



EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE CONOTOXINAS CON ACTIVIDAD FOSFOLIPASA DE TIPO A₂

Edna Sánchez, Karla Juárez, Eduardo Morales y Alexei Licea

Km 107 Carr. Tijuana-Ensenada, Ensenada, B.C. Fax (646) 1750500, alicea@cicese.mx

Palabras clave: Conotoxinas, fosfolipasa tipo A₂, actividad

Introducción. El estudio de las conotoxinas de diferentes especies del género *Conus*, ha sido abordado por varios autores en los últimos años. Dichos trabajos incluyen aspectos bioquímicos, electrofisiológicos y citotóxico entre otros. En el caso particular de *C. californicus*, se logró purificar mediante HPLC fracciones de su veneno que presentaron actividad fosfolipasa de tipo A₂, la cual difiere a la previamente descrita (1) para este mismo género ya que presenta una sola subunidad y no dos.

El objetivo de este trabajo es evaluar la actividad de fosfolipasa de tres conotoxinas mediante la técnica de ADN recombinante empleando *P. pastoris* como sistema de expresión.

Metodología. A partir de una biblioteca de ADNc del aparato venenoso de *C. californicus*, se eligieron tres clonas con las secuencias de interés. La clonación y expresión de los genes que codifican para los conopéptidos se realizó de acuerdo a lo descrito en el manual EasySelect Pichia Expression Manual (Invitrogen) empleando el vector de expresión pPICZαA, el cual incluye una señal de secreción y la cepa de *P. pastoris* KM71H. Los cebadores para clonar los genes fueron diseñados para eliminar las repeticiones Glu-Ala e incluyen la región pre y pro del péptido. Las proteínas expresadas fueron analizadas en geles de poliacrilamida (PAGE) y Western Blot. La purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad.

Resultados y discusión. Se obtuvieron entre 2 y 5 clonas de *P. pastoris* para cada conotoxina clonada. El análisis de secuenciación de las clonas corroboró la inserción correcta del gen. El análisis de expresión evaluado mediante geles de acrilamida indicó que las condiciones óptimas de inducción fueron al segundo día con 1 % de metanol. El análisis de western blot corroboró la presencia de las conotoxinas recombinantes con un tamaño aproximado de 30 kDa. A partir de la proteína purificada se realizaron ensayo de actividad, para lo cual es necesario realizar una proteólisis previa del péptido, ya que aparentemente la proteína expresada aun posee las regiones pre y pro del péptido.

Conclusiones. El hecho de expresar una proteína heterológicamente en un sistema eucariota, no garantiza que se realicen todas las modificaciones postraduccionales y los procesos de maduración, tal como se pudo observar en nuestra proteína recombinante. Consideramos que se deben de evaluar otros sistemas de expresión eucariota para la expresión correcta de toxinas del género *Conus*.

Agradecimiento. Este proyecto se realizó gracias al apoyo de CICESE.

Bibliografía.

1. MacIntosh J, Ghomashchi F, Gelb M, Dooley D, Stoehr S, Giordani A, Naisbitt S y Olivera B. (1995). Conodipine-M, a novel phospholipase A₂ isolated from the venom of a marine snail *Conus magus*. *J. Biol Chem* 270(8):3518-3526.