



EXPRESIÓN DE LA C_{ss} II DEL ALACRÁN *Centruroides suffusus suffusus* EN *Escherichia coli*.

Georgina Estrada, Blanca.I García, Ernesto Ortiz, Lourival D.Possanni, Gerardo Corzo.
Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001
Col. Chamilpa. 62210. Cuernavaca, Morelos. México. Tel.01 (777) 3291669 Fax

Introducción. La neurotoxina C_{ss}II, de cuatro puentes disulfuro, afecta canales de sodio dependientes de voltaje. Esta es la más tóxica en el veneno del alacrán de Durango *Centruroides suffusus suffusus*, cuyo piquete se considera un serio problema de salud pública.

Actualmente, solo se ha logrado la expresión en bacterias de una toxina de este tipo para estudios de relación estructura-función (2). La producción eficiente en sistemas heterólogos de estos péptidos permitiría elucidar las interacciones específicas entre estas toxinas y sus receptores, así como su aplicación como antígenos para la producción y mejoramiento de antivenenos por la industria farmacéutica.

Metodología. El gen que codifica para la toxina C_{ss}II fue modificado sintéticamente para adicionar, en el extremo 5', la región codificante para los aminoácidos que reconoce la proteasa Factor Xa (FXa) y para cambiar algunos nucleótidos adecuándolo al uso preferencial de codones de *E. coli*. El gen modificado se clonó en el vector de expresión pQE 30 el cual permite obtener la toxina fusionada a 6His (hrC_{ss}II) cuando es inducido por IPTG. Se transformó la cepa de *E. coli* BL21(DE3) en la cual se expresó la toxina C_{ss}II en citoplasma, el medio de cultivo utilizado fue LB/Amp. Los cultivos se realizaron a 30°C/250 rpm induciendo a DO 0.4-0.8 por 6 h. Las células se lisaron en la prensa de French, recuperando los cuerpos de inclusión por centrifugación. La proteína se purificó por afinidad con NiNTA-agarosa en condiciones desnaturizantes. Para verificar la identidad del péptido se determinó su peso molecular por espectrometría de masas. Después del plegamiento *in vitro* y el cote proteolítico se verificó el correcto plegamiento de la toxina de tres formas distintas: a) coelución con la toxina nativa por HPLC fase reversa, b) Dicroísmo Circular y c) ensayos de toxicidad *in vivo* en ratones machos cepa CD1 tanto por vía intracraneal como intraperitoneal.

Resultados y Discusión. La proteína de fusión hrC_{ss}II se obtiene en cuerpos de inclusión, por lo que se recupera en buffer Tris 20mM, Cloruro de Guanidina 6 M, pH 8 y se purifica por afinidad con Ni NTA-Agarosa en condiciones desnaturizantes. Dicha proteína es repurificada por HPLC de fase reversa

(rpHPLC) donde se recuperan varias formas tóxicas del mismo péptido (con diferentes arreglos de disulfuros) comprobando esto porque al reducirlos en buffer Tris 50 mM, pH 8, 50 mM de DTT se recupera solo un péptido si disulfuros del peso molecular correcto. Con el plegamiento *in vitro* de la hrC_{ss}II reducida se obtiene una fracción homogénea en rpHPLC con la masa esperada de 9,392.2 Da para el péptido con cuatro puentes disulfuro. La hrC_{ss}II plegada se cortó con la proteasa FXa y se repurificó por rpHPLC para separar el péptido de 66 aminoácidos que corresponde a la toxina nativa (rC_{ss}II) con una masa de 7,538.6 Da. Los ensayos de Dicroísmo Circular sugieren la misma estructura secundaria de la rC_{ss}II y la C_{ss}II nativa. Aunque la toxina recombinante difiere de la nativa en la amidación del carboxilo terminal ya que las bacterias no son capaces de llevar a cabo modificaciones postraduccionales como esta, la dosis letal en ratones en inyección intracraneal es idéntica. Se obtuvo un rendimiento final de hasta 2.5 mg del péptido por litro de cultivo.

Conclusiones. La neurotoxina rC_{ss}II, de cuatro puentes disulfuro, que afecta a canales de sodio dependientes de voltaje, fue expresada en un sistema bacteriano. Por la identidad estructural y funcional de esta toxina recombinante con la nativa y el rendimiento obtenido se propone como un buen sistema para expresar variantes puntuales que permitan realizar estudios de la relación estructura-función. En cuanto a ciencia aplicada, la rC_{ss}II podría sustituir al veneno y/o péptido nativo para la producción o mejoramiento de antivenenos.

Agradecimientos. Al M. C. Timoteo Olamendi-Portugal por las secuencias de DNA. A las unidades de síntesis y proteómica del IBt. Este trabajo fue realizado con apoyo económico de Laboratorios Silanes S.A. de C.V., Instituto Bioclón S.A. de C.V., y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) IN226006.

Referencias.

Cohen L., Karbat I., Gilles N., Ilan N., Benaviste M.; Gordon D., Gurevitz M. Common features in the functional surface of scorpion beta-toxins and elements that confer specificity for insect and mammalian voltage-gated sodium channels. *J Biol Chem.* 2005 Feb 11;280(6):5045-53. Epub 2004