteína9/Xa/HLTX

Para la expresión de HLTXr se empleó, como se menciona anteriormente, el vector de expresión pCSP105. Este vector permite la obtención de quimeras con el producto de la proteína 9 del fago T7 en su extremo amino seguido del polipéptido de interés. El dominio de fusión puede ser eliminado mediante digestión con la proteasa factor Xa, debido a que la zona entre la proteína 9 de T7 y la HLTXr hay un sitio de corte para dicho factor.

Se inocularon las colonias positivas en un litro de medio Luria con ampicilina (100 µg/ml). Se incubaron a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una D.O.₆₀₀ de 0.9 (aproximadamente 5 horas). Se indujo la expresión de la proteína de fusión adicionando 5 mM de IPTG y ampicilina (50 µg/ml) y se incubó por dos horas a 37°C con agitación vigorosa.

1.2.2.1 Electroforesis de proteínas

La separación de proteínas en base a su tamaño se realizó por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE), según Laemmli (1970).

En este trabajo, se utilizaron geles inferiores de 15 y 12.5% de acrilamida.

Las muestras se prepararon siempre en condiciones reductoras con β-mercaptoetanol 5%. Previo a su separación electroforética se desnaturalizaron y redujeron los puentes disulfuro calentando las muestras a 95°C durante 5

minutos. La cámara utilizada fue la Miniprotean II de Bio-Rad. Las separaciones se realizaron utilizando voltajes constantes de 100 V aplicados por una fuente IBI Electroforesis Compact Power Supply. Los geles obtenidos fueron fijados y teñidos con azul de coomasie o bien usados para transferencia a membranas de nylon para inmunodetección de proteínas específicas mediante anticuerpos.

1.2.2.2 Transferencia a membranas de nitrocelulosa de proteínas separadas por SDS-PAGE

Las proteínas una vez terminada la electroforesis se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Optitran) en una cámara trans-Blot® SD Semi-Dry (Bio-Rad). Se pusieron tres papeles filtro Whatman de tamaño del gel, previamente saturados con el amortiguador de transferencia (ver amortiguadores). Sobre la capa de papel filtro se colocó la nitrocelulosa cortada según las dimensiones del gel humedecida con el amortiguador de transferencia. Sobre esta capa de papel se colocó el gel de poliacrilamida (previamente equilibrado por 15 minutos con el amortiguador de transferencia). Finalmente se colocaron tres papeles filtro saturados con amortiguador de transferencia sobre el gel. El gel se transfirió por 1 hora a 25 V. Una vez completada la transferencia, se tiñó el gel en una solución de 50% metanol, 0.1% de coomasie, que posteriormente fue desteñido con una solución de 50% de metanol y 10% de ácido acético para visualizar la eficiencia de la transferencia.

1.2.2.3 Inmunodetección en membranas (Western Blot)

Los geles de SDS-PAGE transferidos a la nitrocelulosa se bloquearon con 3% de BSA en PBS pH 7.4, por una hora a temperatura ambiente. La inmunodetección se realizó con anticuerpos anti HLTXp de Heloderma, producidos en conejo a una dilución de 1:5,000 en PBS+BSA 1%, incubándolos 1 hora a temperatura ambiente. Los filtros fueron lavados 5 veces con PBS+tween 0.05% durante al

menos 15 minutos. Posteriormente los filtros se incubaron 1 hora a 37°C con una dilución 1:3000 en PBS/BSA 3%, de antisuero de cabra anti conejo acoplado a peroxidasa. Los filtros fueron lavados como en el paso anterior y revelados con una solución de diaminobenzidina en amortiguador de fosfatos 0.05M pH 7.4 y H₂O₂ al 1.2%. La reacción fue terminada lavando los filtros como en los pasos anteriores.

1.3 Purificación de la proteína de fusión

1.3.1 Preparación del lisado bacteriano.

El cultivo se centrifugó a 5,000 rpm en un rotor JA-14 a 4°C durante 7 minutos. Las células se resuspendieron en 25 ml de amortiguador de lisozima (ver amortiguadores), lisando el paquete celular con 2.5 ml de lisozima (2 mg/ml). Se añadieron los siguientes inhibidores de proteasas: PMSF 1mM, EDTA 50 mM, leupeptina a 1 µg/ml y pepstatina a 1 µg/ml. Posteriormente las células se rompieron por sonicación durante 10 minutos en forma intermitente para evitar el calentamiento de la muestra. El material insoluble se separó del sobrenadante centrifugando a 15,000 rpm en un rotor JA-20 a 4°C durante 20 minutos. Después de la centrifugación el sobrenadante se paso por fibra de vidrio para eliminar restos de material insoluble.

Para la purificación se usaron 2 metodologías:

1.3.1.1 Purificación con el protocolo usado para la proteína 9 del fago T7.

Cromatografía de intercambio iónico.

Se pasaron las proteínas solubles por una columna de DE-52 (2.5 cm de diámetro, 4 cm de largo) la cual previamente se equilibró con amortiguador A (ver amortiguadores). Se lavó la columna hasta que la OD₂₈₀ fue menor de 0.030. Se

eluyeron las proteínas con un gradiente lineal de 50 a 500 mM de NaCl (60 ml de amortiguador A y 60 ml de amortiguador B).

1.3.1.2 Purificación mediante fraccionamiento de sulfato de amonio y cromatografía de afinidad

1.3.1.2.A Fraccionamiento de proteínas con sulfato de amonio

Se obtuvo la proteína total de *E. coli* BL21 (DE3) siguiendo la metodología del inciso 1.2.3.1.A. Posteriormente se hizo un fraccionamiento de proteínas a diferentes porcentajes de sulfato de amonio (20%-60%). A un volumen establecido de proteínas se le adicionó poco a poco la cantidad de sulfato de amonio en polvo que llevara la solución al porcentaje deseado. Esta reacción se equilibró agitando la solución suavemente con un agitador magnético, a 4°C y controlando que el pH no bajara de 7. Se probaron diferentes tiempos de equilibrio (30-90 min.) Posteriormente se centrifugó la muestra a 10,000 rpm en un rotor JS 13.1 de columpio, durante 20 minutos. El precipitado de proteínas se resuspendió en PBS (ver amortiguadores). El sobrenadante se recicló para otro fraccionamiento, después de haber tomado una alícuota. Ambos precipitado y sobrenadante se dializaron haciendo 4 cambios de 1 hora contra PBS.

La cuantificación de las proteínas en las diferentes muestras se realizó mediante el método de Bradford (1976), que se basa en la unión cuantitativa del azul Coomassie a las proteínas (reactivo 5X de Bio-Rad). La unión del colorante a las proteínas se detecta a una absorbancia de 596 nm. La concentración de proteínas en las muestras se determinó por comparación a una curva patrón. La curva fue hecha con diferentes concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino desde 0.062 mg/ml hasta 1 mg/ml.

La helotermina no es una enzima, por lo cual no se puede medir ninguna

actividad. Para tener una idea de donde realmente se estaba quedando la mayor parte de la proteína de fusión, obtenida por el fraccionamiento con sulfato de amonio, se hizo un ensayo de ELISA. Para el experimento de cuantificación por ELISA se hizo un experimento control. En este experimento se pegaron diferentes concentraciones de proteínas obtenidas por la precipitación de 25% de sulfato de amonio a microplacas de fondo curvo (p96 maxisorp). Las concentraciones probadas fueron de 1 µg por pozo hasta 3.5 µg/pozo. De este experimento se concluyó que se podía usar para experimentos posteriores una concentración de 2.5 µg ya que entra dentro de la linealidad de la gráfica.

2.5 µg/pozo tanto de la proteína total como del precipitado y sobrenadante obtenidos a partir de 25% de sulfato de amonio se unieron a la placa de ELISA (p96 maxisorp). Se incubó una hora a 37°C y se desechó el exceso de proteína no absorbida. Se bloquearon todas las uniones inespecíficas con PBS+BSA 1% incubando 1 hora a 37°C. Se eliminó el líquido y se lavó la placa 5 veces con una solución de PBS+tween 0.01%. Posteriormente se le adicionó anticuerpo policlonal de conejo levantado contra la HLTX nativa, en una dilución de 1:10,000 utilizando PBS+Tween 0.05%+BSA 1%, incubando una hora a 37°C. Se lavó la placa 5 veces como el paso anterior. Se adicionó un segundo anticuerpo de cabra-anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa en una dilución 1:3000 en PBS+0.05% Tween+0.1% BSA e incubando a 37°C por una hora. Posteriormente se lavaron las placas y se revelaron por la adición de ortofenilendiamina (0.4 mg/ml) más H₂O₂ al 30% disueltos en amortiguador de fosfatos 0.1M pH 5. La reacción se terminó añadiendo 25 µl de HCl 6 N y la D. O. ⁴⁹² se determinó en un lector de placas (Bio-Rad). Los ensayos se hicieron en pocillos por duplicado.

1.3.1.2.B Cromatografía de afinidad

Preparación de la Resina: 2 ml de EAH Sepharosa 4B se lavaron en tres ocasiones con H₂O por centrifugación a 2,000 rpm durante 10 minutos a

temperatura ambiente. Posteriormente se lavó la resina 5 veces con amortiguador de carbonato-bicarbonato 0.1 M pH 8.5 en las mismas condiciones que el paso anterior.

Activación de EAH Sepharosa 4B: Se mezcló suavemente los 2 ml de resina con 4.66 ml de amortiguador carbonato-bicarbonato 0.1 M pH 8.5 y 0.66 ml de Glutaraldehído 25%, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó la resina seis veces con amortiguador de carbonato-bicarbonato 0.1 M pH 8.5 (se guardó la solución del sexto lavado a 4°C para determinar DO_{280} nm).

Acoplamiento de HLTX a la resina: Los 2 ml de resina activada se mezclaron con 500 μ g de HLTXp. Se mantuvieron en agitación durante toda la noche a temperatura ambiente. Se centrifugó a 2,000 rpm durante 10 minutos y se determinó la DO_{280} nm del sobrenadante. Después se agregó a la resina 15 ml de una solución de glicina 0.5 M en amortiguador de carbonato-bicarbonato 0.1 M pH 8.5. Se incubó durante 12 horas a temperatura ambiente con agitación suave.

Lavado de Resina con glicina: Se centrifugó la resina a 2,000 rpm y se descartó la solución sobrenadante. Posteriormente se lavó con 15 ml de glicina 0.1 M pH 2 durante 5 minutos con agitación lenta a temperatura ambiente. Por último se centrifugó a 2,000 rpm y se resuspendió en PBS pH 7.4.

Purificación de Anticuerpos específicos contra HLTX

Todos los pasos de purificación se llevaron a cabo a 4°C. Los 2 ml de resina se empacaron en una columna de plástico (QIAGEN). Se equilibró la columna con 10 volúmenes de PBS pH 7.4. Posteriormente se aplicó 0.5 ml de suero de conejo levantado contra HLTXp, éste se pasó por la columna por lo menos 5 veces para asegurar una completa absorción de los anticuerpos. Se lavó la columna con 5 volúmenes de PBS pH 7.4 o hasta que la lectura de DO_{280} diera menor de 0.030. Se despegó la proteína con 5 volúmenes de glicina 50 mM pH 2.0. Los anticuerpos fueron colectados en fracciones de 1 ml, poniendo previamente en los tubos colectores 250 μ l de amortiguador de fosfatos 1M pH 8.5. Una vez despegados los anticuerpos se lavó la columna con 10 volúmenes de PBS.

Purificación de helotermina recombinante

Para la purificación de HLTXr se hizo una columna de afinidad como en el inciso (I.3.1.2.B) pero ahora se le acoplaron a la resina, los anticuerpos específicos contra HLTXp. La cromatografía se hizo siguiendo la misma metodología que el inciso arriba mencionado

I.3.2 Digestión con el factor Xa

El corte con el factor Xa consistió en solubilizar la proteína en el amortiguador de corte de la enzima (ver amortiguadores). Posteriormente se le agregó la enzima en una relación 1:200 peso/peso respecto a la proteína de fusión. Se dejó a temperatura ambiente por 12 y 24 horas

II SISTEMA DE EXPRESION EUCARIONTE

El sistema de expresión de baculovirus ha sido ampliamente utilizado ya que es un método fácil de usar y cuenta con el promotor fuerte del gen de la polihedrina (30-70% de proteína de insecto es polihedrina).

La producción de esta proteína no es necesaria para mantener la infección en cultivos celulares in vitro, por lo que se han construido vectores (baculovirus) reemplazando el gen de la polihedrina con el cDNA de interés. Estos vectores son introducidos a células de insecto, las cuales producen grandes cantidades de proteína recombinante en los estados tardíos de su ciclo de replicación.

El tipo de baculovirus usado más ampliamente es el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV). Las líneas celulares usadas para su replicación han sido derivadas del tejido ovárico de la pupa de *Spodoptera frugiperda* (Sf) (Fall army worm).

Este sistema cuenta con varias ventajas como son: altos niveles de expresión heterólogos, tiene la maquinaria necesaria para llevar a cabo parcialmente el

proceso postraduccion de las proteínas eucariontes. También cuenta con la facilidad para manejar insertos de diversos tamaños (88 pb-200 kb) y sólo se replican en invertebrados.

En este trabajo se usó el método Bac to Bac el cual es rápido y eficiente para construir baculovirus recombinante, está basado en la transposición sitio específica de un cassette de expresión proveniente de un plásmido a un bácmido (baculovirus) propagado en *E. coli*.

II.1 Clonación de tres diferentes construcciones en el plásmido donador pFasBac

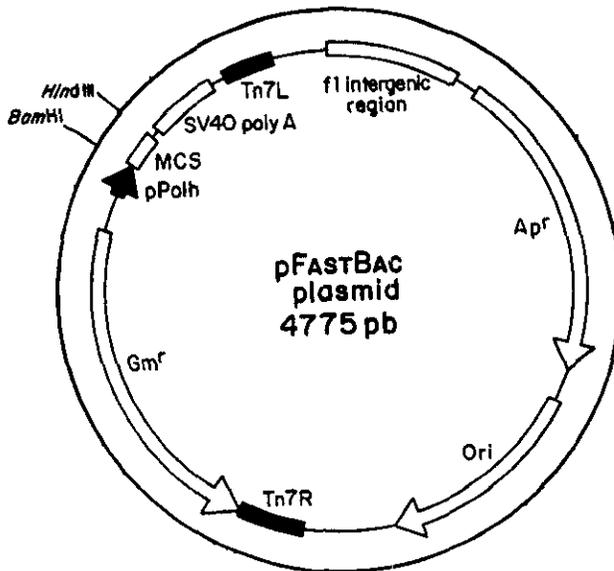


Fig 8. El plásmido pFastBac con un cassette de expresión, el cual consiste en un gen de resistencia a gentamicina, el promotor de la polihedrina específico del baculovirus, un sitio de clonación múltiple y una señal de poliadenilación de SV40, todo esto insertado entre el brazo izquierdo y derecho del transposón Tn7.

II.1.1 Adición de sitios de restricción por medio de PCR a la clona de cDNA de HLTX

Por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se adicionaron los sitios de restricción de las enzimas *Bam* HI y *Hind* III así como una cola de histidinas.

Tabla 6. Oligonucleótidos usados para adicionar sitios de restricción y cola de histidinas al cDNA de HLTX

Oligo	Secuencia
Helo/Bam	5' GCGATAGGATCCATGATCCTGCTCAGTTTATATTTG 3'
HeloHind/His	5'CGCTATAAGCTTCAATGGTGATGGTGATGGTGTTTTATTCTGTCAG ACATTTG 3'
Helo/Hind	5' CGCTATAAGCTTCATTTTATTCTGTCAGACATTTG 3'
HeloDoHis	5' CGCTATAAGCTTCAATGGTGATGGTGATGGTGCCCTGGGCAGTACTG GCAA 3'

La reacción se realizó de forma automática en un aparato ciclador de temperatura (*Gen Amp PCR System 9600*, Perkin Elmer). Se usó una temperatura de alineación de 59°C por 30 segundos.

Construcción 1: cDNA de HLTX con su péptido señal + sitios de restricción de las enzimas *Bam* HI, *Hind* III y cola de 6 histidinas



Construcción 2: cDNA de HLTX con su péptido señal + sitios de restricción de las enzimas *Bam* HI y *Hind* III



Construcción 3: cDNA de las primeras 399 pb + sitios de restricción de las enzimas *Bam* HI, *Hind* III y cola de 6 histidinas



II.1.2 Digestión del plásmido pFastBac y de HLTX

Se digirieron tanto el vector pFastBac (fig 8) (Gibco BRL) como los insertos arriba mencionados, con las enzimas de restricción *Bam* HI y *Hind* III (Boehringer Mannheim). Se siguió el protocolo de digestión y purificación de DNA del inciso I.1.2

II.1.3 Ligación del inserto de cDNA de HLTX con el vector pFastBac

Para estimar la cantidad de vector e inserto, se aplicaron 5 μ g de ambos DNA purificados por GlassMax en un gel de agarosa al 1% al que se fueron aplicadas las mismas condiciones que se mencionaron en el paso I.1.2.

Una vez estimadas las concentraciones se hicieron los cálculos para la ligación utilizando la enzima T4 DNA ligasa (Boehringer Mannheim). Las proporciones de vector/inserto fueron 1:1 y 1:5, en las cuales la cantidad absoluta de DNA de plásmido fue 50-100ng. La reacción se incubó a 12°C durante 12 horas.

II.1.4 Transformación y obtención de clonas positivas

Se introdujeron las construcciones pFastBac/HLTX en la cepa HL1-B de *E. coli*. Se usaron 70 μ l de células HL1-B en tubos Falcon de 15 ml (previamente enfriados). Se le adicionaron 1.2 μ l de β -mercaptoetanol y se incubaron las células por 10 minutos en hielo. Posteriormente se le adicionaron 50ng de reacción de ligación y como control de la transfección se usó 1 μ l de plásmido pUC18. Se incubaron los tubos 30 minutos en hielo, al final de esta incubación se les dio a las células un choque térmico a 42°C por 45 segundos. Se incubaron las células 2 minutos en hielo y se le adicionaron 0.9 ml de medio Luria precalentado a 42°C. Finalmente las células se recuperaron a 37°C por 1 hora con agitación (225 rpm). Se sembraron 100 μ l en cajas de Luria agar con 100 μ g/ml de ampicilina.

La única característica para seleccionar las clonas positivas era la resistencia a ampicilina. Corroboramos 10 colonias de las clonas aparentemente positivas, mediante un PCR siguiendo el protocolo del inciso II.1.1. En lugar de usar como templado al DNA purificado, se utilizaron las colonias crecidas en las cajas de Luria agar.

II.1.5 Purificación de DNA plasmídico y secuenciación de las 3 diferentes construcciones

De cultivos de 200 ml de toda la noche se purificó el DNA plasmídico de las tres construcciones por métodos convencionales. Se secuenciaron por el método de Sanger utilizando como sondas oligonucleótidos del plásmido pFastBac (tabla 7). Se verificaron que las tres construcciones estuvieran correctas y que el cDNA de HLTX no tuviese mutaciones.

Tabla 7. Oligonucleótidos que empalman con el vector pFastBac, los cuales fueron usados para secuenciar el cDNA de HLTX.

Oligo	Secuencia
PbacP	5' ACCTATAAATATTCCGGATT 3'
PbacM	5' AAAGCAAGTAAAACCTCTAC 3'

II.1.6 Transformación en células DH10Bac, transposición en el báculo y selección de clonas positivas

El DNA fue transformado en las células DH10Bac, ya que en esta cepa se propaga el báculo (DNA de baculovirus). El báculo cuenta con: un minireplicón F, un segmento de DNA que codifica para el péptido LacZ y en el que esta insertado el sitio de unión para el transposón bacteriano Tn7 (mini-attTn7). Se usaron 70 μ l de células competentes DH10Bac en tubos de polipropileno a los que se le adicionó 1 ng de plásmido donador recombinante incubándolo 30 minutos en hielo. Posteriormente se aplicó un choque térmico a 42°C por 45 segundos y se incubó 2 minutos en hielo. Para la recuperación de las células se les adicionó 900 μ l de medio S.O.C. (ver medios) y se incubó durante 4 horas a 37°C con agitación (200 rpm). Finalmente se sembraron 100 μ l en cajas de Luria con 50 μ g/ml de kanamicina, 7 μ g/ml gentamicina, 10 μ g/ml de tetraciclina, 100 μ g/ml de Bluo-gal y 40 μ g/ml de IPTG.

Se seleccionaron 10 colonias blancas (de cada clona) aparentemente positivas por la resistencia a kanamicina y la alfa complementación del gen de *lacZ* (ver inciso I.1.4.1)

II.1.7 Aislamiento de DNA de báculo recombinante

Se inoculó una colonia bacteriana positiva en 2 ml de Luria con los antibióticos

mencionados en el inciso anterior y se creció a 37°C hasta alcanzar la fase estacionaria (24 horas) agitando a 250 rpm. Se transfirió 1.5 ml de cultivo a un tubo de microcentrífuga y se centrifugó a 14,000 rpm por 1 minuto. Se removió el sobrenadante por aspiración al vacío y se resuspendió suavemente con 300 μ l de solución I (15 mM de Tris-HCl pH 8.0, 10 mM de EDTA, 100 μ g/ml de RNasa). Posteriormente se le adicionó 300 μ l de solución II (0.2 N NaOH, 1% SDS) y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Lentamente se le adicionaron 300 μ l de acetato de potasio 3 M pH 5.5 y se incubó la muestra en hielo por 10 minutos. Acto seguido se centrifugó la muestra 10 minutos a 14,000 x g. El sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrífuga que contenía 800 μ l de isopropanol absoluto, incubando 10 minutos en hielo. Se centrifugó la muestra por 15 minutos a 14,000 rpm a temperatura ambiente, se removió el sobrenadante y se lavó con 500 μ l de etanol al 70%. Finalmente se secó la pastilla obtenida aspirando el sobrenadante de alcohol

II.2 Expresión en Células de insecto

Los baculovirus han sido aislados de invertebrados, principalmente de insectos. Por muchos años, el mayor interés en baculovirus era alrededor de los efectos devastantes que causaba en poblaciones naturales de insectos, escogiéndolos como agentes biológicos para el control de plagas de insectos. Pero en las últimas décadas se han desarrollado vectores de expresión de baculovirus.

Los baculovirus tienen un DNA genómico circular de doble cadena entre 88 y 200 kpb y son divididos en tres subgrupos. El subgrupo de nuestro interés es el subgrupo A, que es el virus de la polihedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica*. La principal línea celular que soporta la replicación de AcMNV ha sido derivada del tejido ovárico de la pupa de *Spodoptera frugiperda* (fall army worm). Las células de insecto son capaces de realizar varios eventos de procesamientos que son requeridos para la formación de proteínas heterólogas activas biológicamente: glicosilación, fosforilación, acilación de ácidos grasos,

amidación. También cuentan con la maquinaria para el procesamiento proteolítico, corte de péptido señal, secreción y etiquetamiento celular, formación de estructura terciaria y cuaternaria etc.

II.2.1 Cultivo celular

Para la transfección se utilizó la línea celular Sf9 (American Type Culture Collection), la cual es una clona derivada de la línea Sf21. Estas células crecen óptimamente a 27°C y duplican su población en 24 horas, pero con temperaturas arriba de 29°C se para la división celular. El medio utilizado fue el Grace's suplementado con 10 % de suero fetal, adicionalmente se le puso Gentamicina 0.1% para evitar el crecimiento de bacterias. El cultivo fue hecho en suspensión, agitándolo a 100 r.p.m para evitar el agrupamiento de células. Para evitar el rompimiento de éstas por estrés mecánico se adicionó en el medio 0.1% de Plurónico F 68 (Sigma), para protegerlas. Una buena aireación se necesitó para un óptimo crecimiento. Los matraces fueron llenados con un cuarto de su capacidad. Las células fueron sembradas a una densidad de 5×10^5 cels/ml, para asegurar que se estabilizaran rápidamente, éstas se continuaron dividiendo exponencialmente hasta alcanzar la densidad de 3×10^8 cels/ml, después de ésta se incrementó la proporción de muerte.

Para la expresión de las proteínas recombinantes también se utilizó una línea celular de insecto llamada "high five" ó BTI-Tn-5BI-4 proveniente de *Trichoplusia ni*. Estas células fueron crecidas como indica Chico y cols. (1997). Se utilizó medio Ex-Cell 401 suplementado con 2% de suero fetal bovino, 0.1% de solución pluronica, 0.5% de gentamicina. Las condiciones de temperatura, aireación y velocidad de agitación fueron similares a las utilizadas en las células Sf9.

II.1.2.1 Conteo de células

Se removió una muestra de células para contar y estimar la viabilidad de las

mismas. Se pipeteó varias veces la muestra con el fin de no tener las células agrupadas, se tomaron 20 μl y se colocaron en la cámara (hematocímetro). Las células fueron observadas en el objetivo 10 X en el microscopio invertido usando el contraste de fase. El cuadrado central representa 1mm² contando el número de células en esta área (el cual es usualmente dividido en 25 cuadros pequeños) y multiplicándolo por 10⁴ da un número estimado de células por mililitro.

II.2.2 Transfección en células de insecto Sf9

El báculo se transfectó en células de insecto Sf9 *Spodoptera frugiperda* usando el agente cellFECTIN (liposoma formado por lípido catiónico que interactúa espontáneamente con el DNA para formar un complejo DNA/lípido). El cellFECTIN facilita la entrada del DNA del baculovirus a las células eucariontes.

Se sembraron 9×10^5 células en pozos de 35 mm, usando un total de 2 ml de medio Sf-900 II SFM 50 unidades de penicilina, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin. Se usaron células de 3 días de cultivo en la fase media logarítmica con una viabilidad de 97%. Se permitió a las células que se unieran a 27°C por una hora. Por otro lado se prepararon las siguientes soluciones: solución A, se mezclaron 5 μl de DNA de báculo purificado en 100 μl de medio Sf-900 II SFM sin antibiótico. Solución B, Se diluyeron 6 μl del reactivo cellFECTIN en 100 μl de medio Sf-900 II SFM. Posteriormente se combinaron las dos soluciones suavemente y se incubaron 45 minutos a temperatura ambiente. Regresando a las células se retiraron de 27°C y se lavaron con 2 ml de Sf-900 II SFM sin antibióticos. Por cada transfección se adicionaron 800 μl de Sf-900 II SFM a cada tubo que contenía el complejo lípido/DNA. Se mezcló suavemente e inmediatamente después se aspiró el medio de las células y se cubrieron con el complejo lípido/DNA incubándolos 5 horas a 27°C. Una vez concluido el tiempo de incubación se removió el sobrenadante de las células y se le adicionó medio Grace's con antibiótico. Finalmente se dejó incubando las células por 72 hrs. a 27°C.

II.2.3 Cosecha del 1er stock de virus y su titulación

Se cosecharon los virus 72 h después de la transfección, se transfirieron los 2 ml a un tubo estéril y se centrifugaron 5 minutos a 500 x g. El sobrenadante resultante se transfirió a un tubo nuevo y se guardó a 4°C protegido de la luz. Se determinó el título de las partículas virales infecciosas por medio de un ensayo en placa. Se sembraron 1.5×10^6 células por pozo 35 mm^2 , permitiendo que se unieran por una hora a 27°C. Se preparó en ese lapso de tiempo las diluciones seriadas de los virus en medio Grace's (desde 10^{-1} hasta 10^{-5}). Se removió el medio de las células después de la hora de incubación y se adicionó por goteo 500 μl de la dilución de virus. Se incubó la placa por 2 horas a temperatura ambiente con movimiento suave. Se mezcló una parte de agarosa de bajo punto de fusión al 3% y dos partes de medio Grace's, ambos precalentados a 37°C. Se aspiró el inoculo y cuidadosamente se cubrieron las células con 2 ml de la mezcla de agarosa. Después de que la agarosa se solidificó se cubrieron los pozos con 1 ml de medio Graces con antibiótico. Se incubaron las placas 6 días a 27°C y al finalizar éste tiempo se le adicionaron 0.2 ml de solución MTT por pozo y se incubaron protegidos de la luz por 2 horas. En estas dos horas las placas de lisis fueron claramente visibles. Finalmente se contaron las placas de lisis y se dedujeron las unidades formadoras de placas por mililitro.

$$\text{pfu/ml} = 1/\text{factor de dilución} \times \text{no. De placas} \times 1/\text{ml de inoculo}$$

II.2.4 Reamplificación de la primera reserva de virus e infección de células de insecto con el baculovirus recombinante.

Para caracterizar los virus recombinantes se necesitaba una cantidad suficiente de material, por lo que se produjo una segunda reserva viral.

Se utilizaron células Sf9 a muy baja densidad (0.5×10^6) las cuales se infectaron con una proporción virus/célula bajo m.o.i. (multiplicity of infection) de aproximadamente 0.1.

Fórmula para obtener el inoculo requerido para la reamplificación del virus

$$\text{Inoculo requerido (ml)} = \frac{(\text{MOI deseado}) \times (\text{no. total de células})}{\text{Título del inoculo viral (pfu/ml)}}$$

MOI: multiplicidad de infección

pfu: unidades formadoras de placas

Se establecieron los parámetros para obtener óptimas condiciones de infección y expresión de las tres diferentes clonas:

Se utilizaron dos diferentes líneas celulares Sf9 y "high five".

Se optimizó la MOI: se infectaron poblaciones de células variando la MOI (3, 5, 8 y 10) y se realizó un ensayo de expresión.

Se optimizó el tiempo: se infectaron células a constantes MOI y se cosecharon a diferentes tiempos (24, 48, 72 y 96 h.).

Para analizar la expresión del virus recombinante se sembraron 6×10^5 células (Sf9 ó "high five") por pozo (en placas de 24 pozos). Se absorbieron a la superficie por 30 minutos a 27°C, después de la incubación se lavaron con medio Grace's suplementado con suero y antibiótico. El suero reemplazó el medio con 0.3 ml de medio fresco y se le adicionó la cantidad necesaria de virus (según la MOI), incluyéndose un control de células sin infectar. Se incubó a 27°C el tiempo necesario (24-96 horas) para obtener una óptima expresión.

Se recuperó el sobrenadante y se guardó, por otro lado se lavaron las células con medio libre de suero y se lisaron con 0.4 ml de amortiguador de ruptura (ver amortiguadores).

Se hirvieron las muestras a 95°C por 5 minutos y separaron las proteínas por SDS-PAGE.

RESULTADOS Y DISCUSION

OBTENCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES CONTRA HLTXp

Se obtuvieron anticuerpos policlonales de conejo contra HLTX purificada de veneno de Heloderma (HLT_{Xp}). A estos anticuerpos se les determinó el título por medio de ELISA.

Título de suero policlonal vs. HLT_{Xp}

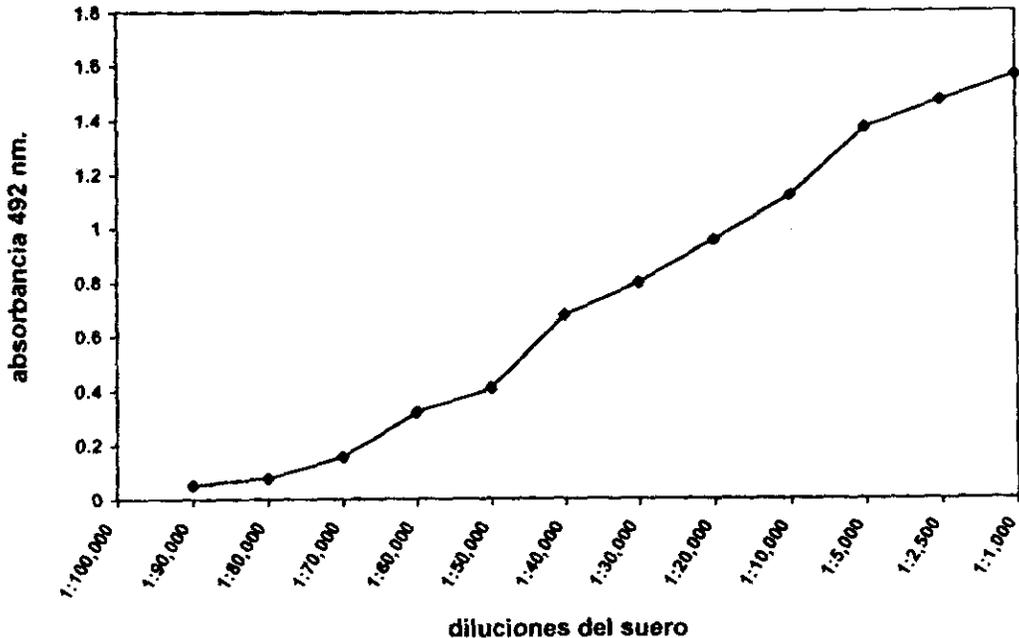


Fig 9. Determinación por ELISA del título del suero anti HLT_{Xp}. Las ordenadas muestran la absorbancia a 492 nm y las abscisas las diluciones del suero, desde 1:1,000 a 1:100,000, usando suero preinmune como control negativo y un suero policlonal vs HLT_{Xp} previamente obtenido como control positivo, el título de lectura fue 1:35,000.

Clonación en el vector pCSP105

Utilizando el cDNA de HLTX (clonado en lambda gt11) como templado, se adicionaron por medio de PCR los sitios de restricción de la enzima *Sal*I y el sitio de corte del factor Xa al extremo 5' terminal, así como el sitio de restricción de la enzima *Eco*RI al extremo 3' terminal (fig 10). Para este PCR se usaron los oligonucleótidos portadores de las secuencias correspondientes los cuales se muestran en la tabla 4.

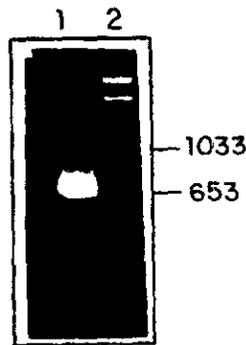


Fig 10. Adición de sitios de restricción por PCR. En la figura se observa la amplificación por medio de PCR del cDNA de HLTX más los sitios de corte de las enzimas *Sal*I y *Eco*RI. En el primer carril se observa el producto de la amplificación del cDNA de HLTX con los sitios de restricción. En el segundo carril se encuentra el marcador de peso molecular en pares de bases.

Al intentar clonar el cDNA de Xa/HLTX para generar una proteína de fusión junto con la proteína 9 del fago T7 en el vector pCSP105, hubo algunos problemas con la digestión del fragmento de cDNA con las enzimas *Eco*RI y *Sal*I. La explicación que nosotros le dimos fue que al diseñar los oligonucleótidos se le dejaron muy pocas bases en los extremos y esto parecía impedir que la enzima reconociera adecuadamente el sitio de restricción y cortara. Para solucionarlo procedimos a insertar el cDNA Xa/HLTX sin digerir en el vector pKS (en el sitio de restricción para *Eco*RV) (ver parte superior de la figura 11). A partir de esta construcción se obtuvo el fragmento *Eco*RI/HLTX/*Sal*I, el cual fue clonado en pCSP105, generando el plásmido pCSP105/gene9/HLTX (ver la porción inferior de la figura 11).

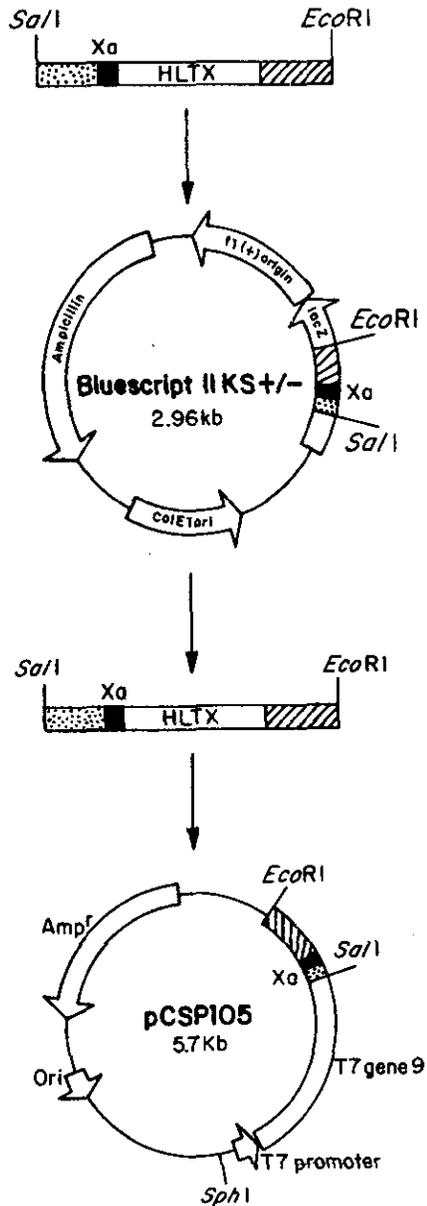


Fig 11. Estrategia de clonación del fragmento *Xa*/HLTX en los vectores pKS y pCSP105. La banda del fragmento *Xa*/HLTX se clonó en el vector pKS en el sitio de *Eco*RV. Posteriormente se digirió con las enzimas *Eco*RI y *Sal*I para clonarlo en el vector pCSP105 y formar así la construcción pCSP105/gen9/HLTX.

Como la única característica del vector para seleccionar clonas positivas es la resistencia a ampicilina, decidimos hacer una hibridación en colonia usando como sonda un oligonucleótido interno marcado radioactivamente (2,244 cpm/ul). De esta hibridación se obtuvieron ocho clonas aparentemente positivas, de las cuales se purificó el DNA plasmídico y con éste se realizó un análisis de restricción utilizando las enzimas *Eco* RI y *Sal* I. De las ocho clonas solo cuatro contenían el inserto de Xa/HLTX (fig. 12, carriles 4, 7, 8 y 9)

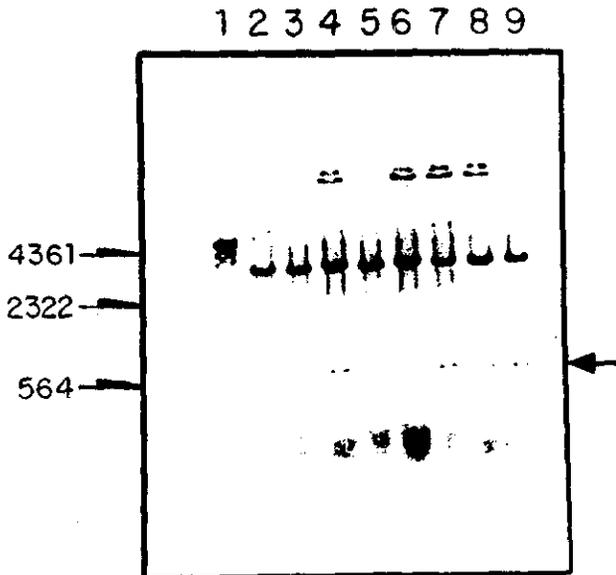


Fig 12. Análisis de restricción de la construcción pCSP105/gen9/HLTX. En esta figura se observa que solo 4 clonas de las 8 aparentemente positivas por hibridación, contenían la construcción pCSP105/gen9/HLTX. Gel de agarosa 1%. Carril 2 Marcador de P.M., carriles 3-10: 8 clonas obtenidas por hibridación en colonia.

Para verificar que las 4 clonas que generaron un inserto del tamaño esperado, estaban en fase, se secuenciaron los extremos 5' y 3' de ambas cadenas. Una vez obtenida la secuencia se analizó y se encontró que el mapa del vector reportado por Park y cols. (1991), tenía más de un sitio de restricción para la enzima *Eco* RI. Esto trajo como consecuencia la delección de 13 codones del vector pCSP105 localizados corriente abajo del sitio de clonación. Deletando de esta forma, el sitio de restricción de la enzima *Hind* III. Como esta nueva construcción no parecía interferir con nuestros propósitos, se procedió a expresar la proteína de fusión en la cepa BL21 (DE3).

Expresión de la proteína9/Xa/HLTX

Al inducir las cuatro clonas con IPTG encontramos que todas expresaban la proteína9/Xa/HLTX, según el peso esperado de la proteína de fusión 61,500 Da: 25,500 Da de la HLTX y 36,000 Da de la proteína 9 (Fig. 13). Para tener una óptima expresión estandarizamos algunos pasos como:

La D.O.₆₀₀ a la que tenían que crecer las células BL21 antes de adicionar el IPTG. Se probaron 2 densidades 0.6 y 0.9, obteniendo una mayor producción cuando se indujeron las células a 0.9. Los distintos niveles de aireación en matraces de cultivo de 2.8 litros usando 250 y 500 ml de cultivo; aparentemente entre más aireación haya mejor es la producción de proteína recombinante. La concentración de inductor, probando diferentes concentraciones de IPTG (0.3, 1, 2 y 5 mM); se demostró que la cantidad de proteína expresada no es dependiente de la concentración de IPTG.

Por último se comprobó que la proteína de fusión no formara cuerpos de inclusión. Esto se comprobó aplicando al cultivo celular varios pulsos de sonicación (1, 2, 5 y 10 pulsos) de 30 seg, obteniendo la proteína soluble cuando sonicábamos con 10 pulsos.

Una vez optimizada la expresión de la proteína de fusión proteína9/Xa/HLTX, calculamos una producción de aproximadamente el 6 % de la proteína total de *E. coli* (fig 13, recuadro izquierdo, carriles 4, 6, 8 y 10)

Para comprobar si la proteína de fusión era reconocida por anticuerpos producidos

contra la HLTXp, se hizo una inmunodetección usando una dilución 1:10,000 del suero anti HLTXp. El resultado de este experimento lo podemos ver en el recuadro derecho de la figura 13, donde las bandas de los carriles 4, 6, 8 y 10 indican que hay reconocimiento de los anticuerpos anti HLTXp por la proteína de fusión proteína9/Xa/HLTX.

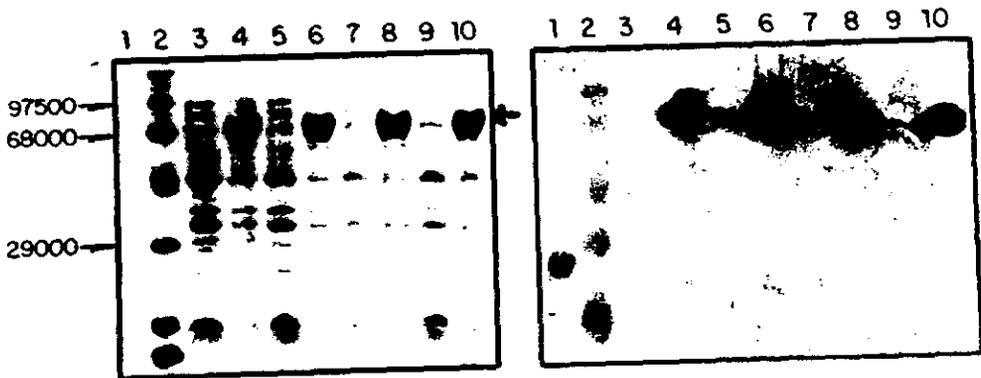


Fig 13. Expresión de la proteína de fusión proteína9/Xa/HLTX. Esta se indujo en la cepa BL21 (DE3) transformada con el plásmido pCSP105/HLTX, como se indica en material y métodos. Se separaron las proteínas de la cepa antes y después de inducir con 0.3 mM de IPTG. El recuadro de la izquierda es el resultado de una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12.5%. El recuadro de la derecha es el resultado del inmunoblot con suero anti HLTXp. Carril 1: 2 µg de HLTXp. Carril 2: Marcador de P.M. carriles 3, 5, 7 y 9 corresponden a las proteínas bacterianas de la cepa BL21 (DL3) antes de inducir las. Carriles 4, 6, 8 y 10 corresponden a las células inducidas con IPTG. Se probó que los anticuerpos no reconocían a la proteína 9, (datos no mostrados).

Purificación de la proteína9/Xa/HLTX

Nosotros escogimos el sistema de expresión que contiene la proteína de fusión del gene 9 del fago T7, porque es un sistema que se ha empleado para expresar grandes cantidades de toxinas de alacrán que afectan canales de potasio. La proteína de fusión del gene 9 tiene la ventaja de ser altamente soluble y carecer de residuos de cisteína, facilitando de este modo la purificación de las dos proteínas fusionadas. Una diferencia notable es el tamaño de las toxinas de alacrán que se han expresado en este sistema (37-39 aminoácidos) y el tamaño de la helotermina (223 aminoácidos). Nosotros tuvimos algunos problemas al usar el protocolo de purificación de proteína9/Xa/CbTx reportado por Park y cols. (1991), el cual consiste en una cromatografía de intercambio iónico. Park y cols (1991) reportaron que la proteína de fusión se eluye a la mitad de un gradiente lineal de NaCl (50-500 mM). En este trabajo se hicieron 6 experimentos de cromatografía de intercambio iónico, de los cuales ningún cromatograma fue reproducible. Creemos que las propiedades de la proteína de fusión se ven altamente influidas por la helotermina y esto vuelve muy inestable su recuperación y por tanto poco reproducible.

Planteamos otro protocolo de purificación el cual consistió en un fraccionamiento de las proteínas totales de *E. coli* usando sulfato de amonio (S.A.). La fracción más enriquecida con la proteína de fusión del fraccionamiento con S.A. se pasó por una cromatografía de afinidad.

Usando todos los parámetros anteriormente mencionados para optimizar la expresión de proteína9/Xa/HLTX, se obtuvieron 105 mg de proteína total de 1 litro de cultivo de *E. coli*. Estas proteínas se fraccionaron con 25% y 50% de sulfato de amonio y la proteína recuperada fue cuantificada por el método de Bradford (Tabla 8). Como la HLTX no tiene actividad enzimática o alguna otra característica que nos permita verificar la cantidad total de HLTXr en cada paso de purificación (como ya se mencionó en la sección de material y métodos), tuvimos que definir una unidad arbitraria de HLTX. La única forma cuantificable de la presencia de HLTXr disponible era un ELISA con anticuerpos generados en contra de HLTXp. Definimos una unidad

de HLTX (deberíamos decir, una unidad de reconocimiento de HLTX por anticuerpos), como: la cantidad de 50 nanogramos de HLTXr por pocillo de placa de ELISA, que en nuestras condiciones experimentales absorbe cerca de una unidad a 492 nm.

	1	2	3	4	5	6
Precipitado de	36.47	6,888	34.7	54.6	189	1.57
25%						

Tabla 8. Resumen del fraccionamiento con diferentes concentraciones de sulfato de amonio.

En una curva dosis-respuesta (vease fig. 14a) realizada con HLTXp se verificó que existe una relación casi lineal en el rango de 0.1 a 1.7 de absorbancia. Además, en cada ELISA tenemos un control interno, utilizando HLTXp. Con base a este dato en la fig. 14b se muestra la cuantificación obtenida en el experimento de precipitación por S. A. En este caso la absorbancia de 50 nanogramos de HLTXp arrojó un valor de 0.834 (segunda barra fig 14b). Así, se calculó para la proteína total del cultivo bacteriano antes de empezar el proceso de purificación, que en 105 mg de extracto proteico teníamos 12,600 unidades de HLTXr (ver tabla 8, columna 1 y 2). De éstos se recuperaron 36.47 mg en el precipitado de 25% de S. A., que contenían 6,888 unidades de HLTX. En el sobrenadante de 25% se recuperaron 39 mg de proteína con un total de solamente 1,060 unidades de HLTXr. Como se puede apreciar la recuperación (en términos de reconocimiento por acs. vs. HLTXp) de HLTXr es de 67,9%, 13,3% de los cuales se quedaron en el sobrenadante de 25% (vease columna 4, tabla 8).

De esta forma se concluye que el precipitado con S. A. a 25% es adecuado para

recuperar la HLTXr 1.57 veces purificada (tabla 8 columna 6). Sin embargo la recuperación de la proteína total es relativamente baja 71.8% (esto es $34.7 + 37.1$ vease columna 3 de la tabla 8).

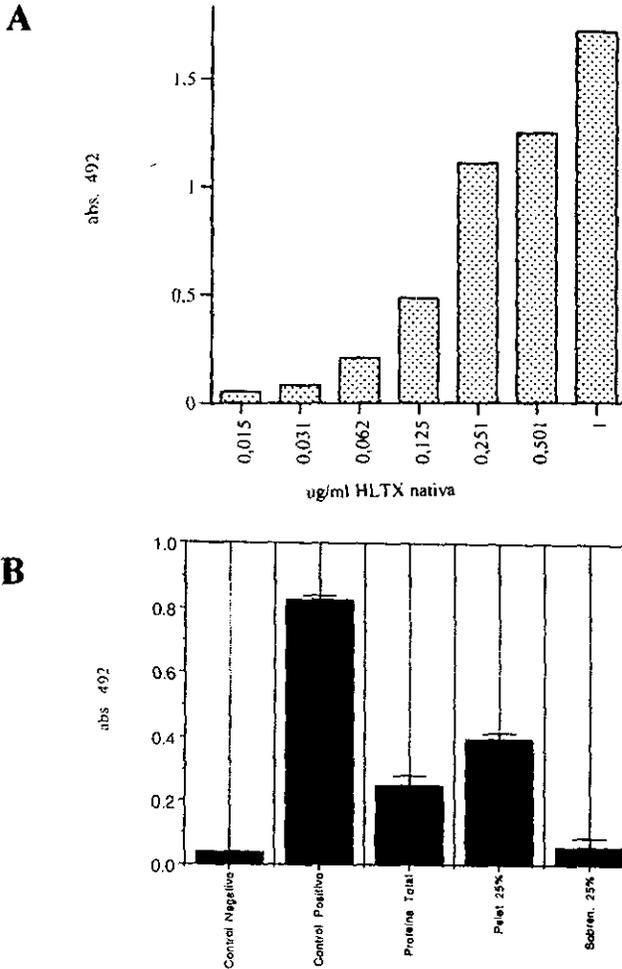


Fig 14a. ELISA con diferentes concentraciones de HLTXp y acs policlonales vs HLTXp. 14b. Resultado de ELISA probando fracciones obtenidas por precipitación con sulfato de amonio. Las ordenadas muestran la absorbancia a 492 nm y las abscisas las fracciones obtenidas precipitando con 25 % de sulfato de amonio. Se usó albúmina como control negativo y HLTXp como control positivo.

También hicimos una precipitación fraccionada con 50 % de S. A., utilizando el sobrenadante de 25% de S. A.. Como en esta fracción solamente quedaba el 13,3% de la actividad HLTXr, no continuamos este estudio. La cantidad de proteína precipitada con 50% de S. A. fue de 39 mg, mientras que en el sobrenadante quedaron 2.1 mg de proteína. Esto es, la mayor parte de la proteína se precipita a 50% de S. A.

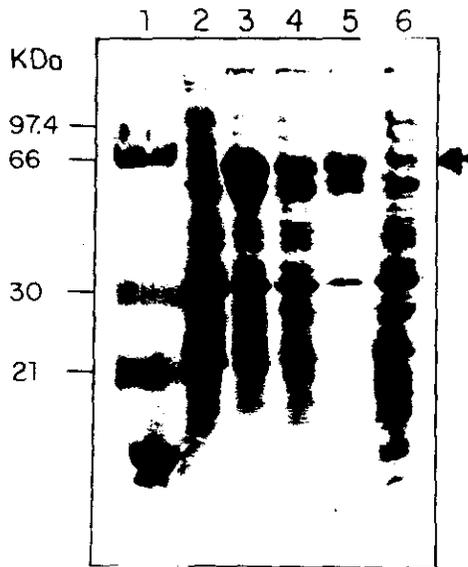


Fig. 15. Fraccionamiento con diferentes concentraciones de sulfato de amonio. En el gel SDS-PAGE al 12.5% se observa una purificación parcial de la proteína de fusión en el producto obtenido por la precipitación con 25% de sulfato de amonio. Carril 1: marcador de peso molecular, Carril 2: extracto de proteína total de *E. coli* antes de inducir. Carril 3: proteína total después de inducir. Carril 4: sobrenadante de 25%. Carril 5: precipitado de 25%. Carril 6: precipitado de 50%.

Una vez obtenida la proteína de fusión más enriquecida se continuó con el protocolo de purificación. Se hizo una columna de afinidad con HLTXp unida a una resina para purificar las IgG específicas contra helotermína. En esta primera columna, se intentó unir 500µg de HLTXp a Sefarosa 4B activada con glutaraldehído, logrando pegar solo 300µg. La cantidad de anticuerpos específicos obtenidos por corrida fluctuaron entre 400µg y 100µg (bajando la afinidad de la columna a medida que se hacían más corridas), por lo que para juntar 3 mg de anticuerpos se hicieron 15 corridas. Para comprobar la afinidad de los anticuerpos por la HLTXp se hizo un ELISA. El resultado de este experimento nos indicó que las IgG específicas vs. HLTXp purificadas por afinidad estaban activas, ya que reconocían a la HLTXp en un ELISA optimizado.

Los 3 mg de anticuerpos se concentraron con un filtro centrífugo™, obteniendo al final de este paso 1.8 mg en 2 ml de PBS, los cuales se unieron a Sefarosa 4B activada por glutaraldehído, logrando pegar 1.5 mg.

Se hizo un experimento para purificar la HLTXr donde se adicionaron 7 mg de las proteínas precipitadas con 25% de sulfato de amonio, a la columna de afinidad. De esta cromatografía se recuperó 50µg en 2.5 ml cuantificado por Lowry. La poca recuperación de la proteína de fusión podría deberse a varios factores: a) que los inhibidores de proteasas no fueron suficientes para la gran variedad de proteínas de *E. coli* que se pasaron por la columna de afinidad, ocasionando la degradación de los anticuerpos pegados en ella, b) que con el tiempo de equilibrio en agitación con el sulfato de amonio (1.5 hrs.) se formaron agregados de la proteína recombinante, que al pasar por la columna de afinidad no son reconocidos por los anticuerpos, c) que sigue habiendo mucha influencia de las demás proteínas que impiden que se dé una buena interacción específica de HLTXr/anticuerpo anti HLTXp y d) que la proteína 9 del fago T7 este obstruyendo el reconocimiento de los anticuerpos hacia la HLTXr.

Se intentó digerir la HLTXr con el Factor Xa (proteasa que libera la HLTXr de la proteína acarreadora), pero no se obtuvieron las dos proteínas separadas, sólo unos productos de digestión a las 24 horas de incubación. Estos productos no fueron reconocidos por los anticuerpos contra HLTX nativa. Debido a la poca cantidad de HLTXr con que se contaba, no se pudo repetir este experimento.

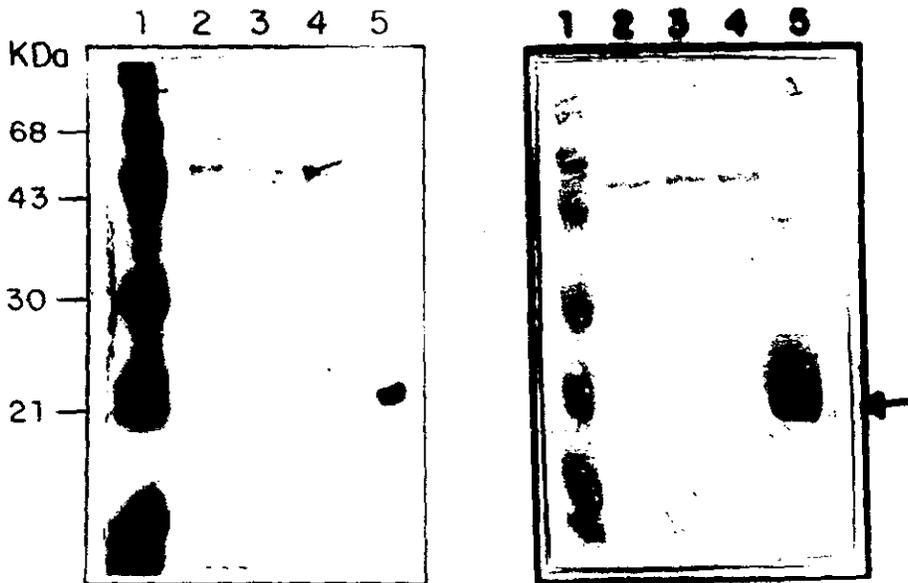


Fig 16. Digestión de HLTX/proteína9, con el factor Xa. La figura de la izquierda representa el gel de SDS-PAGE al 12.5% y la de la derecha el resultado de inmunodetección con anticuerpos policlonales contra HLTX nativa. Se observa en el carril 1 el marcador de peso molecular. En el carril 2 se observan 10 μ g de proteína de fusión (61.5 kDa) purificada. El carril 3 muestra 10 μ g de HLTX/proteína9 cortada con el factor Xa a las 12 horas de incubación a temperatura ambiente. El carril 4 muestra 10 μ g de HLTX/proteína9 cortada con el factor Xa a las 24 horas. En el carril 5 se encuentra 5 μ g HLTX nativa.

En conclusión los intentos de purificación de la HLTX recombinante mediante columna de intercambio iónico, precipitación por sulfato de amonio y cromatografía de afinidad no fueron exitosos.

La razón más probable es la falta de plegamiento correcto de la HLTX recombinante, lo que dificulta la obtención de preparaciones reproducibles que permitan el diseño de una estrategia de purificación adecuada. Un experimento que apoya este argumento es el de toxicidad. Se inyectó intraperitonealmente a ratones un exceso de

HLTXr (aprox. 100µg por ratón) obtenida a partir del precipitado de 25%, los resultados demostraron que la HLTX no tenía ningún efecto que lo diferenciara del control negativo (precipitado de 25% de *E. coli* sin HLTXr). Esto nos habla de una HLTXr mal plegada, que si bien es reconocido por los anticuerpos policlonales vs HLTXp (tal vez por secuencias lineales) no causa el mismo efecto que la HLTXp (baja de temperatura, parálisis de miembros etc.).

Por estas razones se decidió intentar otro sistema que implicara la expresión en células eucariontes, donde la HLTXr tendría mayor probabilidad de plegarse correctamente. El sistema escogido fue el de células de insecto, por las ventajas que se mencionan adelante. El gen que codifica para la HLTX se introdujo a las células de insecto mediante un baculovirus.

SISTEMA EUCARIONTE

La figura 17 muestra los resultados de la amplificación por medio de PCR de la secuencia que codifica para la HLTX y el dominio N terminal (ambos con el péptido señal de la HLTX), en cada caso se obtuvo el tamaño esperado 750 pb y 555 pb, respectivamente.



Fig 17. Amplificación de tres clones por PCR. Gel de agarosa de bajo punto de fusión 1%. El carril 1 es el marcador de peso molecular expresado en pares de bases. El carril 2 es la HLTX con sitios de restricción de *Bam* HI y *Hind* III, cola de 6 Histidinas. El carril 3 es HLTX con sitios de restricción de *Bam* HI y *Hind* III. En el carril 4 se observa el fragmento de DNA que contiene la secuencia que codifica para el dominio N terminal de HLTX con sitios de restricción de *Bam* HI y *Hind* III, además de una cola de 6 Histidinas.

Después de digerir los fragmentos de cDNA amplificados por PCR con las enzimas *Bam* HI y *Hind* III, se clonaron en el plásmido donador pFASTBac generando la construcción pFASTBac/HLTX o pFASTBac/dominio N (ver material y métodos). El plásmido fue previamente cortado con las mismas enzimas que el cDNA. Estas construcciones fueron introducidas a la cepa de *E. coli* HL1-B. De la transformación se seleccionaron 10 colonias a las que se les realizó un PCR para comprobar si contenían la construcción deseada (tabla 10). El PCR se llevó a cabo usando los mismos oligonucleótidos y condiciones mostrados en material y métodos (tabla 6).

Nombre de la construcción	Colonias seleccionadas	DNAs positivos
HLTX con cola de Histidinas	10	13
HLTX sin cola de Histidinas	10	7
Control (sin cola)	10	8

Tabla 9. Resultados de las clonas positivas obtenidas por PCR

Se seleccionó una clona de cada construcción y se crecieron en 200 ml de medio Luria, los cuales se utilizaron para purificar el DNA plasmídico de las 3 construcciones. Este DNA plasmídico se utilizó para realizar la secuencia completa de las 3 construcciones, secuenciando ambas cadenas. Para la secuenciación se utilizaron oligonucleótidos del plásmido que flanquean el casete de transposición (tabla 7). Con los resultados obtenidos se comprobó que la orientación de los insertos era correcta.

Una vez comprobado que las construcciones no tenían mutaciones y estaban en la orientación correcta, se llevó a cabo la generación de baculovirus recombinante. Se usaron dos pasos para la obtención del baculovirus: 1) transformación de pFASTBac/HLTX en las células DH10Bac las cuales contienen el báculo con un sitio blanco mini-attTn7 (donde se une los sitios transponibles) y un plásmido ayudador; 2) transposición del elemento mini-Tn7 del plásmido donador (pFASTBac) al sitio blanco mini-attTn7 del báculo. La transposición se llevó a cabo en presencia de proteínas de transposición provistas por el plásmido ayudador (figura 18).

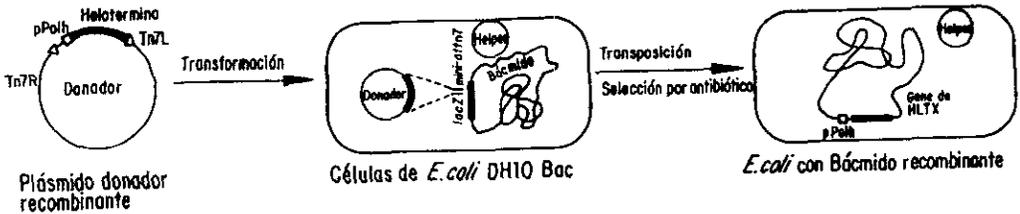


Fig 18. Estrategia de transformación y transposición del cDNA de HLTX al baculovirus.

Las colonias que contenían los bácmidos recombinantes fueron identificadas por la disrupción de gen *lacZα*, la cual da colonias blancas. Se seleccionaron 5 colonias de cada una de aproximadamente 30 +/- 5 colonias blancas por construcción. Las colonias fueron resembradas para corroborar que tuviesen el mismo fenotipo (color blanco). Se encontró que las 15 colonias daban color blanco y se escogió una colonia por construcción a las cuales se les extrajo el DNA de alto peso molecular del bácmido recombinante (aprox. 25,000 pb). El DNA del bácmido fue analizado por medio de electroforesis en gel para comprobar que no estaba degradado y fue entonces usado para la transfección en células de insecto Sf9 como se indica en material y métodos. Posteriormente se cosechó el virus del sobrenadante de la transfección y se le determinó su título por medio de un ensayo en placa.

Para iniciar los ensayos de expresión de las proteínas recombinantes se requería de una mayor cantidad de virus, por lo que se procedió a reamplificar el primer concentrado viral. Se infectaron células Sf9 en suspensión con un contenido bajo de

virus/célula (0.1 MOI). Se incubaron por 4 días para permitir varios ciclos de replicación viral y de infección celular. Este procedimiento incrementó la cantidad de virus y evitó la generación de interferencias de partículas virales defectuosas. En la siguiente figura (19) se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos por medio del ensayo en placa.

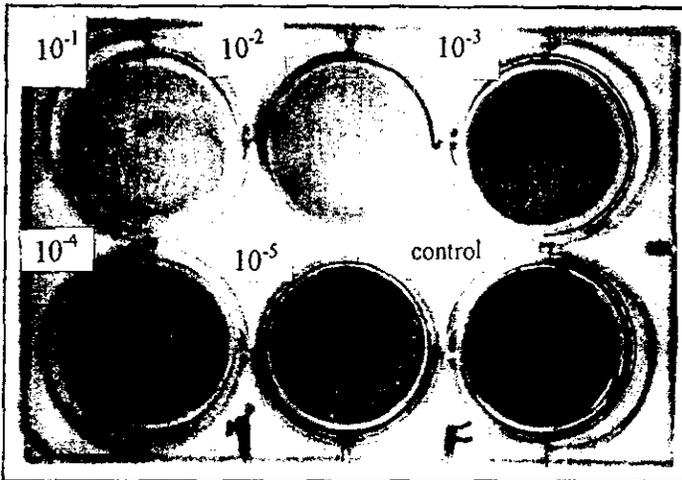


Fig 19. Determinación del título viral de la clona de HLTX + cola de His. En esta figura se muestra el resultado de un ensayo en placa utilizando células Sf9 y diluciones de virus de 10^{-1} - 10^{-5} . Obteniendo 84 placas formadoras de lisis, en la placa infectada con una dilución 10^{-5} .

$$\text{pfu/ml} = 1/10^{-5} \text{ dilución de virus} \times 84 \text{ placas contadas} \times 1/0.5 \text{ ml (volumen de virus)}$$

$$\text{pfu/ml} = 1.6 \times 10^7$$

Donde pfu, son unidades formadoras de placas

Clona	Título del virus (concentrado)	Título del virus (concentrado)	Título del virus (concentrado)
HLTX s/ cola His	1.0×10^7 pfu/ml	6.0×10^7 pfu/ml	ND
Ntermedia HLTX	2.0×10^6 pfu/ml	1.0×10^6 pfu/ml	ND

Tabla 10. Resultados de la titulación de los diferentes concentrados de virus. ND, no determinado.

La expresión de las clonas se realizó en dos líneas celulares: Sf9 y "high five". Las líneas celulares fueron crecidas bajo condiciones nutricionales y factores ambientales óptimos como se indica en material y métodos.

Conocer el título del virus fue muy importante, ya que basado en esto optimizamos el MOI (multiplicidad de infección) que se necesitó para una infección óptima. Esto nos permitió obtener mayores cantidades de proteína recombinante. Posteriormente se determinó una cinética de expresión para cada producto de DNA recombinante. Con la cinética se estandarizó el tiempo necesario para una máxima expresión. Cabe mencionar que cada parámetro es diferente según la línea celular que se ocupe. Mediante geles de SDS-PAGE e inmunodetección se determinó las condiciones y parámetros en que se daba la mayor producción de proteína (Figs. 20-24). Un resumen se encuentra en la tabla no. 12.

Clona	línea celular	MOI	tiempo
HLTX s/cola His	"high five"	8 MOI	72 horas
Ntermedia HLTX	"high five"	5 MOI	ND

Tabla 11. Parámetros con los que se obtiene mayor expresión de proteína, ND: no determinada

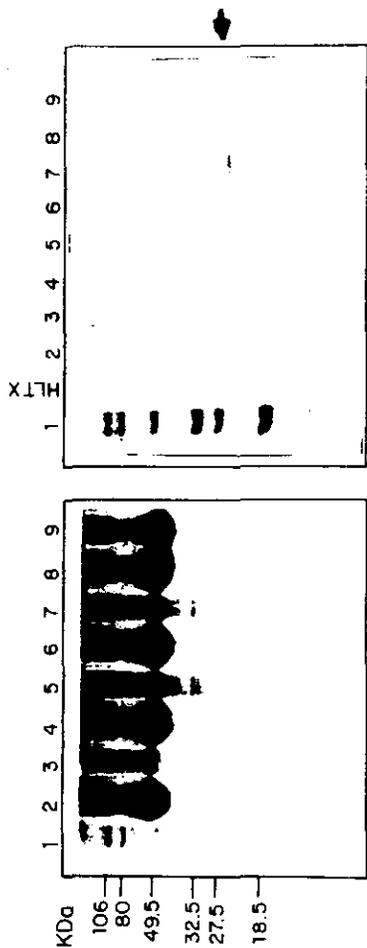


Fig 20. Expresión de HLTXr + cola His en células S19. Las células S19 infectadas con diferentes MOI's fueron crecidas en placa durante 72 horas. La figura de la izquierda representa un gel de SDS-PAGE y la de la derecha un Western Blot. El carril 1 es el marcadador de peso molecular. Carril 2, células S19 sin infectar. Carril 3, células infectadas con MOI=3 de virus. Carril 4, sobrenadante de la infección con MOI=3. Carril 5, células infectadas con MOI=5 de virus. Carril 6, sobrenadante de la infección con MOI=5. Carril 7, células infectadas con MOI=6. Carril 8, sobrenadante de la infección con MOI=6. Carril 9, sobrenadante de la infección con MOI=10. Como control positivo en el Western se utilizó 200 ng de HLTXp.

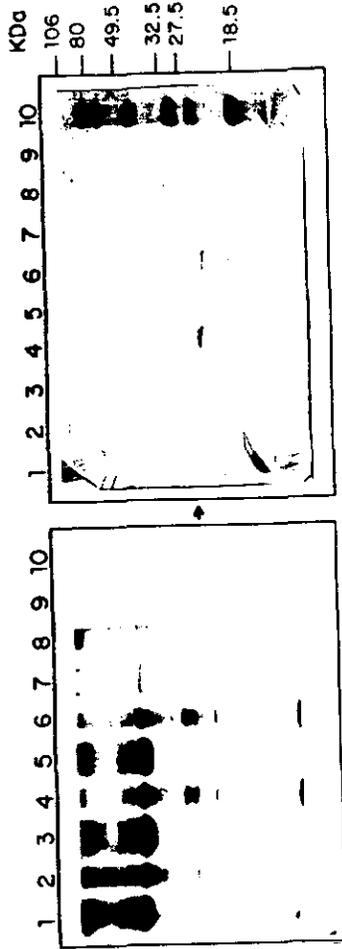


Fig. 21. Expresión de HL-TXr + cola His en células "high five". Las células "high five" infectadas con diferentes MOI's fueron crecidas en placa durante 72 horas. La figura de la izquierda representa un gel de SDS-PAGE y la de la derecha un Western Blot. El carril 1 muestra el sobrenadante de infección con un MOI de 10. Carril 2, células infectadas con MOI de 10. Carril 3, sobrenadante de la infección con MOI de 8. Carril 4, células infectadas con MOI de 8. Carril 5, sobrenadante de la infección con MOI de 5. Carril 6, células infectadas con MOI de 5. Carril 7, sobrenadante sin infectar. Carril 8, son las células sin infectar. En el carril 9 se muestran 100 ng de HL-TXp. En el carril 10 están los marcadores de peso molecular.

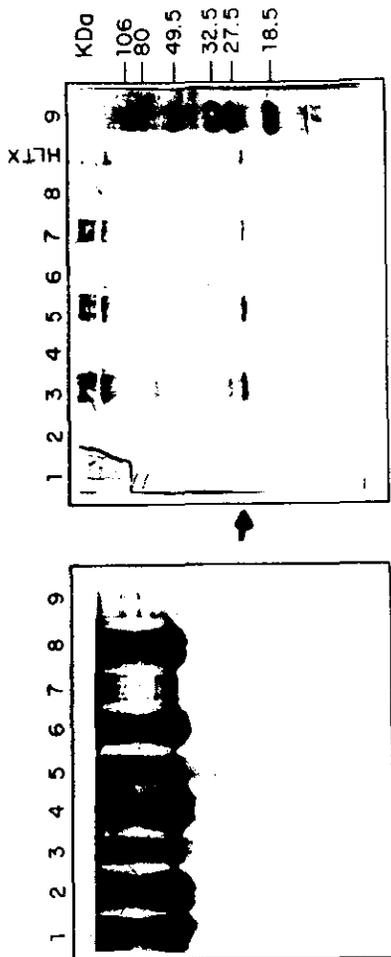


Fig.22. Expresión de HLTx sin cola His en células S19. Las células S19 infectadas con diferentes MOI's fueron crecidas en placa durante 72 horas. La figura de la izquierda representa un gel de SDS-PAGE y la de la derecha un Western Blot. El carril 1 muestra el sobrenadante de infección con MOI de 10. Carril 2, sobrenadante de infección con MOI de 8. Carril 3, células infectadas con MOI de 8. Carril 4, sobrenadante de la infección con MOI de 5. Carril 5, células infectadas con MOI de 5. Carril 6, sobrenadante de la infección con MOI de 3. Carril 7, células infectadas con MOI de 3. Carril 8, sobrenadante sin infectar. El carril 9 representa el marcador de peso molecular. El control positivo está marcado como HLTx y se usaron 100 ng de HLTx α .

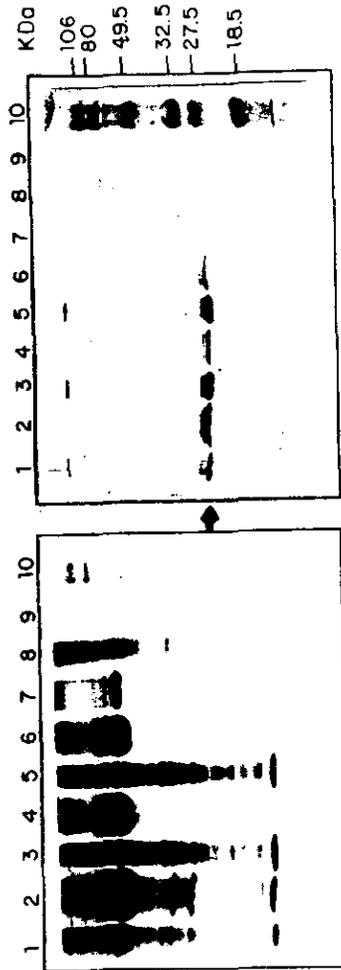


Fig 23. Expresión de HLTx^r sin cola His en células "high five". Las células "high five" infectadas con diferentes MOI's fueron crecidas en placa durante 72 horas. La figura de la izquierda representa un gel de SDS-PAGE y la de la derecha un Western Blot. En el carril 1 se muestran las células infectadas con MOI de 10. Carril 2, sobrenadante de infección con MOI de 10. Carril 3, células infectadas con MOI de 8. Carril 4, sobrenadante de la infección con MOI de 8. Carril 5, células infectadas con MOI de 5. Carril 6, sobrenadante de la infección con MOI de 5. Carril 7, sobrenadante de la infección con MOI de 10. Carril 8, células sin infectar. El carril 9 son 100 ng de HLTx^p y en el carril 10 se muestra el marcador de peso molecular.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

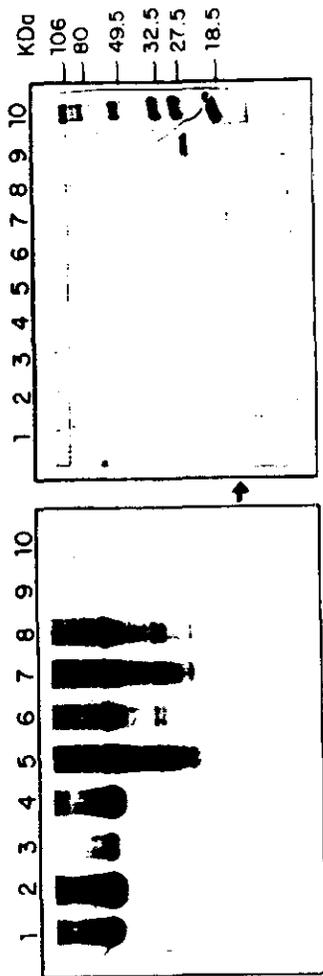


Fig 24. Expresión del dominio N-terminal de HLTX + cola His. Las células "high five" y S19 infectadas con diferentes MOI's fueron crecidas en placa durante 72 horas. La figura de la izquierda representa un gel de SDS-PAGE y la de la derecha un Western Blot. El carril 1 muestra el sobrenadante de células "high five" con MOI de 8. Carril 2 es el sobrenadante de células S19 infectadas con MOI de 8. Carril 3 muestra el sobrenadante de células "high five" infectadas con MOI de 5. Carril 4, sobrenadante de células S19 infectadas con MOI de 5. Del carril 5-8 es el mismo orden de los anteriores pero con el paquete celular. El carril 9 contiene 200 ng de HLTXp. El carril 10 muestra el peso molecular.

Utilizando la HLTX_p como referencia, estimamos la cantidad de proteína recombinante producida (fig. 24). La HLTX_r con la cola de Histidinas se expresó en mayor cantidad en las células "high five" (aprox. 20 µg/ml de cultivo) que en las células Sf9 (aprox. 10 µg/ml de cultivo). En ambas líneas celulares la mayor expresión fue utilizando una multiplicidad de infección de 8. Existen reportes de que las células "high five" expresan las proteínas recombinantes en mayor cantidad que las células Sf9 y Sf21 (Jarvis y cols. 1993, Laukkanen y cols. 1996). En las células SF9 se puede observar que la HLTX_r se encuentra sólo en el paquete celular (carriles 5 y 7, fig. 20). A diferencia de las células Sf9, las células "high five" si secretan la HLTX_r al medio pero en baja cantidad (carriles 3 y 5, fig. 21), la mayoría se sigue quedando intracelularmente (carriles 2, 4 y 6, fig. 21).

Un caso similar es la expresión de la HLTX_r sin cola de Histidinas, donde se expresa mayormente en las células "high five" (aprox. 60 µg/ml cultivo). Infectando las células "high five" con un MOI de 8, obtuvimos un 40% de proteína secretada y un 60% de proteína intracelular (fig. 23). Pero cuando se infectaron las células Sf9 con el mismo MOI, sólo se obtuvo HLTX intracelular (carriles 3, 5 y 7, fig. 22).

Nosotros encontramos dos formas de HLTX_r en el paquete celular de la expresión de HLTX sin cola de Histidinas: una procesada postraduccionalmente, es decir, sin péptido señal y otra con péptido señal. Esto se puede apreciar en los carriles 3, 5 y 7 de la figura 22, donde la mayor parte de la HLTX_r tiene el mismo peso molecular de la HLTX_p (25,500 Da) y aproximadamente un 10% cuenta con péptido señal (26,200 Da). Esto nos hablaría de que la mayor parte de la proteína que se sintetiza en el retículo endoplásmico, atraviesa la membrana del mismo donde pierde el péptido señal, posteriormente viaja por el aparato de Golgi, pero algo sucede en este proceso que la HLTX_r no llega a su destino final (secreción), probablemente porque la maquinaria de las células de insecto no reconocen eficazmente las señales de la HLTX. Un porcentaje menor se queda dentro del retículo endoplásmico, no llega a perder el péptido señal, ni tampoco recibe procesamiento postraducciona, es decir, un correcto foldeo, glicosilación sí es que tiene señales de glicosilación etc.).

Para estar seguros de que la proteína sufrió un procesamiento postraduccional, se deberá secuenciar el amino terminal una vez que la proteína esté purificada.

Una opción es hacer construcciones del cDNA de la helotermina con péptidos señal de otras proteínas. Se han reportado varios PS que secretan proteínas extrañas utilizando células de insecto, como por ejemplo el PS del receptor de glutamato de cerebro de rata (Kuusinen y cols. 1995). Otro ejemplo es el PS de la UDP-glucosiltransferasa del virus de la polihedrosis nuclear *Autografa Californica* (O'Reilly y Miller 1989). También se han usado PS bacterianos para secretar exitosamente proteínas eucariontes. Tal es el caso del PS de la proteína A de *Staphylococcus* (Allet y cols. 1997). Se sugiere que el uso de péptidos señales específicos de insectos pueden dar ventajas en la expresión y secreción de proteínas recombinantes (Tessier y cols 1991).

Otra explicación sería que la helotermina se estuviese acumulando intracelularmente debido a una asociación de proteínas o a un incorrecto plegamiento. Esto sugeriría que el procesamiento postraduccional de las células de insecto es incapaz de acomodar altos niveles de expresión de la helotermina. En los últimos años se ha visto que la propiedad de plegamiento y modificación postraduccional de los polipéptidos es ayudada por factores celulares adicionales, incluyendo enzimas plegadoras y chaperonas.

El procesamiento inadecuado del polipéptido y la agregación de proteínas son los dos problemas principales que se presentan en las células de insectos infectadas con baculovirus. La producción de las proteínas heterólogas es muy alta durante los estados tardíos de infección del baculovirus y la síntesis de chaperonas huésped y enzimas plegadoras puede ser reprimida durante la infección viral (Shuler y cols. 1995, Jarvis y cols. 1993). Whiteley y cols. (1997) reportaron la coexpresión de una proteína disulfuro isomerasa heteróloga que favorece la solubilidad de las inmunoglobulinas intracelulares y la secreción de IgG de células de insecto infectadas con baculovirus. Una alternativa sería coexpresar la helotermina con la

proteína disulfuro isomerasa con el fin de que se favoreciera el correcto plegamiento y secreción de la misma.

La HLTX con cola de Histidinas se podrá purificar mediante una cromatografía de afinidad a Niquel. La HLTX que no cuenta con cola de Histidinas se podrá purificar mediante una cromatografía de afinidad a anticuerpos específicos contra la helotermina, o bien, se podrá adaptar algunas de las 4 cromatografías utilizadas para purificar la HLTXp.

Expresión de HLTX en diferentes líneas celulares

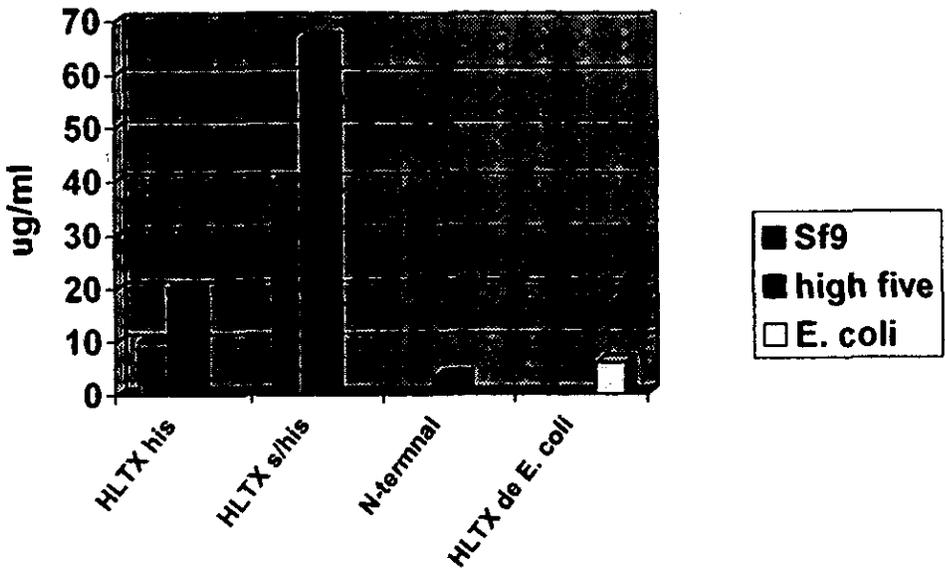


Fig 24. Diagrama de barras donde se cuantifica la expresión en $\mu\text{g/ml}$ de proteína recombinante obtenida en dos líneas celulares.

Podemos concluir que se obtuvieron muy buenos rendimientos (superiores a los reportados con otras proteínas) en la expresión de la HLTXr cuando se utiliza el sistema eucarionte (60 µg/ml) que cuando se utiliza el sistema procarionte (6 µg/ml). Además consideramos que la maquinaria de las células de insecto puede llegar a plegar correctamente la HLTX, a diferencia del sistema procarionte en el cual se tienen que adicionar pasos de plegamiento posteriores a la expresión en *E. coli*.

DOMINIOS

En la comparación con el banco de estructuras tridimensionales (Protein Data Bank), no se encontró ninguna estructura parecida a la estructura predicha de la helotermína. Los mismos resultados se obtuvieron al comparar la secuencia de aminoácidos de la HLTX en los bancos de dominios ProDom y Protein Domain Database. Utilizando el programa Profit desarrollado en el Center of Applied Molecular Engineering (Austria), que se encuentra en San Diego, California no se encontraron estructuras tridimensionales parecidas, ni de la secuencia completa ni de dominios o fragmentos de secuencia. También se mandó la secuencia de aminoácidos de la helotermína al Fold Recognition Server, el cual usa el método de predicción gonnet+predss. En este método la predicción no se pudo realizar porque los valores de los residuos alineados para dar un correcto plegamiento, están muy por debajo del umbral permitido para dar una estructura definida.

Actualmente se intenta resolver la estructura tridimensional de la HLTX mediante Resonancia Magnética Nuclear (NMR). Debido al tamaño de la molécula (25.5 kDa) no se han podido obtener buenas resoluciones de mínima energía entre hidrógenos que permitan dar una estructura (comunicación personal con la Dra. Delepierre del Instituto Pasteur, Francia). La obtención de dominios separados correctamente plegados facilitaría el conocimiento de la estructura tridimensional por NMR.

Inicialmente tratamos de separar la HLTX nativa en dos dominios estructurales posibles (postulados). Esto surgió, como lo menciono en antecedentes, del análisis comparativo de la CRISP-1 (vease fig. 7) con la HLTX. El racional por

detrás de estos experimentos residía en la posibilidad de disectar los dos dominios estructurales posibles de HLTX y con los resultados obtenidos de los fragmentos generados, poder editar y expresar el DNA de una porción de la molécula. La esperanza finalmente, era poder expresar un dominio funcional de la HLTX.

Para este experimento se usaron dos proteasas: quimotripsina y tripsina, ya que en teoría estas enzimas podrían dividir a la toxina en dos dominios (basados en la proteína CRISP 1, Ebespaecher y cols. 1995).

Los experimentos de digestión se hicieron a diferentes tiempos y a diferentes relaciones peso/peso. Los resultados indicaron que no hay una banda predominante que nos indique una estructura compacta o bien determinada, ya que a medida que se aumenta la concentración de proteasa, la helotermina se digiere hasta desaparecer, (datos no mostrados, realizados bajo la asesoría del Dr. Alejandro Alagón, asesor en mi comité tutorial)

De estas digestiones podemos concluir que los sitios de reconocimiento de las proteasas que usamos están muy expuestos, lo que provoca que no obtengamos dominios definidos. Estos resultados validan el enfoque de expresión de la toxina y sus dominios por técnicas de DNA recombinante.

Como se mencionó en la introducción las proteínas CRISP muestran un 30% de identidad con 2 grupos de proteínas que no provienen de mamíferos: PR de avispa y PR de plantas, estas proteínas carecen del C-terminal rico en cisteínas. Las proteínas de vespídos son antigénicas pero no se les conoce función. Las PR son producidas en muchas plantas en respuesta a infección por virus, bacterias y hongos.

Por las secuencias homólogas a proteínas relacionadas con la patogénesis y su expresión en células pre B, se especula que CRISP 3 es también una molécula asociada a defensa en mamíferos. CRISP puede codificar actividades enzimáticas líticas, por lo observado en AEG en la asociación a la cabeza de espermatozoides y la presencia de AA1 (autoantígeno 1) en los acrosomas, donde puede estar involucrado en estructuras degradativas del huevo durante la fertilización. CRISP-3 es expresada en glándulas salivales y en células B, por lo que tales actividades líticas pueden estar relacionadas a funciones antifúngicas o antibacterianas en saliva, sangre o linfa.

El dominio N-terminal de la proteína CRISP-3 fue recientemente expresado en células de insecto usando el sistema de baculovirus, pero aun no se tienen datos de su actividad (comunicación personal del Dr. Haendler, compañía Schering de Alemania).

En este trabajo se expresaron los primeros 172 aminoácidos de la HLTX, que conforman un dominio con 3 puentes disulfuro. Este dominio tiene una cola de Histidinas que facilitará su purificación, para posteriormente dilucidar si tiene una actividad bioquímica o electrofisiológica determinada. Del dominio N-terminal de HLTX se obtuvieron aproximadamente 3 $\mu\text{g/ml}$ de cultivo de células "high five", aunque cabe mencionar que falta optimizar el tiempo de expresión de esta última clona.

CONCLUSIONES

- ◆ Se demostró que es posible la expresión de HLTXr como proteína de fusión en células de *E.coli*.
- ◆ Se demostró que es posible la expresión de HLTXr (con su propio péptido señal) en dos líneas celulares de insecto, usando el sistema de baculovirus.
- ◆ Se observó una considerable mayor producción de HLTX en el sistema de expresión eucarionte.
- ◆ Se demostró que es posible la expresión del dominio N-terminal de HLTX en células de insecto, usando el sistema de baculovirus.

PERSPECTIVAS

- ◆ Purificar la HLTXr y el dominio N-terminal recombinante, mediante una cromatografía de afinidad a Niquel.
- ◆ Purificar la HLTXr sin cola de histidinas, mediante una cromatografía de afinidad con anticuerpos específicos contra HLTXp, o mediante el protocolo de purificación utilizado para la HLTXp.
- ◆ Secuenciar el amino terminal de la HLTXr y del dominio N-terminal, para comprobar el correcto procesamiento postraduccional.
- ◆ Verificar que la HLTXr este correctamente plegada.
- ◆ Probar la actividad biológica tanto de la HLTXr como del dominio N-terminal en ensayos *in vivo* (usando ratones) e *in vitro* (usando canales de Ca^{2+} sensibles a rianodina).

BIBLIOGRAFIA

- Alagón, A. C., Maldonado, M. E. A., Julia, J. Z., Sánchez, C. R., Possani, L. D. 1982. Venom from two sub-species of *Heloderma horridum* (Mexican beaded lizard): General Characterization and purification of N-Benzoyl-L-Arginine ethyl ester hidrolase. *Toxicon*. 20:2, 463-75.
- Alagón, A. C., Possani, L. D., Sumart, J., Schleuning, W. D. 1986. Helodermatine, a kalikrein-like hipotensive enzyme from the venom of *Heloderma horridum horridum* (Mexican beaded lizard). *J. Exp. Med.* 164:6, 1835-1845
- Allet, B., Bernard, A. R., Hochmann, A., Rohrbach, E., Graber, P., Magnenat, E., Mazzei, G. J., Bernasconi, L. 1997. A bacterial signal peptide directs efficient secretion of eukaryotic proteins in the baculovirus expression system. *Protein Expression and Purification*. 9, 61-68
- Borget, C. M. and Martin del Campo, R. 1956. The Gila monster and its allies. The relationships, habits and behavior of the lizard of the family Helodermatidae. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 109,1.
- Brooks, D. E. And Tiver, K. 1983. Localization of epididymal secretory proteins on rat spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 69, 651-657
- Brooks, D. E., Means, A. R., Wright, E. J., Singh, S. P. Tiver, K. K. 1986. Molecular cloning of the cDNA for androgen-dependent sperm-coating glycoproteins secreted by the rat epididymis. *Eur. J. Biochem.* 161, 13-18
- Calvin, H. I., Yu, C. C., Bedford, J. M. 1973. Effects of epididymal maturation, zinc (II) and copper (II) on the reactive sulphhydryl content of structural elements in rat spermatozoa. *Experimental Cell Research*. 81, 333-341
- Cameo, M. S., Blaquier, J. A. 1976. Androgen-controlled specific proteins in rat epididymis. *J. Endocr.* 69, 47-55
- Casas, R. 1974. The Venomous Lizards. *Venomous animals of the World*. Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs, N.J. 145-153
- Catterall, W. A. 1988. Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science*. 242, 50-61

- Chandy, K. G., DeCoursey, T. E., Cahalan, M. D., Gupta, S. 1985. Electroimmunology: The physiological role of ion channels in the immune system. *J. Immunol.* 135, 787-791.
- Chang, T., Mao, S., Guo, Y. 1997. Cloning and expression of a cysteine-rich venom protein from *Trimeresurus mucrosquamatus* (Taiwan habu). *Toxicon.* 35:6, 879-888
- Charest, N. J., Joseph, D. R., Wilson, E. M. French, F. S. 1988. Molecular Cloning of complementary deoxyribonucleic acid for an androgen-regulated epididymal protein: sequence homology with metaloproteins. *Mol. Endocrinology.* 2, 999-1004
- Chico, E., Kobold, A., Hasse, B., And Jäger, V. Characterization of growth and recombinant protein production of the insect cell line BTI-Tn-5B1-4 (High Five) in suspension culture. 1997. *Animal Cell technology.* 755-760
- Cornelissen, B. J., Horowitz, J., Van Kan, J. A. L., Goldberg, R. B., Bol, J. F. 1987. Structure of tobacco genes encoding pathogenesis-related proteins from the PR-1 group. *Nucleic Acids Research.* 15:17, 6799-6811
- Coronado, R., Morrisette, J., Sukhareva, M., Vaughan, D. M. 1994. Structure and function of ryanodine receptors. *American Physiological Society.* C1485-C1502
- Cuasnicú, P. S., González, F., Piazza, A. D., Cameo, M. S. Blaquier, J. A. 1894. Antibodies against epididymal glycoproteins block fertilizing ability in rat. *J. Reprod. Fert.* 72, 467-471
- Dehaye, J. P., Winand, J., Michel, P., Robberecht, P., Walbroek, M., Vandermeers, A., Vandermeers, P., Christophe, J. 1984*. Pancreatic Secretory Factor (PSF), protein from Gila Monster venom stimulating enzyme secretion from rat pancreatic acini. *FEBS letters.* 166:2, 283-287
- Dehaye, J. P., Winand, J., Damien, C., Poloczeck, P., Scroboda, M., Christophe, J. 1984b. Stimulatory effects of Gila monster venom on rat pancreatic acini. *Peptides (Fayentteville, N. Y.)* 5:2, 333-337
- Dixon, D. C., Cutt, J. R., Klesing, D. F. 1991. Differential targeting of the tobacco PR-1 pathogenesis-related proteins to the extracellular space and vacuoles of crystal idioblasts. *The EMBO Journal.* 10:6, 1317-1324
- Duran-Renals F. 1933. Studies on a certain spreading factor existing in bacteria and its significance for bacterial invasiveness. *J. Exp. Med.* 58, 161-181

- Eberspaecher, U., Roosterman, D., Krätzschar, J., Haendler, B., Habenicht, U. F., Becker, A., Quensel, C., Petri, T., Schleuning, W. D., Donner, P. 1995. Mouse androgen-dependent epididymal glycoprotein CRISP-1 (DE/AEG): isolation, biochemical characterization, and expression in recombinant form. *Mol. Reprod. Dev.* 42, 157-172.
- El-Hayek, R., Lokuta, A. J., Arévalo, C., Valdivia, H. H. Peptide probe of ryanodine receptor function. *The Journal of Biological Chemistry.* 270:48, 28696-28704
- Eng, J., Andrews, P. C., Kleinman, W. A., Singh, L., Raufman, J. P. 1990. Purification and structure of Exendin-3, a new pancreatic secretagogue isolated from *Heloderma horridum* venom. *The Journal of Biological Chemistry.* 265:33, 20259-20262
- Eng, J., Kleinman, W. A., Singh, L., Singh, G., Raufman, J. P. 1992. Isolation and characterization of Exendin-4, an Exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. *The Journal of Biological Chemistry.* 267:11, 7402-7405
- Fornes, M. W., Burgos, M. H. 1994. Epididymal glycoprotein involved in rat sperm association. *Mol. Reprod. Dev.* 38, 43-47
- Foster, J. A., Gerton, G. L. 1996. Autoantigen 1 of the guinea pig sperm acrosome is the homologue of mouse Tpx-1 and human TPX1 and is a member of the Cystein-rich secretory protein (CRISP) family. *Mol. Reprod. Dev.* 44, 221-229
- Gillet, L., Roberecht, P., Waelbroeck, M., Camus, J. C., Deneef, P., Koenig, W., Christophe, J. 1984. Interaction of Gila monster venom with secretin receptors in rat pancreatic membranes. *Peptides (Fayetteville, N. Y.)* 5:2, 407-9
- Gómez, F., Vandermeers, A., Vandermeers-Piret, M. C., Herzog, R., Rathe, J., Stievenart, M., Winand, J., Christophe, J. 1989. Purification and characterization of five variants of phospholipase A₂ and complete primary structure of the main phospholipase A₂ variant in *Heloderma suspectum* (Gila monster) venom. *Eur. J. Biochem.* 186, 23-33
- Hardy, D. M., Huang, T. T. F., Drioscoll, W. J., Tung, K. S. K., Wild, G. C. 1988. Purification and characterization of the primary acrosomal autoantigen of guinea pig epididymal spermatozoa. *Biology of Reproduction.* 38, 423-437
- Haendler, B., Krätzschar, J., Theuring, F., Schleuning, W. D. 1993. Transcripts for cystein-rich secretory protein-1 (CRISP-1, DE/AEG) and the novel related CRISP-3 are expressed under androgen control in the mouse salivary gland. *Endocrinology.* 133:1,

192-198

- Hedon, R. A., Tu, A. T., 1981. Biochemical characterization of the lizard toxin gilatoxin. *Biochemistry*. 20:12, 3517-3522
- Hille, B. 1992. Ionic channels of excitable membranes. Ed. Sinauer, Sunderland. M. A. 77, 153-161
- Hoshino, M., Yandihavd, CH., Hong, Y.M., Kishida, S., Katsumdrv, Y., Vandermeers, A., Yandihard, N. 1984. Primary structure of helodermin, a VIP secretin-like peptide isolated from Gila monster venom. *FEBS letts*. 178:2, 233-9
- Huang, T. F., Chiang, H. S., 1994 . Effect on human platelet aggregation of phospholipase A₂ purified from *Heloderma horridum horridum* (beaded lizard) venom. *Biochem. Biophys. Acta*. 1211:1, 61-68
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *Gene*. 96, 23
- Jarvis, D. L., Summers, M. D., Garcia Jr, A., Bohlmeier, D. A. 1993. Influence of different signal peptides and prosequences on expression and secretion of human tissue plasminogen activator in the baculovirus system. *The Journal of Biological Chemistry*. 260:22, 16754-16762
- Johnson, B. D., Tullar, J. C., Stahnke, H. L. 1966. A quantitative protozoan bio-assay method for determining potencies. *Toxicon*. 3, 297
- Kasahara, M., Gutknecht, J., Brew, K., Spurr, N., Goodfellow, P. N. 1989. Cloning and mapping of a testis-specific with sequence similarity to a sperm-coating glycoprotein gene. *Genomics*. 5, 527-534
- Kauffmann, S., Legrand, M., Geoffroy, P., Fritig, B. 1987. Biological function of pathogenesis-related proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3-β-glucanasa activity. *The EMBO Journal*. 6:11, 3209-3212
- Kauffmann, S., Legrand, L., Fritig, B. 1990. Isolation and characterization of six pathogenesis-related (PR) proteins of Samsun NN tobacco. *Plant. Mol. Bio*. 14, 381-390
- Krätzschmar, J., Heandler, B., Eberspaecher, U., Roosterman, D., Donner, P., and Schleuning, W. The human cysteine-rich secretory protein (CRISP) family primary structure and tissue distribution of CRISP-1, CRISP-2 and CRISP-3. 1996. *Eur.J.*

Biochem. 236: 827-836

- King, L.A. and Posee, R.D. The baculovirus expression system. A laboratory Guide. Chapman & Hall
- Kombrink, E., Schröder, M., Hahlbrock, K. 1988. Several pathogenesis-related proteins in potato are 1,3-β glucanases and chitinases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85, 782-786
- Komori, Y., Nikai, T., Sugihara, H. 1988. Purification and characterization of a lethal toxin from the venom of *Heloderma horridum horridum*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 154:2, 613-619
- Kuusinen, A., Arvola, M., Oker-Blom, C., Keinänen, K. 1995. Purification of recombinant GluR-D glutamate receptor produced in Sf21 insect cells. Eur. J. Biochem. 233, 720-726
- Laukkanen, M-L., Oker-Blom, C., Keinänen, K. 1996. Secretion of green fluorescent protein from recombinant baculovirus-infected insect cells. Biochemical and Biophysical Research communications. 226, 755-761
- Lea, O. A., Petrusz, P., French, F. S. 1978. Purification and localization of acidic epididymal glycoprotein (AEG): A sperm coating protein secreted by the rat epididymi. Int. J. Androl. Suppl. 2, 592-607
- Legrand, M., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Fritig, B. 1987. Biological function of pathogenesis-related proteins: four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84, 6750-6754
- Lu, G., Villalba, M., Coscia, M. R., Hoffman, D. R., King, T. P. 1993. Sequence analysis and antigenic cross-reactivity of a venom allergen, antigen 5, from hornets, wasp and yellow jackets. J. Immunol. 150, 2823-2830
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor N. Y. USA.
- McPherson, P. S., Campbell, K. P. 1993. The ryanodine receptor-Ca²⁺ release channel. J. Biol. Chem. 268:19, 13765-13768
- Malhotra, R., Singh, L., Eng, J., Raufman, J. P. 1992. Exendin-4, a new peptide from *Heloderma suspectum* venom, potentiates cholecystokinin-induced amylase release from rat pancreatic acini. Regulatory Peptides. 41:21, 149-156

- Mebs, D. and Raudonat H. W. 1966. Biochemical investigations on *Heloderma venom*. Mem. Inst. Butantan. 33:3, 907-911
- Mebs, D. 1968. Some studies on the biochemistry of the venom gland of *Heloderma horridum*. Toxicon. 5, 225-226
- Mebs, D. 1970. Biochemistry of kinin-releasing enzymes in the venom of the viper *Bitis gabonica* and of the lizard *Heloderma suspectum*. Cardiovascular, Biochemical and Neural Actions. New York. 234-237
- Miller, L. K. Baculovirus as gene expression vectors. 1988. Ann. Rev. Microbiol. 42, 177
- Mizuki, N., Kasahara, M. 1992. Mouse submandibular glands express an androgen-regulated transcript encoding an acidic epididymal glycoprotein-like molecule. Mol. Cel. Endocr. 89, 25-32
- Mochca-Morales, J., Martín, B. M., Possani, L. 1990. Isolation and characterization of helothermine, a novel toxin from *Heloderma horridum horridum* (Mexican beaded lizard) venom. Toxicon. 28:3, 299-309.
- Mochca-Morales, J. 1991. Caracterización química y funcional de la toxina Helotermina del veneno de *Heloderma horridum horridum*. Tesis para obtener el título de Dr. en Ciencias Biomédicas. UNAM.
- Morrissette, J., El-Hayek, R., Possani, L. D., Coronado, R. 1994. Isolation and characterization of ryanodine receptor toxins from *Heloderma horridum horridum* (Mexican beaded lizard) venom. Biophys. J. 66:2, a415, Th-Pos330.
- Nikai, T., Imai, K., Sugihara, H., Tu, A. T. 1988. Isolation and characterization of Horridum toxin with arginine ester hydrolase activity from *Heloderma horridum* (Beaded Lizard) venom. Arch. Biochem. Biophys. 264:1, 270-280
- Nikai, T., Imai, K., Komori, Y., Sugihara, H. 1992. Isolation and characterization of arginine ester hydrolase from *Heloderma horridum* (beaded lizard) venom. Int. Biochem. 24:3, 415-420
- Nobile, M., Magnelli, V., Lagostena, L., Mochca-Morales, J., Possani, L. D., Prestipino, G. 1994^a. The toxin helothermine affects potassium currents in newborn rat cerebellar granule cells. J. Membr. Biol. 139:1, 49-55
- Nobile, M., Possani, L. D., Spadavecchia, L., Prestipino, G. 1994b. Inhibition of Ca²⁺-

- current by the lizard venom toxin Helothermine. *Biophys. J.* 66:2, A422, Th-Pos371
- O'Reilly, D. R. and Miller, L. K. 1989. A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-Glucosyl transferase. *Science.* 245, 1110-1112
 - Pardo, L. L. 1995. Secuenciación del cDNA que codifica para la toxina helotermina del Venn de *Heloderma horridum horridum*. Tesis para obtener el título de Lic. en Biología. UNAM.
 - Park, C. S., Sharon, F. H. And Miller, C. 1991. Desing, synthesis, and functional expression of a gen for charybdotoxin, a peptide blocker of K⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:2046-2050
 - Parker, D. S., Raufman, J. P., O'Donohue, T. L., Bleedsoe, M., Yoshida, H., Pissano, J. J. 1984. Amino acid sequences of helospectinas, new members of the glucagon superfamily, found in Gila monster venom. *J. Biol. Chem.* 259:19, 11751-11755
 - Patterson, R. A. 1967a. Smooth muscle stimulating action of venom from the gila monster, *Heloderma suspectum*. *Toxicon.* 5, 11-15
 - Patterson, R. A. 1967b. Some physiological effects caused by venom from the gila monster, *Heloderma suspectum*. *Toxicon.* 5, 5-10
 - Petri, T., Neukamm, B., Isernhagen, M., Ockert, B., Noeske-Jungblut, C. Expression of triabin, a novel highly potent inhibitor of thrombin, in Sf9 and High Five insect cells using a recombinant baculovirus. 1977. *Animal Cell Technology.* 525-528.
 - Pfisterer, P., König, H., Hess, J., Lipowsky, G., Heandler, B., Schleuning, W. and Wirth, T. CRISP-3, a protein with homology to plant defense proteins, is expressed in mouse B cells under the control of Oct2. 1996. *Mol. Cell. Biol.* 16:11, 6160-6168
 - Radermacher, M., Rao, V., Grassuci, R., Franh, J., Timerman, A. P. 1994. Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstruction of the calcium release channel/ryanodine receptor from skeletal muscle. *J. Cell. Biol.* 127, 411-423.
 - Raufman, J. P., Jensen, R. T., Sutliff, V. E., Pisano, J. J. 1982. Actions of gila monster venom on dispersed acini from guinea pig pancreas. *Am. J. Physiol.* 242: G470-G474
 - Raufman, J. P., Singh, L., Eng, J. 1991. Exendin-3, a novel peptide from *Heloderma horridum horridum* venom, interacts with vasoactive intestinal peptide receptors and a newly described receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *The Journal of Biological Chemistry.* 266:5, 2897-2902

- Robberecht, P., Waelbroeck, M., De Neef, P., Camus, J., Vandermeers, A., Vandermeers-Piret, M. C., Christophe, J. 1984. Specific labelling by 125I helodermin of high-affinity VIP receptors in rat liver membranes, FEBS Letts. 172:1, 55-58
- Robberecht, P., Waelbroeck, M., Dehaye, J. P., Winand, J., Vandermeers, A., Vandermeers-Piret, M. C., Christophe, J. 1984b. Evidence that helodermin a newly extracted peptide from Gila monster venom is a member of the secretin/VIP/PHI family of peptides with an original pattern of biological properties. FEBS letts. 166:2, 277-282
- Rochwerger, L., Cohen, D. J., Cuasnicú, P. S. 1992. Mammalian sperm-egg fusion: the rat egg has complementary sites for a sperm protein that mediates gamete fusion. Dev Biol. 153, 83-90
- Russell, F. E., Borgert, C. M. 1981. Gila monster: its biology, venom and bite a review. Toxicon. 19:3, 341-59.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 5463-5467
- Schwidetzky, U., Haendler, B., Scluning, W. D. 1995. Isolation and characterization of the androgen-dependent mouse cysteine-rich secretory protein-3 (CRISP 3) gene. Biochem. J. 309, 831-836
- Schwidetzky, U., Schleuning, W. D., Haendler, B. 1997. Isolation and characterization of the androgen-dependent mouse cysteine-rich secretory protein-1 (CRISP-1) gene. Biochem. J. 321, 325-332
- Shuler, M. L., Hammer, D. A., Granados, R. R., Wood, H. A. 1995. In baculovirus expression systems and biopesticides. Shuler, Wood, Granados, Hammer ed. John Wiley & Sons, Inc. New York. 1-12
- Sisk, W.P., Bradley, J.D., Leipold, R.J., Stoltzfus, A.M., Ponce de Leon, M., Hilf, M., Peng, C., Cohen, G.H. and Eisenberg, R.J. High-level expression and purification of secreted forms of herpes simplex virus type 1 glycoprotein gD synthesized by baculovirus-infected insect cells. 1994. J. Virol. 68:2, 766-775
- Sosa, B. P., Alagón, A. C., Martín, B. M., Possani, L. D. 1986. Biochemical characterization of the phospholipase A₂ purified from the venom of the bearded lizard (*Heloderma horridum horridum*). Biochemistry. 25:10, 2927-33.
- Styblova, Z., Kornalik, F. 1967. Enzymatic properties of *Heloderma suspectum* venom.

- Toxicon. 5, 139-40
- Takeshima, H. S., Nishimura, S., Matsumoto, T., Ishida, H., Kangawa, K., Minamino, N., Matsuo, H., Ueda, M., Hanaoka, M., Hirose, T., Numa, S. 1989. Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature Lond.* 339: 439-445
 - Tessier, D. C., Thomas, D. Y., Khouri, H. E., Laliberté, F., Vernet, T. 1991. Enhanced secretion from insect cells of a foreign protein fused to the honeybee melittin signal peptide. *Gene.* 98, 177-183
 - Tipton, K. F., Dajas, F. 1994. Neurotoxins in neurobiology. Their actions and applications. Ed. Ellis Horwood. 196p.
 - Tu, A. T. And Murdock, D. S. 1967. Protein nature and some enzymatic properties of the lizard *Heloderma suspectum*, gila monster venom. *Comp. Biochem. Physiol.* 22, 389-96
 - Tu, A. T. And Hedon, R. R. 1983. Characterization of lizard venom hyaluronidase and evidence for its action as a spreading factor. *Comp. Biochem. Physiol.* 7:, 377-387
 - Utaisincharoen, P., Mackessy, S. P., Miller, R. A., Tu, A. T. 1993. Complete Primary structure and biochemical properties of gilatoxin, a serine protease with kallikrein-like and angiotensin-degrading activities. *The Journal of Biological Chemistry.* 268:29, 21975-21983
 - Valdivia, H. H., Kirby, M. S. Lederer, W. J., Coronado, R. 1992. Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -release channel of skeletal and cardiac muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 12185-12189
 - Vandermeers, A., Vandermeers-Piret, M. C., Mavie, C., Robberecht, P., Waelbroeck, M., Dehaye, J. P., Winand, J., Christophe, J. 1984. Purification of a novel pancreatic secretory factor (PSF) and a novel peptide with VIP-and secretin-like properties (helodermin) from Gila monster venom. *FEBS Letts.* 166:2, 273-276
 - Vandermeers, A., Vandermeers-Piret, M. C., Vigneron, L., Rathe, J., Stierenart, M., Christophe, J. 1991. Differences in primary structure among five phospholipases A_2 from *Heloderma suspectum*. *Eur. J. Biochem.* 196:3, 537-544
 - Vandermeers, A., Gourlet, P., Vandermeers-Piret, M. C., Cauvin, A., De Neef, P., Rathe, J., Svoboda, M., Robberecht, P., Christophe, J. 1987. Chemical, Immunological

- and biological properties of peptides like vasoactive-intestinal-peptide and peptide-histidine-isoleucinamide extracted from the venom of two lizards. *Eur. J. Biochem.* 164, 321-327
- Van Loon, L. C., Van Kammen, A. 1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Sansun" and "Sansun NN" changes in protein constitution after infection with TMV. *Virology* 40, 199-201
 - Van Loon, L. C. 1985. Pathogenesis-related proteins. *Plant. Mol. Biol.* 4, 111-116
 - Whiteley, E. M., Hsu, T-A., Betenbaugh, M. J. 1997. Thioredoxin domain non-equivalence and anti-chaperone activity of protein isomerase mutants *in vivo*. *The Journal of Biological Chemistry.* 272: 36, 22556-22563
 - Walter, M. H., Liu, J. W., Grand, C., Lamb, C. J., Hess, D. 1990. Bean pathogenesis-related (PR) proteins deduced from elicitor-induced transcripts are members of a ubiquitous new class of conserved PR proteins including pollen allergens. *Mol. Gen. Genet.* 222, 353-360
 - Yatkola, D. A. 1976. Fossil Heloderma (Reptilia, Helodermatidae). *Occ. Papers Mus. Nat. Hist. U. Kansas.* 51, 1.
 - Zamudio, F. Z., Code, R., Arévalo, C., Becerril, B., Martin, B. M., Valdivia, H. H., Possani, L. D. 1997b. The mechanism of Inhibition of Ryanodine receptor channels by Imperatoxin I, a heterodimeric protein from the scorpion *Pandinus imperator*. *The Journal of Biological Chemistry.* 272:18, 11886-11894
 - Zamudio, F. Z., Gurrola, G. B., Arévalo, C., Sreekumar, R., Walker, J. W., Valdivia, H. H., Possani, L. D. 1997b. Primary structure and synthesis of Imperatoxin A (IpTx_A), a peptide activador of Ca²⁺ release channels/ryanodine receptors. *FEBS.* 405, 385-389

AMORTIGUADORES y MEDIOS

TBE 10X

108 grs. Tris Base
55 grs. Acido Bórico
40 ml EDTA 0.5 M
Ajustar a pH 8 y aforar a 1 litro

TB

10 mM Pipes
55 mM $MnCl_2$
15 mM $CaCl_2$
250mM KCl
Mezclar las sales excepto $MnCl_2$ y ajustar el pH 6.7 con KOH. Agregar el $MnCl_2$ y esterilizar por filtrado. Guardar 4°C.

TE

10 mM Tris Base pH 8
1 mM EDTA
Ajustar el pH a 8 con HCl y esterizar

SET

20 % Sacarosa
50 mM Tris pH 7.6
50 mM EDTA
Diluir la sacarosa en 80 ml H_2O y agregar el resto y aforara a 100 ml.

PBS

8 grs. NaCl
0.2 gr. KCl
1.44 grs. Na_2HPO_4
0.24 gr. KH_2PO_4
Disolverlos en 800 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7.4 con HCl. Aforar a 1 litro. y esterilizar por autoclave.

Amortiguador de transferencia

0.192 M Glicina

0.025 M
Tris HCl
20 % Metanol
Ajustar el amortiguador a pH 8.4

Amortiguador de lisozima
10 mM Tris HCl
50 mM NaCl
2 mM Na-EDTA pH 8
Aforar a 300 ml con H₂O

Amortiguador A purificación por Intercambio Iónico
50 mM Tris-Cl pH 7
50 mM NaCl
Antes de usar adicionar 5 mM de 2-ME

Amortiguador B purificación por intercambio Iónico
50 mM Tris-Cl pH 7
500 mM NaCl
Adicionar antes de usar 5 mM de 2-ME

Amortiguador de corte con Xa
20 mM Tris HCl pH 7.2
2 mM CaCl₂
1 mM acida de sodio

Amortiguador de disrupción
62.5 mM Tris-HCl pH 6.8
2% SDS

Amortiguador de Lavado purificación por afinidad a Niquel
20 mM Tris-HCl pH 8.5
500 mM KCl
20 mM Imidazol
5 mM 2-mercaptoetanol
10% Glicerol
Conservar a 4°C

Amortiguador de lisis para purificación por afinidad a Niquel

50 mM Tris-HCl pH 8.5
5 mM 2-mercaptoetanol
100 mM KCl
1 mM PMSF
1% Nonidet P-40
Conservar a 4°C

Amortiguador de lavado 2

20 mM Tris-HCl pH 8.5
1 M KCl
5 mM 2-mercaptoetanol
10 % Glicerol
Conservar a 4°C.

Amortiguador de Elución

20 mM Tris-HCl pH 8.5
100 mM KCl
100 mM Imidazol
5 mM 2-mercaptoetanol
10 % Glicerol
Conservar a 4°C

MEDIOS

Medio Luria Broth (LB)

Triptona 10 grs.
Extracto de levadura 5 grs.
NaCl 10 grs.
Aforar a 1 litro y esterilizar con autoclave

Medio SOB

Bacto triptona 20 grs.
Extracto de levadura 5 grs.
NaCl 10 mM
KCl 10 ml de una solución 250 mM
Ajustar