

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO



Determinación de las condiciones óptimas para la expresión bacteriana de la hormona hiperglucémica de crustáceos CHH-A del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

TESIS

Para obtener el título de

BIOINGENIERO

Presenta

ARIANA MONTIEL ARZATE

Ensenada, Baja California

Agosto 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

Determinación de las condiciones óptimas para la expresión bacteriana de la
hormona hiperglucémica de crustáceos CHH-A del camarón blanco
Litopenaeus vannamei

TESIS

Para cubrir los requisitos necesarios para obtener el título de

BIOINGENIERO

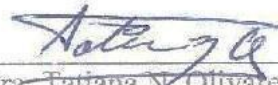
Presenta:

ARIANA MONTIEL ARZATE

Aprobada por:



Dra. Elizabeth Ponce Rivas
Director
(Presidente)



Dra. Tatiana N. Olivares Bañuelos
Codirector
(Secretario)



Dra. Claudia M. Gómez Gutiérrez
Sinodal
(Vocal)



Dra. Dora Luz Flores Gutiérrez
Sinodal
(Vocal)



Dr. David Cervantes Vásquez
Sinodal
(Vocal)

Resumen de la tesis que presenta Ariana Montiel Arzate como requisito para la obtención del grado de Licenciado en Bioingeniería. Ensenada Baja California. Agosto 2016.

Determinación de las condiciones óptimas para la expresión bacteriana de la hormona hiperglucémica de crustáceos CHH-A del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

Resumen aprobado:



Dra. Elizabeth Ponce Rivas.

Las hormonas hiperglucémicas de crustáceos (CHH, por sus siglas en inglés) son las neurohormonas más abundantes producidas en el órgano X-glándula del seno, el cual es el complejo neuroendocrino de mayor importancia en crustáceos. A la fecha se conocen 4 isoformas diferentes de CHH en *Litopenaeus vannamei*, de las cuales CHH-A tiene gran importancia por tener actividad hiperglucémica y participar en procesos de osmoregulación. En este trabajo se expresó la neurohormona CHH-A de *L. vannamei* como proteína de fusión usando el sistema de expresión pET en la cepa BL21 Star (DE3) de *Escherichia coli*. El gen que codifica para la proteína recombinante solamente puede ser transcrito por la ARN polimerasa T7, cuya producción se encuentra regulada por el operón *lac*, inducible con IPTG. La proteína de fusión contiene dos etiquetas de polihistidinas para facilitar su purificación y una etiqueta Nus para mejorar su solubilidad. También tiene un sitio de reconocimiento de enterocinasa, lo cual permite obtener la proteína sin aminoácidos adicionales correspondientes a las etiquetas de fusión mediante el uso de esta enzima. Para determinar las mejores condiciones de inducción de la proteína de fusión NusA-CHH-A se probaron dos diferentes concentraciones del inductor (0.1 y 1 mM), dos temperaturas (30°C y 37°C) y dos tiempos de incubación (6 h y 12 h) en medio LB. Las células del medio de cultivo fueron recuperadas y sonicadas. Las fracciones solubles e insolubles fueron analizadas en geles de Tricina SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie y mediante Western Blot usando un anticuerpo anti-His₆-HRP. En las fracciones solubles de todas las condiciones se observó la presencia de la proteína de fusión que contiene a la CHH-A, la cual tuvo el peso molecular esperado de 70 kDa. La temperatura que permitió la mayor expresión de la proteína fue 30°C con 12 h de incubación, utilizando una concentración de 1 mM de IPTG. La proteína de fusión NusA-CHH-A fue purificada parcialmente por cromatografía de afinidad con un rendimiento de 16 mg/L. Junto con la proteína de interés fue purificado un péptido de aproximadamente 48 kDa, el cual fue detectado por el anticuerpo anti-His₆-HRP. Las condiciones utilizadas para la digestión con enterocinasa no permitieron obtener el péptido esperado de 9 kDa correspondiente a la hormona CHH-A con el N-terminal libre. El análisis por SDS-PAGE y Western Blot sugiere que pudieron darse cortes inespecíficos dentro de la proteína de fusión, lo que dio lugar a pequeños péptidos como el de 20-22 kDa detectado por el anticuerpo anti-His₆-HRP. El análisis de la secuencia de la proteína de fusión mostró que esta contiene diversos sitios de digestión secundaria de enterocinasa sugeridos anteriormente por otros autores. Las características estructurales de la proteína NusA podrían estar afectando la especificidad de la reacción, por lo que deben optimizarse las condiciones de purificación y digestión para obtener el péptido recombinante CHH-A sin aminoácidos adicionales.

Palabras clave: *Litopenaeus vannamei*, CHH-A, *E. coli* BL21, proteínas de fusión, pET-44a(+).

Abstract of the thesis presented by Ariana Montiel Arzate as a requirement for obtain the degree of Bioengineer. Ensenada Baja California. August 2016.

Determination of the optimal conditions for bacterial expression of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH-A) from white shrimp *Litopenaeus vannamei*.

Abstract approved by:



Dr. Elizabeth Ponce Rivas.

The crustacean hyperglycemic hormones (CHH) are the most abundant neurohormones produced on the X organ-sinus gland, which is the most important neuroendocrine complex in crustacean. To date four CHH isoforms are known in *Litopenaeus vannamei*, of which CHH-A is important for having hyperglycemic activity and participate in osmoregulation processes. In this work, the neurohormone CHH-A from *L. vannamei* has been expressed as a fusion protein using the pET expression system on the *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) strain. The codifying gene for recombinant protein can be transcribed only by T7 RNA polymerase, whose production is regulated by *lac* operon which is induced by IPTG. The fusion protein has two polyhistidine tags to facilitate the purification and a Nus-tag to improve solubility. Also, it has a recognition site for enterokinase, which allows obtaining the protein without additional aminoacids corresponding to fusion tags by using this enzyme. To determine the best conditions for induction of the fusion protein NusA-CHH-A, two different concentrations of the inducer (0.1 and 1 mM IPTG), two incubation times (6 h and 12 h) and two incubation temperatures (30°C and 37°C) were used in LB medium. The cells were recovered from the culture medium and sonicated. The soluble and insoluble fractions were analyzed on Tricine-SDS PAGE gels stained with Coomassie blue and by Western Blot using an anti-His₆-HRP antibody. The presence of the fusion protein that contains CHH-A was confirmed, which has a molecular weight of 70 kDa. The temperature that allowed greater expression was 30°C on the soluble fractions of all conditions, being the higher expression at 30°C, at 12 hours of incubation using a concentration of 1 mM IPTG. A partial purification of the NusA-CHH-A fusion protein was made with a final yield of 16 mg/L. A peptide with molecular weight of 48 kDa approximately was also recovered, which was purified along with the interest protein and it was detected by the anti-His₆-HRP antibody. The conditions used for enterokinase digestion not allowed obtain the expected free N-terminal CHH-A peptide of 9 kDa. The SDS-PAGE and Western Blot analysis suggests nonspecific cuts within the fusion protein, which resulted in small peptides as the 20-22 kDa peptide detected by anti-His₆-HRP antibody. The sequence analysis of the fusion protein shows several nonspecific sites for enterokinase digestion that have been reported previously by other authors. The structural characteristics of NusA

could be affecting the specificity of the reaction, so the purification and digestion conditions must be optimized to obtain the recombinant peptide without additional aminoacids.

Key words: *Litopenaeus vannamei*, CHH- A, *E. coli* BL21, fusion proteins, pET-44a(+).

Dedicatorias

A Isaac Alexander Espinoza Montiel, con la esperanza de verte convertido en un hombre de bien.

A mi madre, la Dra. Elia Montiel Arzate, por estar siempre presente y por poner las bases tempranas de este proyecto.

A Alejandro Espinoza Jáuregui, por su lealtad, apoyo y cariño incondicional.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Baja California, por aceptarme y de esa forma poder cursar y terminar mis estudios de educación superior.

A la Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño por permitirme cursar la carrera de Bioingeniería.

Al Centro de Investigación Científica y Estudios Superiores de Ensenada por darme la oportunidad de llevar a cabo la experimentación de este trabajo en sus instalaciones y por aceptarme como estudiante de maestría en el programa del posgrado en Ciencias de la Vida, con especialidad en Biotecnología Marina.

A la Dra. Elizabeth Ponce Rivas, directora de tesis del presente trabajo, por su dedicación, paciencia, apoyo y por su confianza al otorgarme la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular, el cual está a su cargo. Muchas gracias por creer en mí.

A mi comité de tesis, conformado por la Dra. Tatiana N. Olivares, la Dra. Claudia M. Gómez, la Dra. Dora Luz Flores y el Dr. David Cervantes, así como al coordinador de Bioingeniería, el Dr. Rubén C. Villarreal. Gracias por sus enseñanzas a lo largo de estos años.

A la Dra. Edna Sánchez Castrejón, por todo su apoyo en la realización en los experimentos de este trabajo y por sus consejos. Gracias por la experiencia compartida.

A mis compañeros del Laboratorio de Biología Celular y Molecular: la Dra. Laura Camacho, M.C. Yesenia Balderas y M.C. Roberto Arredondo, quienes me introdujeron en el trabajo del cuidado de los organismos, lo que después derivó en el trabajo de laboratorio. A la próxima Bioingeniera Gloria Salinas, por el buen tiempo pasado en el laboratorio.

A mi familia, comenzando por mi pequeño Isaac Alexander Espinoza Montiel, quien ha crecido en todos los aspectos junto conmigo. A mi madre, la Dra. Elia Montiel Arzate, quien se esforzó mucho para que saliéramos adelante. A mis abuelos Porfirio Montiel e Irma Arzate por cuidarme y educarme, así como al resto de mi familia en Querétaro. A mi compañero de vida Alejandro Espinoza Jáuregui por estar siempre presente en las buenas y en las malas, así como al resto de su familia, que prácticamente es mi familia adoptiva.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español	III
Resumen en inglés	IV
Dedicatorias	VI
Agradecimientos	VII
Lista de Figuras	X
Lista de Tablas	XI
Introducción	1
Antecedentes	4
<i>Litopenaeus vannamei</i>	4
Sistema neuroendocrino de crustáceos: el complejo OX-GS.....	6
Superfamilia CHH.....	7
CHH.....	8
CHHs de <i>L. vannamei</i>	10
Sistemas de expresión.....	13
Ventajas y desventajas de los sistemas de expresión basados en <i>P. pastoris</i> y en <i>E. coli</i>	14
Sistema de expresión en <i>E. coli</i> . Los vectores pET.....	17
Justificación	22
Objetivos	23
Objetivo general.....	23
Objetivos específicos.....	23
Hipótesis	24
Metodología	25
Expresión de la proteína de fusión NusA-CHH-A recombinante.....	25
Cinética de crecimiento.....	26
Propiedades Físicas y Químicas.....	26

Inducción de Transformantes.....	27
Preparación de las muestras.....	28
Análisis de las proteínas en geles de Tricina SDS- PAGE.....	28
Inmunodetección de CHH-A por Western Blot.....	29
Purificación por cromatografía de afinidad.....	30
Diálisis de la proteína recombinante.....	31
Cuantificación de proteínas.....	32
Remoción del N-terminal adicional.....	33
Resultados y discusión.....	35
Cinética de crecimiento.....	35
Propiedades físicas y químicas.....	36
Inducción de transformantes.....	38
Purificación por cromatografía de afinidad.....	44
Diálisis.....	47
Cuantificación de proteínas.....	48
Digestión con enterocinasa.....	50
Sitios inespecíficos de digestión con enterocinasa.....	53
Inespecificidad de la digestión con enterocinasa en proteínas recombinantes.....	54
Remoción de la etiqueta de fusión Nus-tag.....	57
Conclusiones.....	62
Perspectivas.....	63
Bibliografía.....	64
Anexos.....	71
Secuencia completa de la proteína de fusión NusA-CHH-A.....	71

Lista de Figuras

Figura	Página
1	Ciclo de vida de los crustáceos del género <i>Penaeus</i>5
2	Vista anterior del pedúnculo ocular de los crustáceos decápodos.....6
3	Secuencia del gen <i>chhA</i>12
4	Sistema de expresión en los vectores pET.....18
5	Optimización de codones del gen <i>chhA</i>20
6	Vector de expresión pET-44a(+)......25
7	Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> BL21 Star (DE3) CHH-A.....35
8	Esquema completo de la proteína de fusión recombinante NusA-CHH-A.....36
9	Comparación entre la expresión de proteínas a 37°C y a 30°C.....39
10	Análisis de las muestras mediante Western Blot.....41
11	Visualización de las proteínas encontradas en los sobrenadantes mediante gel de Tricina-SDS PAGE y Western Blot.....43
12	Análisis de la purificación de proteína recombinante mediante geles de Tricina-SDS PAGE y Western Blot.....45
13	Comparación entre muestras sin dializar y dializadas.....47
14	Curva de calibración para determinar concentración de proteínas obtenida mediante el método de Bradford.....48
15	Curva de calibración de concentración de proteínas construida con los datos adquiridos por el método del BCA.....49
16	Geles de Tricina-SDS PAGE de las pruebas realizadas con las diferentes enterocinasas.....50
17	Análisis de las digestiones con enterocinasa con incubación de 6 horas mediante geles de Tricina-SDS PAGE y Western Blot.....52
18	Sitios de sustitución para el reconocimiento de enterocinasa.....54

Lista de Tablas

Tabla	Página
1 Propiedades fisicoquímicas estimadas con la herramienta ProtParam para la proteína de fusión expresada.....	37
2 Secuencias de corte inespecífico en la proteína de fusión NusA-CHH-A.....	57

Introducción

Los crustáceos son un subfilo de los artrópodos. La mayor parte de ellos pueden encontrarse en hábitats acuáticos, principalmente en ambientes marinos. Los crustáceos son el grupo de invertebrados de distribución más amplia y de diversidad morfológica más grande (Fingerman y Rodríguez, 2009). Debido a esto, presentan un grado alto de adaptación a los cambios de las condiciones del ambiente por factores externos.

La acuicultura de los crustáceos ha tomado gran importancia debido a la sobreexplotación de los ecosistemas acuáticos. De entre ellos, el cultivo de camarón ha incrementado su importancia en los últimos treinta años. Por lo tanto se ha llevado a cabo investigación dedicada al conocimiento de la fisiología del camarón, desde puntos de vista genético y bioquímico, mediante el uso de herramientas biotecnológicas.

La endocrinología de los crustáceos es un campo de estudio importante, ya que su sistema endocrino les confiere una gran variedad de funciones que es acorde a su capacidad de adaptación y a su éxito evolutivo. Muchos de sus órganos son regulados de forma hormonal, así como diversos mecanismos durante todo su ciclo de vida, tanto de corto, mediano y largo plazo (De Kleijn y Van Herp, 1995).

Entre los neuropéptidos sintetizados en la médula terminal del órgano X (OX) se encuentran la hormona hiperglucémica de crustáceos (CHH por sus siglas en inglés), la hormona inhibidora de la muda (MIH), la hormona inhibidora de la vitelogénesis (VIH) y la hormona inhibidora del órgano mandibular (MOIH). Este grupo de neurohormonas conforman la superfamilia de péptidos CHH, los cuales no solamente son diferentes entre

especies, sino que en una sola especie se pueden encontrar polimorfismos de dichas hormonas (Keller, 1992).

Las neurohormonas CHH son los péptidos más abundantes en la glándula del seno del pedúnculo ocular (Huberman, 2000) y tienen como función principal regular el metabolismo de carbohidratos. Sin embargo, se ha demostrado la multifuncionalidad de estos neuropéptidos en crustáceos decápodos dado que también participan en el metabolismo de lípidos, osmoregulación, modulación del ciclo de muda y reproducción (Fanjul-Moles, 2006; Hopkins, 2012).

En el camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, una especie de gran importancia a nivel mundial, se han identificado a la fecha cuatro isoformas de la neurohormona CHH: CHH-B1 y CHH-B2, las cuales son producidas por corte y empalme alternativo del gen *chhB*, así como CHH-A y LVCHH_PO_ES, las cuales son productos de genes diferentes. En nuestro grupo se han secuenciado, clonado y expresado las isoformas CHH-B1, CHH-B2 y CHH-A de forma recombinante en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*.

A partir de este microorganismo se han obtenido hormonas recombinantes con actividad hiperglucémica con etiquetas adicionales en el C-terminal (6X His, *c-myc*), así como en forma nativa (Sánchez-Castrejón et al, 2008; Balderas-González, 2014; Camacho-Jiménez et al, 2015). Aunque este sistema de expresión presenta ventajas como la posibilidad de realizar modificaciones post-traduccionales y la excreción al medio de cultivo (Daly y Hearn, 2005), el proceso de purificación para las formas nativas es complicado y se llegan a producir agregados proteicos e incluso formas truncadas. Por ello, es importante buscar nuevas alternativas de expresión que permitan producir hormonas con la secuencia original

a la nativa y con actividad biológica. Un organismo que ha sido muy utilizado para la producción de diversas proteínas recombinantes de importancia biotecnológica es la bacteria *Escherichia coli* (Baneyx y Mujacic, 2004; Sørensen y Mortensen, 2005). Sin embargo, los péptidos producidos por los sistemas y cepas tradicionales se producen como cuerpos de inclusión, lo que complica su purificación. Además, *E. coli* carece del sistema de plegamiento adecuado para las proteínas recombinantes eucariotas producidas (Baneyx y Mujacic, 2004). Estas problemáticas se han visto disminuidas por el uso de los sistemas de expresión pET-*E. coli* (Rosano y Cecarelli, 2014), con los cuales es posible producir proteínas de fusión con etiquetas que permiten su fácil purificación e identificación. También es posible eliminar las regiones adicionales mediante el uso de enzimas proteolíticas de tal forma que la proteína recombinante conserve su integridad y actividad biológica (Waugh, 2011; Rosano y Cecarelli, 2014).

En este sentido, el presente trabajo tiene por objetivo llevar a cabo la expresión de la neurohormona recombinante CHH-A de *L. vannamei* como proteína de fusión utilizando el sistema pET-*E. coli*. CHH-A es una hormona de gran interés ya que presenta actividad hiperglucémica (Wanlem et al, 2011; Arredondo-Espinoza, 2014) y tiene el C-terminal amidado, lo cual se ha relacionado con esta actividad. A la fecha se ha determinado su expresión en el corazón, hepatopáncreas y tejidos no neurales, como es el músculo (Sigala-Andrade, 2010; Liu et al, 2014).

Antecedentes

Litopenaeus vannamei

Desde que se introdujo la acuicultura del camarón en México, en 1985, ha sido una de las actividades que más rápido se ha expandido a lo largo de las costas mexicanas, sobre todo en las del Pacífico (Gutiérrez-Salazar et al, 2011). La producción nacional de camarón apenas aporta poco más del 10% del volumen de productos pesqueros, aunque en términos monetarios es casi la mitad del valor comercial del sector (Abascal y Macías, 2009). Esta actividad incluye la captura, acuicultura, procesos y servicio, concentrando el mayor desarrollo acuícola de México (FIRA, 2009).

De acuerdo con el Fondo de Fomento a la Agricultura, Ganadería y Avicultura (FIRA), la producción de camarón en México presentó una tasa media de crecimiento anual en el periodo de 1990 a 2008 del 6.81%, triplicándose en ese lapso de tiempo al pasar de 60,310 a 197,535 toneladas. En ese mismo periodo, la tasa de crecimiento de la acuicultura de camarón fue de 20.94%. En 2009, 2 de cada 3 kilos de camarón fueron producidos por acuicultura (FIRA, 2009). Es notable que la producción de camarón esté en aumento, dado que existen declives en la producción por el arribo de enfermedades que coinciden con la temporada fría provocada por el fenómeno climático de la Niña (FAO, 2006). Los estados de mayor producción son Sonora, Sinaloa, Nayarit, Colima y Baja California Sur. De las seis especies que se cultivan en México, la que tiene mayor importancia comercial es el camarón blanco, *L. vannamei* (FIRA, 2009). Esta especie es importante a nivel comercial dado que presenta una alta tasa de crecimiento y sobrevivencia en cultivos de altas densidades así como resistencia a enfermedades (González et al, 2010).

El camarón blanco *L. vannamei* es un crustáceo decápodo nativo de la costa oriental del Océano Pacífico desde Sonora, México, hasta Tumbes, Perú. Se encuentra en hábitats marinos tropicales cuya temperatura es superior a los 20°C todo el año (FAO, 2006) y en profundidades de hasta 70 m (González et al, 2010). Los adultos viven y se reproducen en mar abierto. Pueden liberar entre 100,000 y 250,000 huevos de 0.22 mm de diámetro. La incubación ocurre después de 16 horas del desove y de la fertilización. Las primeras etapas de desarrollo son nauplio, protozoa, misis y postlarva en las cuales son organismos planctónicos. Los nauplios se alimentan de su reserva embrionaria, mientras que en las siguientes etapas se alimentan de fitoplancton y zooplancton. Después de 5 días de su metamorfosis, las larvas migran a la costa y empiezan a alimentarse de detritos bentónicos, gusanos, bivalvos y otros crustáceos. La etapa juvenil, adolescente y pre-adulta la pasan en estuarios, lagunas costeras y manglares (FAO, 2006) (Fig. 1).

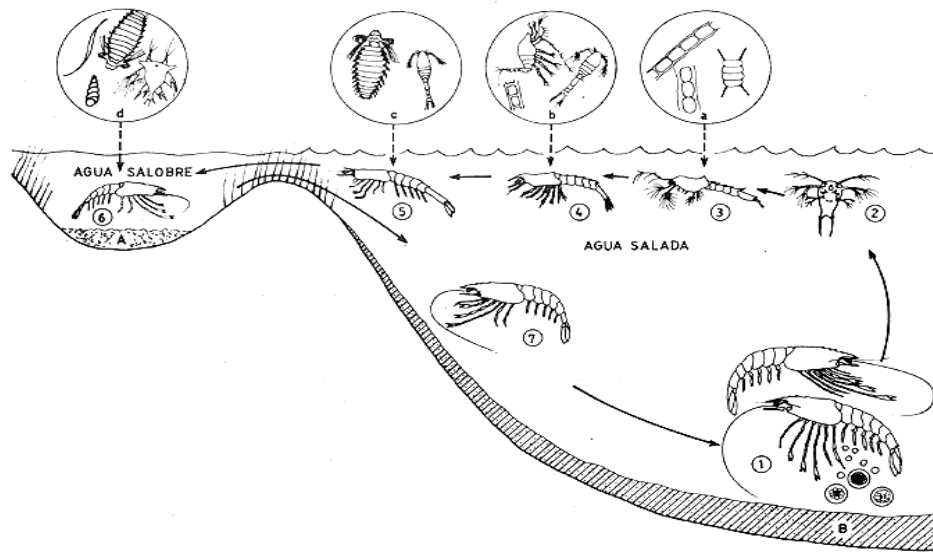


Figura 1. Ciclo de vida de los crustáceos del género *Penaeus* (FAO, 2006).

Es por su ciclo de vida que los organismos sufren de cambios constantes de salinidad y temperatura, a lo cual han desarrollado mecanismos de adaptación y regulación (Díaz et al,

2001), como es el desarrollo del sistema neuroendocrino y la secreción de neurohormonas de naturaleza peptídica.

Sistema neuroendocrino de crustáceos: el complejo OX-GS

Los crustáceos han desarrollado un sistema neuroendocrino complejo que les permite responder a elementos externos como son la temperatura, salinidad, fotoperiodo, nutrición y el estrés. Este actúa mediante el ajuste de sus funciones vitales a sus necesidades inmediatas a través de elementos reguladores que actúan a corto, mediano o largo plazo (De Kleijn y Van Herp, 1995).

El mayor sistema neuroendocrino de crustáceos decápodos está localizado en el complejo del órgano X-glándula del seno (OX-GS) en la médula terminal del pedúnculo ocular (De Kleijn y Van Herp, 1995) (Fig. 2).

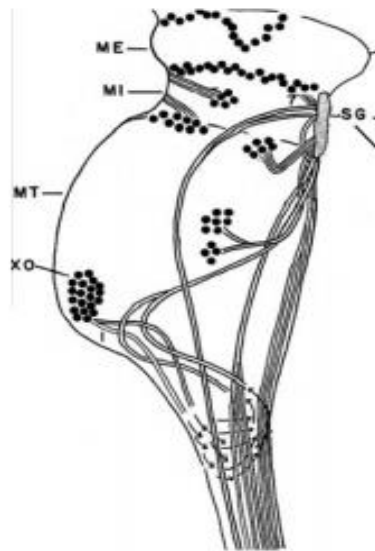


Figura 2. Vista anterior del pedúnculo ocular de los crustáceos decápodos. Las líneas dobles simbolizan el tracto de fibras nerviosas, mientras que los círculos negros los cuerpos celulares neurosecretorios. Se aprecian el órgano X (XO), la glándula del seno (SG), la médula terminal (MT), la médula interna (MI) y la médula externa (ME). Tomado de Hopkins (2012).

El órgano X y la glándula del seno se encuentran conectados por el nervio de la glándula del seno (Cooke y Sullivan, 1982; Fanjul-Moles, 2006). Después de haber sido transportadas por largos axones, las neurohormonas de la superfamilia CHH se almacenan en la glándula del seno y son secretadas al torrente sanguíneo (Keller, 1992; Chung et al, 2010). En decápodos, el órgano X está conformado por una población heterogénea de células neurosecretoras que producen diferentes neuropéptidos. Alrededor de un 90% de las terminales de la glándula del seno son terminales neurosecretoras del órgano X (Cooke y Sullivan, 1982). Las neurohormonas producidas por el sistema neuroendocrino se dividen en dos grandes tipos: la familia de cromatoforotropinas y la superfamilia CHH (Fanjul-Moles, 2006).

Superfamilia CHH

Dentro de esta familia de péptidos se incluyen la hormona hiperglucémica de crustáceos (CHH por sus siglas en inglés), la hormona inhibidora de la muda (MIH), la hormona inhibidora de la vitelogénesis (VIH) y otros péptidos relacionados como son las hormonas inhibidoras del órgano mandibular (MOIH). Como función general, las CHHs aumentan los niveles de glucosa en la hemolinfa; las MIHs inhiben la síntesis de ecdisteroides, que son hormonas de la muda secretadas por el órgano Y, con la finalidad de mantener al organismo en periodo de intermuda; las VIHs inhiben la vitelogénesis en las hembras y las MOIHs inhiben la liberación de metilfarnesoato por acción del órgano mandibular (De Kleijn y Van Herp, 1995; Lacombe et al, 1999; Huberman, 2000). Se ha descubierto que estos péptidos son hormonas pleiotrópicas, es decir, multifuncionales y por lo tanto exhiben una amplia diversidad de funciones biológicas (Fanjul-Moles, 2006; Hopkins, 2012; Webster et al,

2012). Durante las pasadas dos décadas se han identificado aproximadamente 80 péptidos diferentes en alrededor de 40 especies de crustáceos (Webster et al, 2012).

Los péptidos de la familia CHH se han encontrado en especies diferentes a los crustáceos, incluyendo el péptido de transporte de electrones en insectos (ITP), cuya función es simular el transporte de iones a través del epitelio íleo de las langostas y el péptido CHH-like identificado en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Chen et al, 2005). Por lo general, los péptidos de la familia CHH sólo se encuentran en artrópodos.

Estas neurohormonas contienen alrededor de 72-78 residuos de aminoácidos de largo, tienen un peso molecular aproximado de 8-9 kDa y tienen seis residuos de cisteína conservados que forman tres enlaces disulfuro intramoleculares, al igual que dos residuos de arginina, uno de ácido aspártico y uno de fenilalanina en la misma posición, lo cual está asociado a su actividad biológica (Böcking et al, 2002; Fanjul-Moles, 2006).

CHH

Es el neuropéptido más abundante en el pedúnculo ocular (Mosco, et al, 2008) y es una hormona importante a lo largo del desarrollo y ciclo de vida de los organismos (Fanjul-Moles, 2006). Las CHHs regulan el metabolismo de los carbohidratos, ya que provocan el incremento de glucosa en la hemolinfa. Principalmente movilizan glucosa desde los depósitos de glucógeno, de forma primaria desde los músculos y el hepatopáncreas, para así regular el nivel de glucosa hemolinfática (Sedlmeier, 1985). Actúa promoviendo la glucogenólisis mientras que inhibe la síntesis de glucógeno en los órganos diana (Sedlmeier, 1982). Es liberada en respuesta a una variedad de señales internas y externas para cumplir con las necesidades energéticas de compensación fisiológica (Chen et al,

2005). Sin embargo, se sabe que las CHHs no se limitan al metabolismo de la glucosa, sino que también están involucradas en la reproducción (De Kleijn y Van Herp, 1998), muda (Chung et al, 1999; Chung y Webster, 2003), metabolismo de lípidos (Santos et al, 1997) y respuesta al estrés de los organismos (Chang, 2005), así como inmunidad (Wanlem, 2011) y la secreción de enzimas digestivas (Sedlmeier, 1988). Las múltiples actividades de las CHHs han sido atribuidas a la presencia de isoformas que se pueden generar por varios mecanismos, incluidos la transcripción de múltiples copias de genes, el corte y empalme alternativo o modificaciones post traduccionales como la isomerización L a D y el bloqueo del N- terminal (Fanjul-Moles, 2006).

Los genes que codifican para CHH se encuentran clasificados en dos tipos de acuerdo a su organización exón-intrón. Los genes CHH tipo I tienen 4 exones y 3 intrones mientras que los genes CHH tipo II tienen 3 exones y 2 intrones. La mayoría de los genes tipo I codifican dos transcritos que por lo general comparten la secuencia del péptido señal, la del CPRP (el cual es un péptido relacionado al precursor de CHH que es escindido por una señal de procesamiento) y la región del N-terminal, codificadas por los exones I y II, diferenciándose por la secuencia del C-terminal que puede ser codificada por exones III o VI. Los exones I y II de los genes tipo II contienen la región 5'UTR, el CPRP y la mitad del N- terminal del péptido maduro mientras que el exón III codifica el C- terminal y contiene la región 3' UTR (Chen et al, 2005).

Las isoformas que se originan por corte y empalme alternativo tienen diferentes patrones de expresión, ya que se han detectado transcritos en tejidos diferentes al pedúnculo ocular (Sigala-Andrade, 2010; Lee et al, 2014). Se ha demostrado que las CHHs no se encuentran confinadas a tejidos neurológicos como son particularmente el complejo OX-GS y el

órgano pericárdico, sino que también se encuentran expresadas en tejidos y órganos no-neurales (Chung et al, 2010), aunque en menor nivel (Wu et al,2012). De las isoformas que se originan de esta manera, sólo una de ellas tiene el C-terminal amidado, mientras que la otra es un péptido CHH- like con el C-terminal libre. El N-terminal de ambas isoformas contiene un residuo de piroglutamato, siendo está una modificación post-traducciona que protege a los péptidos de la degradación por aminopeptidasas (Webster et al, 2012) y comparten una secuencia consenso de 40 aminoácidos (Lee et al, 2014). En general, la amidación del C-terminal se ha asociado con la actividad hiperglucémica de las CHHs (Katayama et al, 2003; Mosco et al, 2008).

Las CHHs han sido ampliamente estudiadas ya que son péptidos muy abundantes y tienen arreglos biológicos bien establecidos para su análisis. Sin embargo, su estudio se dificulta por su similitud estructural con los otros neuropéptidos producidos en el complejo OX-GS, la existencia de las diferentes isoformas ya mencionadas y por las actividades pleiotrópicas de estos (Gu et al, 2000).

CHHs de *L. vannamei*

Se han identificado cuatro neurohormonas CHH en el pedúnculo ocular de *L. vannamei*: las isoformas CHH-B1 y CHH-B2 (de 73 aa y 74 aa, respectivamente) producidas por corte y empalme alternativo del gen *chhB* (Lago-Lestón et al, 2007), CHH-A, que se encuentra codificada por el gen *chhA* (Lago-Lestón et al, 2007) y de reciente descubrimiento la isoforma LVCHH_PO_ES, expresada por el gen *Lvchh*, el cual ha sido ya caracterizado (Ventura-Lopez et al, 2016). Las isoformas CHH-B1, CHH-B2 y CHH-A han sido clonadas, secuenciadas y expresadas por nuestro grupo en la levadura *P. pastoris* (Lago-

Lestón et al, 2007; Sánchez-Castrejón et al 2008; López-Rodríguez, 2009; Balderas-González, 2014; Camacho-Jiménez et al, 2015).

La neurohormona CHH-A es producto de un gen tipo II que contiene 789 pb, tiene 74 residuos de aminoácidos y pesa alrededor de 8.76 kDa. El exón I tiene una pequeña parte del péptido señal, mientras que el exón II incluye el resto del péptido señal y el CPRP. Un sitio de procesamiento (KR) se encuentra en la primer parte del exón II, seguido de los 40 aminoácidos del péptido maduro. Entre la unión de los exones II y III se encuentra un residuo de arginina en la posición 40. Como en otros péptidos miembros de la familia CHH, los primeros dos nucleótidos que codifican para este residuo se encuentran en el exón II mientras que el siguiente nucleótido se encuentra en el exón III. El C- terminal tiene el sitio de procesamiento GK (Lago-Lestón et al, 2007) (Fig.3).

chh gene	TCACCAAACGCTCGCTCTTCGACCCCTTCTGCACCGGCGTCTTCGACCGGCAGCTCTTGC	60
Liv-CHH	T K R S L F D P S C T G V F D R Q L L	
chh gene	GGAGGCTGCGTTCGAGTGTGTGACGACTGTTTCAACGTATTCAGGGAACCCAACGTATCTA	120
Liv-CHH	R R L R R V C D D C F N V F R E P N V S	
chh gene	CTGAATGCAGGTCCGTCATCTATGGATTTCCCTTTTTTTTACATTTCCCTACATCAATACC	180
Liv-CHH	T E C R-----	
chh gene	CTTTCACGATATCAGTTTCATTGCATATGACACGGAAGGCTGTCTAAGGCACCCATCTT	240
Liv-CHH	-----INTRON-----	
chh gene	TGACACTAATCACATATTTTTACAGAAAGTAACTGTTACAACAATGAAGTGTTCGCCAGT	300
Liv-CHH	----- S N C Y N N E V F R Q	
chh gene	GTATGGAATACCTCCTCCCGCCTCACCTTCACGAAGAGCACAGACTAGCTGTCCAGATGG	360
Liv-CHH	C M E Y L L P P H L H E E H R L A V Q M	
chh gene	TCGGGAAATAGATTACGGTTAAGACGCTGCAACCCACTTCGCTGACGACAGGAATCCGA	420
Liv-CHH	V G K *	
chh gene	TGATAGTAAAAGGCACCCTAATTCCACTTATTCTACAGCATAGCACTGAGTCCCTCGATCG	480
chh gene	CTGTAACGAATGGTTTCCAATGCTGAAGACTTATACTATGAAATGAAGCTGACTTCCACT	540
chh gene	CTAAGAAATAAGAATGAAAGGGTGCAGTTTGCCATTATATTGGGACTATCGTGACACATT	600
chh gene	TAGTTCGGCCACTGATCACAGTATAGAAAATATATATACCCATGAACGCCATTTATCAGG	660
chh gene	AAACTGGAGAAAAAATATCACTGAAAGAGATTGTTCTTAGGACTCGAGGCTTTAATTAAC	720
chh gene	ATTAGAATAGGTATTTGTGATGTTTTATTATGTTTAAATTTACGAATAAAGGACTGGCAT	780
chh gene	GCA	783

Figura 3. Secuencia del gen *chhA*, el cual codifica para el péptido maduro de la neurohormona CHH-A. Se muestra la secuencia de aminoácidos, se indica el sitio de procesamiento KR (subrayado), los residuos conservados de cisteínas en negritas, las uniones exón-intrón en gris y el codón de término con un asterisco. Tomado de Lago-Lestón et al, (2007).

La expresión de CHH-A es mayor en el pedúnculo ocular y en el corazón que en otros tejidos, como son el hepatopáncreas, nervio abdominal y músculo (Liu et al, 2014) pero no se han detectado transcritos en branquias (Sigala-Andrade, 2010; Liu et al, 2014). A la vez, este péptido es expresado de mayor forma cuando el organismo se encuentra expuesto a temperaturas y salinidades extremas al mismo tiempo (Lago-Lestón et al, 2007).

Este neuropéptido ha sido clonado y expresado en sistemas procariotas como proteína de fusión con un N- terminal adicional (Wanlem et al, 2011; Liu et al, 2014), así como en sistemas eucariotas con un C-terminal adicional (Arredondo-Espinoza, 2014) o sin él (Balderas-González, 2014).

CHH-A, en su forma recombinante, ha demostrado tener actividad hiperglúcemica aún sin la amidación del C- terminal (Arredondo-Espinoza, 2014) o con aminoácidos adicionales correspondientes a una etiqueta 6X His y a un epítipo V5 (Wanlem et al, 2011).

Asimismo, se ha sugerido que la CHH-A posee participación en la modulación de la osmoregulación de *L. vannamei* al modificar la actividad de la Na⁺/K⁺ ATPasa en las branquias, la cual es la enzima de transporte más importante en dicho proceso (Liu et al, 2014). La inyección de neurohormona recombinante en baja cantidad es capaz de restablecer la capacidad osmoreguladora de la hemolinfa de organismos expuestos a baja salinidad, dos horas post inyección (Balderas-González, 2014). Incluso se ha observado que la CHH-A tiene la capacidad de mejorar la respuesta inmune de organismos infectados con la bacteria *Vibrio harveyi* mejorando su tasa de supervivencia, aumentando parámetros hemolinfáticos como el conteo total de hemocitos, la actividad de la fenoloxidasa y la actividad de remoción de bacterias de la hemolinfa (Walem et al, 2011).

Sistemas de expresión

Las neurohormonas recombinantes de crustáceos han sido utilizadas para diversos estudios, como en el diseño de anticuerpos, predicción de estructura secundaria, determinación de estructuras tridimensionales, análisis de la relación estructura-actividad y caracterización de receptores (Ohira et al, 2006).

La gran ventaja de preparar neurohormonas recombinantes es que se obtiene más producto que al extraerlas en su forma nativa de los pedúnculos oculares. Por ejemplo, Chang et al (2010) obtuvieron un rendimiento de 45 µl/100 GS de péptidos nativos del cangrejo de lodo *Scylla olivacea* mientras que al preparar péptidos recombinantes obtuvieron de dos a tres

miligramos por litro de cultivo bacteriano procesado. Los péptidos en cuestión eran Sco-CHH y Sco-CHH-L.

La estructura de los péptidos está ligada a su función, por lo tanto se busca que estos sean lo más parecido posible a las neurohormonas nativas y así poder llevar a cabo estudios posteriores de manera exitosa.

Ventajas y desventajas de los sistemas de expresión basados en *P. pastoris* y en *E. coli*

Los sistemas de expresión procariotas más utilizados para expresión de CHHs recombinantes utilizan a *E. coli* como huésped, mientras que los sistemas de expresión eucariotas más importantes utilizados a la fecha para la expresión de CHHs están basados en el uso de la levadura *P. pastoris*.

P. pastoris tiene la capacidad de llevar a cabo el plegamiento correcto de la proteína recombinante, así como modificaciones post traduccionales y por medio de una señal de secreción es posible que la proteína sea soluble y secretada al medio de cultivo (Cregg y Higgins, 1995). *P. pastoris* es transformada por medio de la integración del casete de expresión dentro del cromosoma en un locus específico (Sreekrishna et al, 1997; Daly y Hearn, 2005). Dicho en otras palabras, *P. pastoris* puede llevar a cabo recombinación homóloga, lo que confiere una gran ventaja para generar transformantes genéticamente estables.

Uno de los problemas que enfrenta la expresión de proteínas recombinantes en *P. pastoris* es la degradación proteolítica bajo ciertas condiciones de cultivo (Kobayashi et al, 2000). También se ha observado la formación de agregados proteicos que pueden producirse en el interior de las células o después de la secreción de la proteína (Woo et al, 2006). Esto puede

causar pérdida de actividad y dificultad en la purificación de la proteína recombinante (Wu et al, 2008).

Por otro lado, las ventajas del uso de *E. coli* para la producción de proteínas recombinantes son bastantes conocidas. Su tiempo de replicación es de 20 min cuando se encuentra en las condiciones óptimas en un medio que contenga glucosa y sales minerales (Sezonov et al, 2007). Por esta razón cabe mencionar que es posible preparar medios complejos a partir de componentes relativamente económicos y accesibles (Rosano y Cecarelli, 2014).

Es capaz, además, de alcanzar altas densidades de cultivo y alta tasa de crecimiento cuando se siguen las estrategias adecuadas, las cuales se han desarrollado basándose en el conocimiento de la fisiología de *E. coli*. Otro aspecto que se debe resaltar es que el escalamiento del proceso es simple. La genética de *E. coli* se encuentra bien caracterizada, por lo que se han desarrollado herramientas para la clonación y expresión de genes (Baneyx y Mujacic, 2004), entre las cuales se encuentra la variedad de plásmidos disponibles, proteínas de fusión recombinantes y cepas mutantes (Sørensen y Mortensen, 2005).

Sin embargo, dado que *E. coli* es un huésped procariota, carece de la maquinaria intracelular adecuada para llevar a cabo las modificaciones post traduccionales que las proteínas de origen eucariota necesitan para ser expresadas correctamente. En *E. coli*, la producción de las proteínas recombinantes es dependiente de la estructura y la funcionalidad de las mismas (Makrides, 1996).

Otro problema común de la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* es la formación de cuerpos de inclusión, los cuales son agregados proteicos que se forman por el desequilibrio entre la agregación de la proteína y su solubilización. Este desequilibrio es

causado por las diferentes condiciones de pH, osmolaridad, potenciales redox, cofactores y mecanismos de plegamiento que ofrece *E. coli* a diferencia del ambiente donde la proteína es secretada originalmente (Rosano y Cecarelli, 2014). Para poder utilizar las proteínas expresadas de esta manera, es necesario llevar a cabo una reacción de plegamiento adicional, lo cual puede conducir a pérdida de funcionalidad y pérdida de rendimiento (Marston, 1986). Por otro lado, la formación de cuerpos de inclusión se ha explotado para expresar proteínas tóxicas, inestables o fáciles de replegar. Otro problema que se enfrenta es la susceptibilidad a la degradación proteolítica (Baneyx y Mujacic, 2004), por lo que se han desarrollado cepas con genotipos deficientes en proteasas.

La inducción en *E. coli* se lleva a cabo en horas, mientras que *P. pastoris* necesita de dos a cuatro días para poder producir suficiente cantidad de proteína recombinante. Esto se debe a que en *E. coli* la transcripción y la traducción en el citoplasma son procesos altamente acoplados, de tal forma que una cadena polipeptídica se libera del ribosoma cada 35 segundos (Lorimer, 1996), lo que dificulta el plegamiento correcto de las proteínas si estas poseen multidominios o son proteínas recombinantes (Baneyx y Mujacic, 2004). Sin embargo, los péptidos pequeños de menos de 100 residuos de aminoácidos alcanzan su conformación nativa de acuerdo a su propia cinética de plegamiento (Baneyx y Mujacic, 2004). Por otra parte, para sobrellevar los problemas que surgen a raíz de la expresión de proteínas en *E. coli*, se han desarrollado sistemas funcionales que combinan la elección de los promotores adecuados así como de la cepa, etiquetas para purificación, proteínas de fusión para conferir solubilidad y sitios de reconocimiento. Uno de ellos es el sistema de expresión con vectores pET y la cepa BL21.

Sistema de expresión en *E. coli*. Los vectores pET

Los sistemas de expresión basados en la ARN polimerasa del bacteriófago T7 han sido utilizados recientemente para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*, encontrándose más de 40 plásmidos disponibles (Sørensen y Mortensen, 2005). La expresión en un sistema como este requiere del uso de una cepa específica que cuente con el gen de la ARN polimerasa T7 bajo el control de un promotor inducible, como es el promotor *lac* (Fig. 4). Como inductor se utiliza isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). De esta forma, se produce ARN polimerasa T7 en lugar de β -galactosidasa, la enzima que cataliza la hidrólisis de galactósidos (Dubendorff y Studier, 1991). Las cepas de la serie BL21, que son deficientes en las proteasas Lon y OmpT (Rosano y Cecarelli, 2014), cuentan con este gen y esta regulación. Si el inductor no se encuentra presente, el promotor *lac* se encontrará reprimido por el represor *lac*, producto del gen *lacI*. La unión del represor tetramérico con IPTG provocará la liberación del primero, dejando el operador *lac* libre, por lo tanto la ARN polimerasa T7 puede ser transcrita (Dubendorff y Studier, 1991). El gen de interés está bajo el control del promotor T7, una secuencia de 20 nucleótidos que no es reconocida por la ARN polimerasa de *E. coli* (Studier y Moffatt, 1986). Por lo tanto, al haber una ARN polimerasa que sea afín a este promotor, el gen de interés será transcrito (Fig. 4). La ARN polimerasa transcribe hasta 230 nucleótidos por segundo, lo que la hace más rápida que la ARN polimerasa de *E. coli*, que transcribe 50 nucleótidos por segundo (Sørensen y Mortensen, 2005).

A su vez, este sistema de expresión permite utilizar otras estrategias para mejorar la expresión y el rendimiento de la proteína recombinante. Una de ellas el uso de etiquetas de afinidad como es la de polihistidinas (6X His), la cual es compatible con la cromatografía

de afinidad y el uso de proteínas de fusión, como es la NusA (N-utilizing substance A protein) para mejorar la solubilidad de la proteína. Una vez que las proteínas de interés han sido purificadas, las etiquetas adicionales pueden eliminarse mediante digestión enzimática con una proteasa que tenga un sitio de reconocimiento específico (trombina o enterocinasa), el cual debe quedar incluido dentro de la secuencia del N-terminal (Sørensen y Mortensen, 2005), que es el mecanismo en el que se basa el funcionamiento del sistema del vector pET-44a (+)

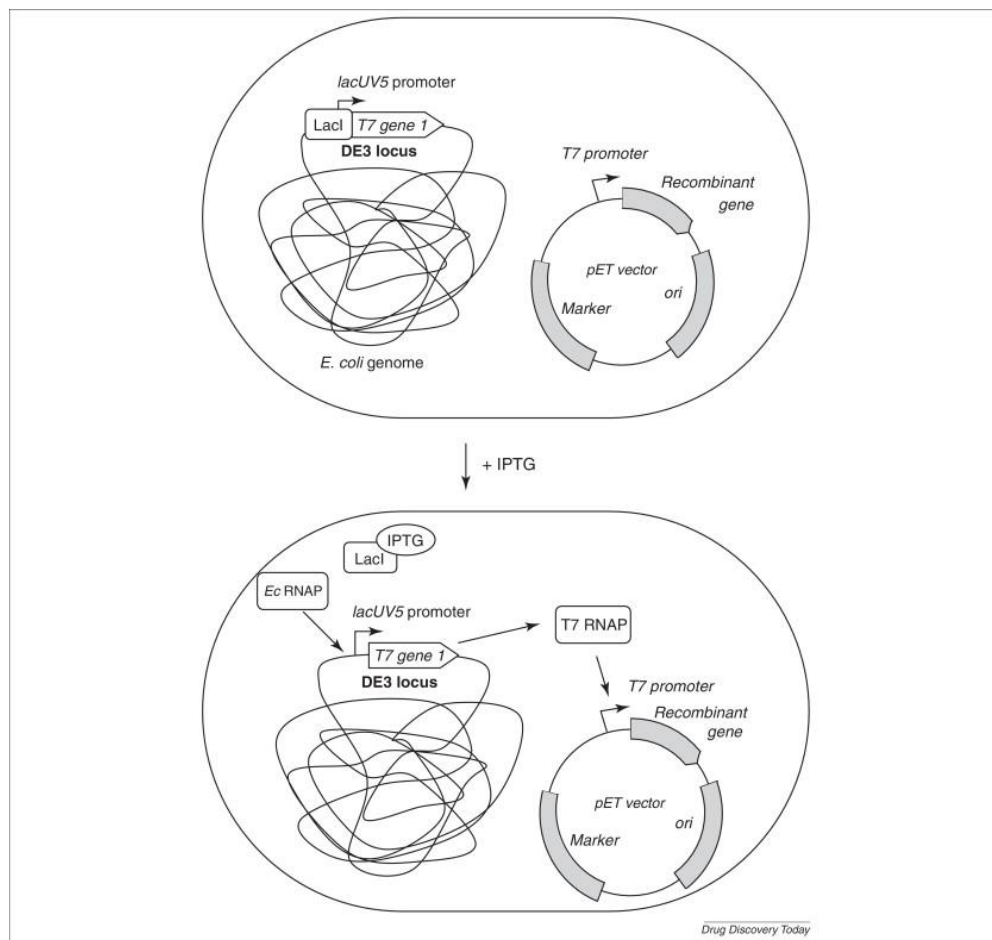


Figura 4. Sistema de expresión en los vectores pET. Tomado de Overton (2013).

A la fecha se han expresado varios neuropéptidos de crustáceos usando este vector. Nagai et al (2009) expresaron la neurohormona recombinante Pej-SGP-VII de *Marsupenaeus japonicus* en forma soluble, por lo que no fue necesario llevar a cabo una reacción de repliegamiento. Para eliminar las etiquetas de afinidad se usó digestión con trombina, sin embargo, la baja eficiencia de la reacción disminuyó el rendimiento de la proteína. Aun así, la proteína fue amidada y se utilizó posteriormente para medir su actividad hiperglucémica *in vivo*. Inoue et al (2011) utilizaron el mismo sistema para expresar Pej-SGP-I, también de *M. japonicus*, reportando la correcta secuencia del N-terminal del péptido, el cual fue usado para posteriores estudios de cristalización y difracción de rayos x.

Recientemente, en nuestro grupo, se ha clonado y expresado CHH-A en el plásmido pET-44a(+)-chhA en la bacteria *E. coli* BL21 Star (DE3), con vistas a producir la neurohormona CHH-A como proteína de fusión, de manera soluble y con el plegamiento correcto. Para lograr este objetivo, se optimizó la secuencia del gen *chhA* de *L. vannamei* al uso de codones de *E. coli* (Gen Script) (Fig.5). Esto debido a que el gen nativo emplea codones que son poco frecuentes en *E. coli* y que además pueden reducir la eficiencia de la traducción e inclusive desensamblar la maquinaria de traducción. Según lo reportado por Gen Script, se redujo el contenido de las bases guanina y citosina, aumentó la vida del ARN mensajero y se eliminaron estructuras de asa y tallo, las cuales interfieren en la unión del ARN mensajero con los ribosomas, así como en su estabilidad (Arredondo-Espinoza, 2014).

Esta secuencia optimizada no contiene el último residuo de lisina perteneciente a la secuencia original para llevar a cabo posteriores ensayos de amidación *in vitro*, por lo que el último residuo libre es una glicina. Para llevar a cabo la reacción de amidación se utiliza

la enzima monooxigenasa α -amidante de peptidil-glicina (PAM). Este método se ha usado para amidar la neurohormona CHH-B2 (Camacho-Jiménez, 2016).

```

AGT CTC TTT GAC CCG TCC TGT ACC GGC GTT TTT GAC CGC CAA CTG CTG CGT CGT CTG CGT
TCG CTC TTC GAC CCT TCC TGC ACC GGC GTC TTC GAC CGG CAG CTC TTG CGG AGG CTG CGT
CGT GTG TGT GAT GAT TGC TTT AAT GTT TTT CGT GAA CCG AAC GTG AGC ACC GAA TGC CGT
CGA GTG TGT GAC GAC TGT TTC AAC GTA TTC AGG GAA CCC AAC GTA TCT ACT GAA TGC AGG

TCT AAC TGT TAC AAC AAC GAA GTT TTC CGC CAG TGC ATG GAA TAC CTG CTG CCG CCG CAC
AGT AAC TGT TAC AAC AAT GAA GTG TTC CGC CAG TGT ATG GAA TAC CTC CTC CCG CCT CAC

CTG CAC GAA GAA CAT CGC CTG GCT GTC CAA ATG GTC GGT TAA

CTT CAC GAA GAG CAC AGA CTA GCT GTC CAG ATG GTC GGG TAA

```

Figura 5. Optimización de codones del gen *chhA* para su expresión en plataforma bacteriana. La secuencia en negritas muestra el gen original mientras que los codones que fueron modificados están subrayados en amarillo. El codón de término se encuentra en letras rojas. Tomado de Arredondo-Espinoza (2014).

La región adicional del N-terminal puede ser eliminada una vez que la proteína sea purificada por cromatografía de afinidad, lo cual permite obtener la hormona con la secuencia nativa sin afectar su actividad en los bioensayos en los que se utilice posteriormente. Esto gracias a que la proteína recombinante tiene dos sitios de seis histidinas y un sitio de reconocimiento de la proteasa de serina enterocinasa. También incluye una etiqueta Nus-tag, la cual es la proteína NusA de *E. coli*. Una de las funciones biológicas de la proteína NusA es el provocar que la ARN polimerasa tenga periodos de pausa mientras se encuentra en sitios específicos del templete de ADN. En organismos procariotas la transcripción y la traducción se encuentran acopladas, por lo tanto NusA es

capaz de incrementar la solubilidad de las proteínas traducidas retardando la traducción en las pausas de la transcripción permitiendo que estas se plieguen correctamente (Davies et al, 1999). Se ha comprobado un aumento en la solubilidad y estabilidad de las proteínas de fusión que son expresadas con NusA (De Marco et al, 2004; Nallamsetty y Waugh, 2006).

Justificación

No obstante que la hormona hiperglucémica de crustáceos es el péptido mayoritario producido en el órgano X-glándula del seno del pedúnculo ocular, principal centro neuroendocrino de crustáceos, su función no ha sido entendida por completo en crustáceos, incluyendo *L. vannamei*. De las cuatro neurohormonas encontradas a la fecha en *L. vannamei*, CHH-A resulta de gran interés ya que presenta una señal de amidación en el C-terminal y se ha visto que se expresa en otros tejidos como corazón, hepatopáncreas y músculo. Esta hormona tiene actividad hiperglucémica y participa en procesos de osmoregulación, además de mejorar la respuesta inmune de los organismos. Esta ha sido clonada y expresada en la levadura *P. pastoris* con un C-terminal adicional o con la secuencia lo más parecida a la original para llevar a cabo ensayos de actividad biológica. Sin embargo, la purificación de las formas nativas mediante este sistema resulta complicada, obteniendo proteínas contaminantes o variaciones de conformaciones. En este sentido, la utilización de sistemas de expresión alternativos como el sistema pET en *E. coli* permitirá buscar opciones para expresar hormonas recombinantes funcionales con la secuencia nativa, con el plegamiento correcto y en forma soluble, las cuales puedan ser expresadas y purificadas en cantidades requeridas para realizar ensayos de actividad biológica.

Objetivos

Objetivo general

Establecer las condiciones óptimas de expresión de la hormona hiperglucémica de crustáceos CHH-A recombinante de *L. vannamei* expresada como proteína de fusión en la bacteria *E. coli*.

Objetivos específicos

1. Determinar las condiciones óptimas de la expresión de la hormona CHH-A de *L. vannamei* en *E. coli* producida como proteína de fusión en el sistema pET-BL21.
2. Purificar la hormona CHH-A recombinante por cromatografía de afinidad.
3. Montar las condiciones óptimas para la actividad enzimática de la enterocinasa para la eliminación de las etiquetas adicionales unidas a la proteína CHH-A.
4. Llevar a cabo ensayos de inmunodetección de la proteína de fusión purificada y de la CHH-A mediante el uso de anticuerpos anti-His₆-HRP y anti-CHH-A.

Hipótesis

El uso del vector pET-44a(+) con la secuencia optimizada de la isoforma CHH-A de *L. vannamei* permitirá la expresión en *E. coli* de CHH-A como proteína de fusión soluble, la cual podrá ser purificada y detectada por medio de las etiquetas adicionales incluidas en el N-terminal de la proteína.

Metodología

Expresión de la proteína de fusión NusA-CHH-A recombinante

En el presente trabajo se trabajará con la cepa de *E. coli* BL21 Star (DE3) CHH-A, la cual en combinación con el plásmido pET-44a(+)-chhA permiten la expresión de CHH-A recombinante fusionada en el N-terminal a las etiquetas Nus y His-tag (Fig. 6), que podrá ser utilizada para evaluar su actividad biológica.

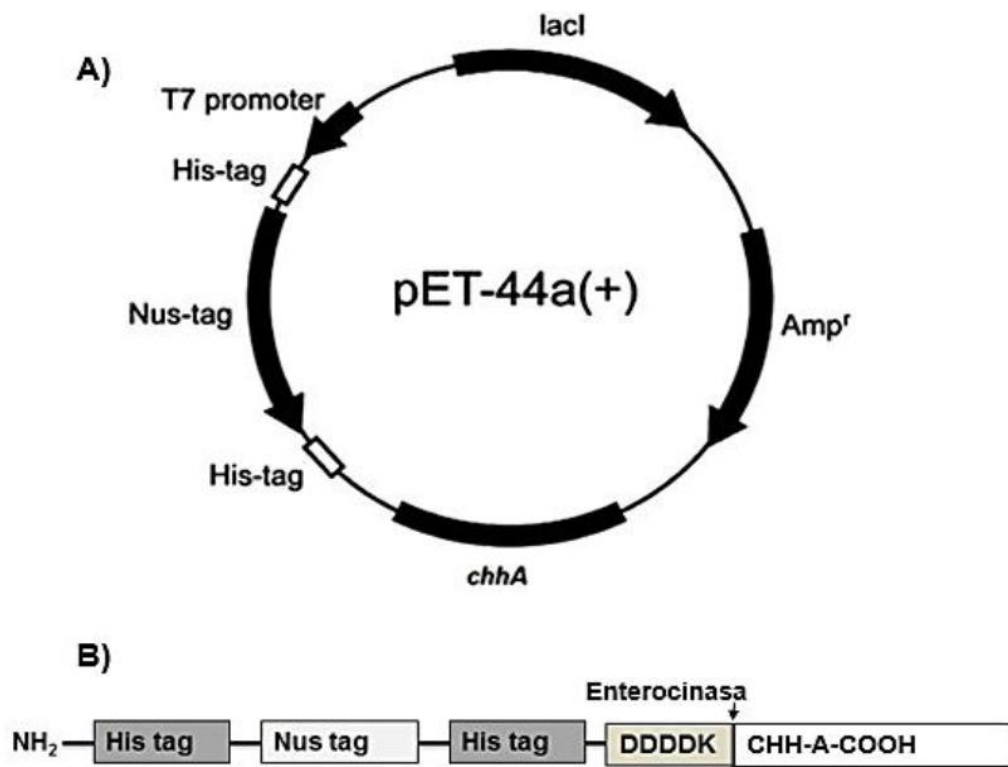


Figura 6. Vector de expresión pET-44a(+). A: Esquema del vector de expresión pET-44a(+). B: CHH-A expresada como proteína de fusión. Modificado de pET-44a(+) vector (Novagen, cat: 71122-3). Tomado de Arredondo-Espinoza (2014).

Cinética de crecimiento

Para realizar la cinética de crecimiento, la cepa transformada se sembró en placas Petri con medio Luria Bertani (LB) agar (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, agar 1.5%, pH 7.0) con ampicilina (100 mg/ml) y se dejó incubando a 37°C toda la noche, hasta observar colonias aisladas. Se tomó una asada de una colonia fresca y se inoculó en 5 ml de medio líquido LB (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, pH 7.0) con ampicilina (100 mg/ml). Este cultivo fue puesto en incubación a 37°C toda la noche con agitación de 200 rpm. Posteriormente se tomaron 50 µl para inocular 50 ml de medio LB con ampicilina en la misma concentración en matraces Erlenmeyer bafleados con capacidad de 250 ml, por triplicado. Los cultivos se dejaron en incubación a 37°C y con 200 rpm de agitación hasta que alcanzaron una densidad óptica de 0.05 a 600 nm (OD₆₀₀). Se tomaron alícuotas de 1 ml cada hora de cada cultivo para realizar mediciones de absorbancia en un espectrofotómetro Multiskan GO (ThermoScientific) a 600 nm hasta que se alcanzó la fase estacionaria.

Propiedades físicas y químicas

Tomando como base la estructura del vector pET-44a(+) de Novagen (Cat: 71122-3), la secuencia de la proteína NusA y la secuencia de aminoácidos reportada anteriormente por Lago-Lestón et al (2007) de la neurohormona CHH-A, así como la secuencia de nucleótidos optimizada anteriormente (Arredondo-Espinoza, 2014) se elaboró un análisis predictivo de las propiedades fisicoquímicas del péptido expresado. Se consultó la secuencia del gen *nusA* de *E. coli* K-12 en la base de datos EcoGene (EcoGene Accession Number: EG10665. Fecha de acceso: 5 de mayo de 2016) para obtener la secuencia de

aminoácidos y de nucleótidos completa. Los datos de la secuencia teórica del péptido expresado fueron analizados haciendo uso de la herramienta ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>). Se estimó el peso molecular, punto isoeléctrico, número de residuos cargados negativamente (Asp + Glu) y positivamente (Arg + Lys), vida media, índice de inestabilidad, índice alifático y gran promedio de hidropaticidad (GRAVY). Se incluyeron también los 74 aminoácidos que corresponden a la secuencia de CHH-A y se compararon los resultados obtenidos.

Inducción de transformantes

A partir de una colonia fresca se inoculó un volumen de 5 ml de medio LB con ampicilina (100mg/ml). Este se dejó incubando toda la noche a 37°C con 200 rpm de agitación. Posteriormente se utilizaron 50 µl de este cultivo para inocular 50 ml del mismo medio con la misma concentración de ampicilina. La incubación se llevó a cabo a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una OD₆₀₀ de 0.5. Una vez alcanzado este valor de absorbancia se realizaron cultivos en diferentes condiciones para encontrar las de mejor expresión de proteína recombinante. Se utilizaron dos temperaturas de incubación (37°C y 30°C) y se adicionaron dos diferentes concentraciones de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (0.1 y 1.0mM). Se usaron dos tiempos de incubación a partir de la inducción, los cuales fueron de 6 h y 12 h. Para cada condición de temperatura, concentración de IPTG y tiempo de incubación se preparó un matraz con 50 ml de cultivo. Como control negativo se usaron cultivos sin inductor en ambos tiempos de incubación y temperaturas. Al final de cada tiempo de incubación se centrifugaron 25 ml de cultivo en dos tubos cónicos estériles con capacidad de 50 ml a 13,000 x g durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Los pellets se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

Preparación de las muestras

Para lisar las células bacterianas el pellet correspondiente a 25 ml de cultivo se resuspendió en buffer salino de fosfatos (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 12 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM) con 0.02% de lisozima (PBS 1X, pH 7.4) en el volumen correspondiente al 8% del volumen de cultivo resuspendido, es decir, 2 ml de PBS 1X. Esta preparación fue incubada a 37°C por una hora y otra hora más a -80°C. La suspensión fue sonicada durante 150 segundos en total, con periodos de 15 s de sonicación y 15 s de pausa, siendo un total de 15 periodos con una amplitud del 70%. La mezcla sonicada se centrifugó a 4500 x g durante 10 minutos a 4°C (Nagai et al, 2009). Las muestras con el sobrenadante y el pellet fueron almacenadas a -20°C. Estas representan a las fracciones solubles e insolubles, respectivamente.

Análisis de proteínas en geles de Tricina-SDS PAGE

Para preparar las muestras de los lisados celulares para su análisis mediante la técnica de Tricina-SDS PAGE estas fueron resuspendidas en Sample Buffer 2X (Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 4%, glicerol 20%, β-mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0.004%). Para analizar las fracciones insolubles se tomó una asada del pellet obtenido después de la sonicación y se resuspendió en 100 μl de agua destilada, de la cual se tomaron 5 μl que a su vez fueron resuspendidos en 5 μl de Sample Buffer 2X. Las muestras fueron desnaturalizadas a 95°C durante 5 minutos, colocadas en hielo y posteriormente analizadas en geles de poliacrilamida al 10% con tricina (Schägger, 2006). Como condiciones de corrida se usó amperaje constante a 50 mA, un voltaje máximo de 150 V y las muestras se dejaron correr hasta que el azul de bromofenol del buffer de carga alcanzó la base del gel.

Finalizada la electroforesis, se procedió a teñir el gel con azul de Coomassie blue silver G250 stain (Candiano et al, 2004) y se destiñó con agua destilada hasta obtener el contraste deseado.

Inmunodetección de CHH-A por Western Blot

Para determinar las condiciones de mayor producción de hormona recombinante CHH-A se realizó una electroforesis en geles de Tricina-SDS PAGE siguiendo el protocolo descrito anteriormente. El anticuerpo monoclonal utilizado fue anti-His₆-HRP de Roche (4000 U/ml), el cual tiene como epítipo la etiqueta de polihistidinas.

Cuando la electroforesis concluyó, el gel concentrador fue colocado en buffer de transferencia semiseca Towbin 1X (Tris Base 250 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, pH 8.3). La electrotransferencia se llevó a cabo colocando el gel entre 3 piezas de papel filtro junto con una membrana de nitrocelulosa Trans-Blot[®] Transfer Medium (Bio-Rad) de 0.45 µm. La transferencia se realizó con amperaje constante de 200 mA y voltaje por debajo de los 20 V en el sistema de electrotransferencia semiseca durante una hora.

Una vez llevada a cabo la transferencia semiseca, se procedió a incubar la membrana de nitrocelulosa en solución bloqueadora PBST (PBS 1X, Tween 20 0.05%, pH 7.4) con leche descremada (Svelty) al 5% por 2 horas a temperatura ambiente con agitación moderada. La solución bloqueadora fue descartada y la membrana fue lavada por cinco minutos con PBST. Esto para proceder con la incubación en solución del anticuerpo (1:5000) con PBST y leche descremada al 1% durante dos horas a temperatura ambiente, con agitación moderada. La solución fue retirada mediante cuatro lavados de 15 min con PBST. La detección se hizo por quimioluminiscencia utilizando el kit Super Signal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) incubando las soluciones del kit en una

razón de 1:1 durante 5 minutos y visualizando usando un transiluminador ChemiDoc MP (Bio-Rad).

Purificación por cromatografía de afinidad

Las proteínas recombinantes con etiqueta de polihistidinas (His-tag) son purificadas mediante el uso de una columna de afinidad de Níquel-Ácido Nitrilotriacético (Ni-NTA). El NTA tiene cuatro sitios quelantes para los iones de níquel, por medio de los cuales puede inmovilizar los iones Ni^{+2} en la matriz, que poseen una fuerte afinidad por las cadenas de polihistidinas. Para este fin se utilizó el kit ProBond Purification System (Invitrogen). A la columna de purificación de 10 ml capacidad, se añadió 1.5 ml de la resina ProBond Nickel-Chelating (Invitrogen) y posteriormente se resuspendió usando 6 ml agua desionizada estéril. El sobrenadante se dejó asentar por gravedad en la columna. Posteriormente se añadieron 6 ml de Buffer de Unión Nativo 1X ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0), el cual fue descartado por elución y se volvió a añadir en la misma cantidad.

Para preparar la muestras, éstas fueron descongeladas y centrifugadas a 10,000 x g durante 20 min a 4°C, para descartar el sobrenadante. Se resuspendió el pellet resultante en 250 μl de PBS IX y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Se tomó una alícuota de 10 μl , la cual fue almacenada a -20°C para análisis posteriores.

La muestra se transfirió por gravedad a la columna, de la cual se eliminó el Buffer de Unión previamente añadido. La muestra fue pasada una vez por la columna y se almacenó a -20°C para su posterior análisis. Se realizó un lavado de 24 ml con Buffer de Lavado (Imidazol 20mM, NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0) y se tomó una alícuota de 1 ml para su posterior análisis.

Las proteínas de la muestra fueron eluidas con 1 ml de Buffer de Elución (Imidazol 250 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0) que fue recuperado hasta que se alcanzaron 6 ml de solución añadida. Para su análisis mediante SDS PAGE, se tomaron 5 µl de muestra y se resuspendieron en 5 µl de Sample Buffer 2X. Estas muestras, junto con las que se tomaron durante el proceso se analizaron en geles de Tricina-SDS PAGE al 10%.

Para analizar las muestras de los lavados, se tomó la muestra previamente colectada y se añadieron 150 µl de ácido tricloroacético al 100% y fueron incubadas toda la noche a 4°C. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 4°C, 13,000 x g y 20 minutos, se descartó el sobrenadante, se añadió 1 ml de acetona fría y nuevamente fueron centrifugadas en las mismas condiciones. La acetona fue descartada y el pellet resultante resuspendido en 10 µl de Sample Buffer 2X.

Diálisis de la proteína recombinante

Dado que la proteína recombinante se encontraba en PBS 1X y este puede interferir con la actividad de la enterocinasa al momento de realizar la digestión, fue necesario realizar la diálisis en un buffer en el cual pudiera llevarse a cabo. El imidazol también es inhibidor de la reacción de enterocinasa en una concentración mayor a 50 mM y en el buffer de elución se encuentra presente en una concentración de 250 mM, por lo que fue necesario removerlo. Por consiguiente, se dializó la proteína en contra de Buffer de Reacción 1X (Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 1 mM, Tween 20 0.1%). Para este fin las muestras correspondientes a las eluciones 2 y 3 de tres condiciones diferentes en donde se había observado la banda de interés (IPTG 0.1 mM, 6 horas de incubación a 30°C; IPTG 1 mM, 12 horas de incubación a 30°C y 1 mM de IPTG, 12 de incubación a 30°C) fueron

inyectadas en un casete de diálisis Slide-A-Lyzer™ de Thermo Fisher Scientific de 3.5K MWCO y capacidad de 3 ml, previamente hidratado en el buffer mencionado anteriormente. La diálisis fue llevada a cabo durante dos horas en 1 L de Buffer de Reacción 1X a temperatura ambiente con agitación moderada. Se realizó un cambio de buffer pasado este tiempo y después de transcurridas dos horas más se cambió el buffer nuevamente, esta vez para dejarse con agitación moderada a 4°C toda la noche. Después de este tiempo se recuperaron aproximadamente 3 ml de muestra, los cuales fueron almacenados a -20°C. Posteriormente, la proteína recombinante dializada fue analizada mediante un gel de Tricina-SDS PAGE al 10%.

Cuantificación de proteínas

Para conocer la cantidad de proteína recombinante obtenida de la diálisis, esta se cuantificó usando dos métodos colorimétricos mediante el uso de dos kits: Pierce™ BCA Protein Assay y el kit de Bio-Rad Protein Assay. El primero se basa en el método del ácido bicinonínico (BCA) mientras que el segundo se basa en el método de Bradford. Para usar ambos kits se siguieron las instrucciones de los fabricantes empleando estándares de suero de albúmina bovino (Promega). Se usaron concentraciones de 0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, y 2000 µg/ml de albúmina para realizar la curva estándar con el kit de Pierce y concentraciones de 0, 50, 125, 250 y 500 µg/ml para el kit de Bio-Rad. Asimismo, se utilizaron los protocolos descritos para microplaca. Se colocaron 20 µl de muestras y estándares por triplicado en placas de 96 pozos. Las placas fueron leídas en un espectrofotómetro con lector de placas Multiskan GO (Thermo Scientific) a 562 nm para el kit de Pierce y a 595 nm para el kit de Bio-Rad.

Remoción del N-terminal adicional

Una vez que se tuvo la proteína de fusión purificada y cuantificada se procedió a realizar la eliminación de la región N-terminal adicional para dejar la hormona recombinante sin aminoácidos extra. La proteína de fusión recombinante purificada tiene el sitio de reconocimiento de la enzima enterocinasa (DDDDK), por lo tanto se llevaron a cabo digestiones con dicha enzima. Con base a la concentración de proteínas, se prepararon dos reacciones con dos enzimas comerciales distintas: la enterocinasa de Roche (0.3 mg/ml), la cual es purificada de intestino de becerro y la enterocinasa EK Max de Invitrogen (1U/ml), que es una enzima recombinante purificada de la levadura *P. pastoris* consistente en la subunidad catalítica de la holoenzima. Para llevar a cabo las reacciones se siguieron las instrucciones de los fabricantes.

Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente, utilizando 25 µg de proteína de fusión (62.5 µl), con tiempos de incubación de 3 h y 6 h. Como control negativo se utilizó proteína de fusión sin enzima en las preparaciones realizadas. Las muestras fueron visualizadas en geles de SDS-PAGE teñidos por azul de Coomassie. También se analizaron las muestras mediante Western Blot usando los anticuerpos anti-His₆-HRP (4000 U/ml) y anti-CHH-A (2.709 mg/ml).

Cabe señalar que los anticuerpos anti-CHH-A policlonales de conejo fueron elaborados por la compañía GenScript (2013). Para realizar el diseño se utilizó un péptido sintético de 14 aminoácidos que a su vez fue diseñado a partir de la región del N-terminal de la CHH-A (Balderas-González, 2014). El protocolo utilizado es el mismo descrito anteriormente con respecto a la electroforesis de Tricina-SDS PAGE (12%) y la electrotransferencia semiseca.

La dilución con el anticuerpo fue de 1:200 en PBST-Svelty 1%, la membrana se dejó en incubación toda la noche a 4°C con agitación moderada y se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBST. Posteriormente se adicionó un segundo anticuerpo, el Anti-rabbit IgG Peroxidase antibody (5 mg/ml) (Sigma Aldrich), el cual es de conejo producido en cabra, usando una dilución de 1:5000 en PBST-Svelty 1% y una incubación a temperatura ambiente durante 4 horas. El revelado se realizó usando quimioluminiscencia mediante el kit mencionado anteriormente.

Resultados y discusión

Cinética de crecimiento

A partir de las lecturas de absorbancia a 600 nm se construyó una gráfica para obtener la curva de crecimiento de la cepa *E. coli* BL21 Star (DE3) CHH-A (Fig.7).

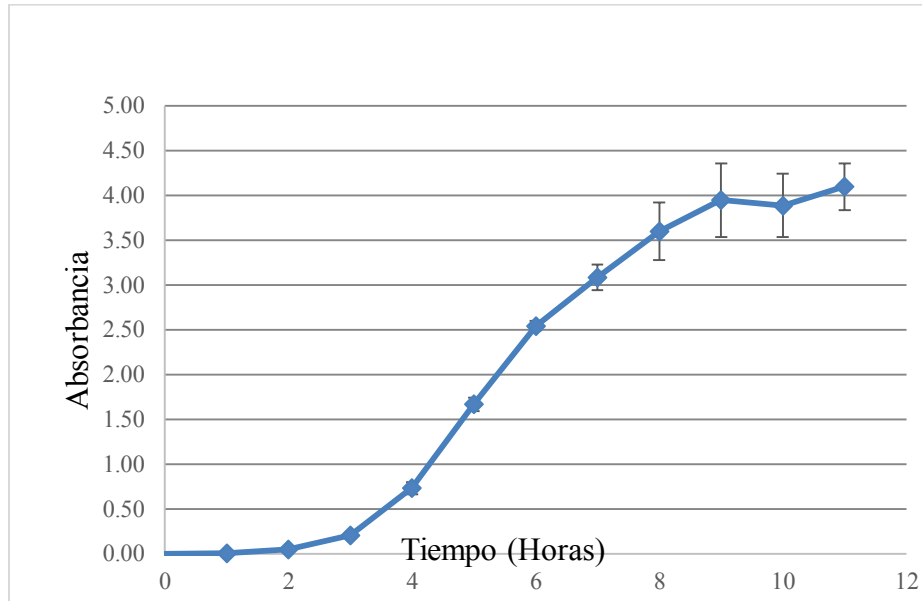


Figura 7. Cinética de crecimiento de *E. coli* BL21 Star (DE3) CHH-A hecha con los promedios de las lecturas de los tres matraces inoculados. Los puntos representan las lecturas realizadas \pm el error.

Como se aprecia en la gráfica de la curva de crecimiento (Fig. 7), la fase estacionaria se alcanzó a las nueve horas después de la inoculación. De esta misma forma se determinó que a las 3 horas (absorbancia de 0.5) se llevaría a cabo el inicio de la inducción con IPTG en cultivos posteriores.

Propiedades físicas y químicas

Para conocer más acerca de las propiedades de la proteína de fusión expresada se realizó una estimación de diversos parámetros usando la herramienta ProtParam y se hizo una comparación con la secuencia nativa de CHH-A (Tabla 1). Esto se logró analizando la secuencia completa de aminoácidos de ambos péptidos, que se puede consultar en los anexos. La secuencia resumida se encuentra en la Figura 8.

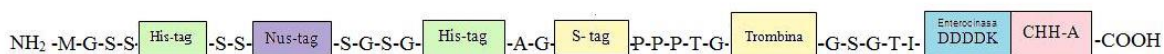


Figura 8. Esquema completo de la proteína de fusión recombinante NusA-CHH-A expresada por la cepa *E. coli* BL21 Star (DE3) CHH-A.

Es importante observar como el punto isoelectrico de la proteína de fusión es menor que el de la neurohormona nativa dado el aumento de residuos de aminoácidos. El punto isoelectrico calculado con ProtParam concuerda con el reportado por Liu et al (2014) para la neurohormona CHH- A.

El cálculo de la vida media estimada se basa en los aminoácidos que se encuentran en el N-terminal de cada proteína, en este caso no varía entre ambas proteínas dentro de lo que es el citoplasma bacteriano.

El índice alifático es un parámetro que está definido por el volumen ocupado por las cadenas alifáticas de los aminoácidos alanina, valina, leucina e isoleucina. Se debe de tomar como un valor positivo en términos de termoestabilidad de proteínas globulares.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas estimadas con la herramienta ProtParam para la proteína de fusión expresada.

Propiedades	NusA-CHH-A	CHH-A
Número de aminoácidos	632	74
Peso molecular (kDa)	70.32	8.82
Punto isoeléctrico	4.87	6.78
Residuos con carga positiva (Asp +Glu)	115	10
Residuos con carga negativa (Arg + Lys)	72	10
Vida media en bacterias (<i>in vivo</i>)	> 10 h	>10
Índice alifático	87.52	70.95
Índice de inestabilidad	40.07	77.32
Gran promedio de hidropaticidad	-0.406	-0.500

Una proteína con índice de inestabilidad menor a 40 es considerada estable (Gasteiger et al, 2005). Esto sugiere que la proteína de fusión NusA-CHH-A es estable *in vitro*. En cambio, si se analiza solamente la secuencia de 74 aminoácidos correspondiente a CHH-A, esta tiene un índice de estabilidad de 77.32, lo que confirma que NusA brinda estabilidad al neuropéptido recombinante.

El gran promedio de hidropaticidad es un indicador de la hidrofobicidad de una cadena polipeptídica. NusA-CHH-A es más hidrófoba que CHH-A en concordancia con el aumento de residuos alifáticos en la proteína.

Inducción de transformantes

Las fracciones solubles e insolubles obtenidas de dos condiciones de temperatura (30°C y 37°C), dos concentraciones de IPTG (0.1 mM y 1 mM) y dos tiempos de incubación (6 y 12 horas) fueron analizadas mediante geles de Tricina-SDS PAGE y Western Blot para visualizar y detectar la proteína de fusión, la cual tiene un peso de 70.32 kDa, dado el peso molecular de la Nus-tag y del neuropéptido recombinante. La proteína NusA contiene 495 aa (Novagen, cat 71122-3) y pesa de 54.8 kDa. La neurohormona CHH-A nativa es de 74 aa de longitud y tiene un peso teórico de 8.76 kDa (Lago-Lestón et al, 2007). Los aminoácidos adicionales, entre los cuales se incluyen las secuencias His-tag y el sitio de reconocimiento de enterocinasa, pesan alrededor de 6.62 kDa según reveló la herramienta ProtParam.

En el análisis de los sobrenadantes y las fracciones insolubles mediante los geles de Tricina-SDS PAGE no fue posible distinguir claramente la banda del tamaño esperado (70 kDa) por la gran cantidad de proteínas expresadas por *E. coli* en ambas condiciones de temperatura (Fig.9).

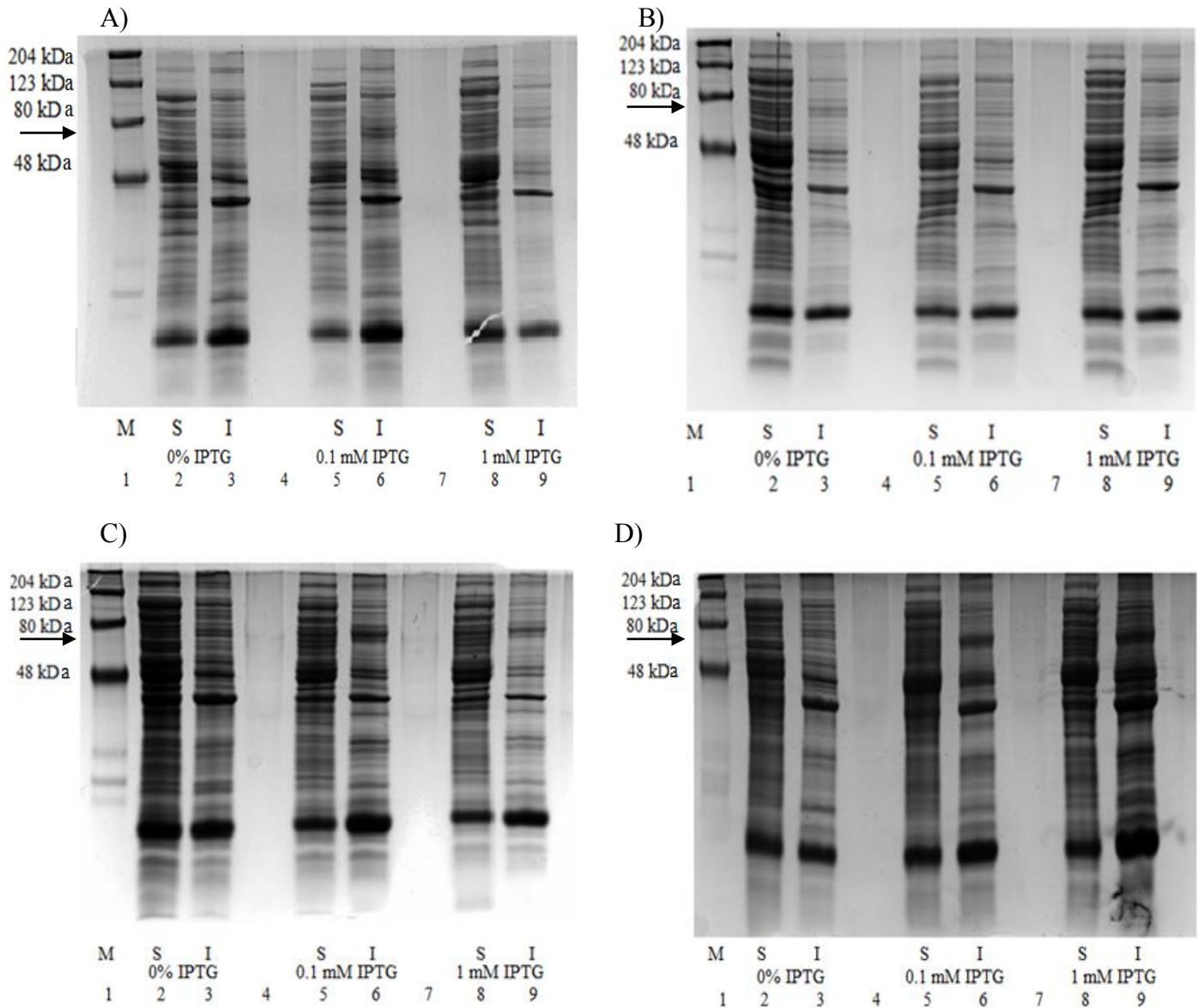
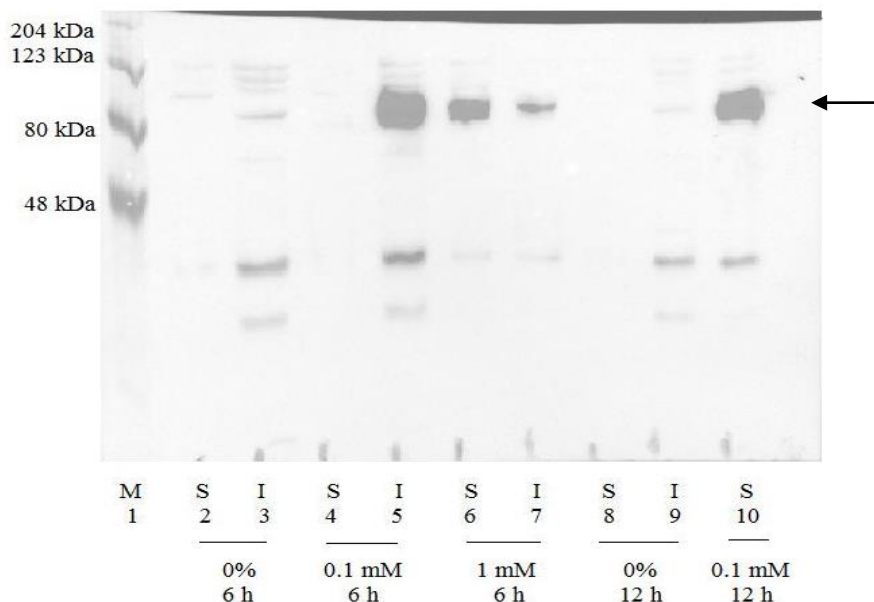


Figura 9. Comparación entre la expresión de proteínas a 37°C (A y B) y a 30°C (C y D) de las fracciones solubles e insolubles en geles de Tricina-SDS PAGE (10%) teñidos por Coomassie. A y C: 6 h de incubación. B y D: 12 h de incubación. M: Marcador de peso molecular Prestained SDS PAGE Standards High Range (Bio-Rad). Carriles 2, 5 y 8: fracciones solubles (S). Carriles 3, 6 y 9: Fracciones insolubles (I), ambos de los lisados de los cultivos inducidos con 0, 0.1 y 1 mM de IPTG, respectivamente. Las flechas indican el lugar donde se esperaba la banda de interés.

Con el objeto de diferenciar la hormona recombinante de las otras proteínas observadas en el gel de Coomassie tanto en las muestras solubles como insolubles, las muestras fueron

analizadas mediante Western Blot usando el anticuerpo anti-His₆-HRP (Fig.10). Al comprobarse la expresión de la proteína recombinante en los sobrenadantes de ambas condiciones de temperatura, se procedió a analizar estos de manera individual mediante las mismas técnicas en las mismas condiciones. El análisis por Western Blot mostró que en ausencia del inductor (IPTG) no hubo expresión de proteínas en las muestras y que la expresión de la proteína de interés se llevó a cabo tanto con 0.1 mM como con 1 mM de IPTG (Figura 10-B).

A)



B)

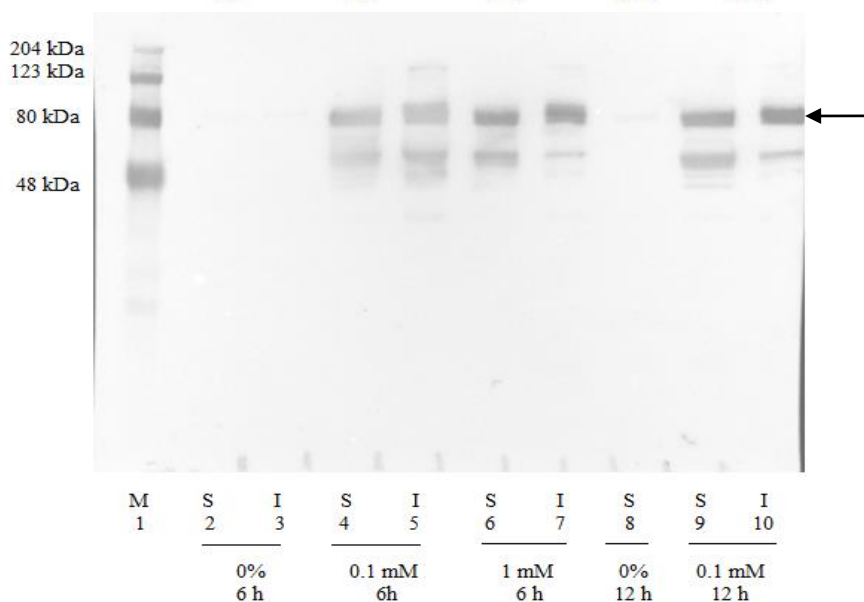


Figura 10. Análisis de las muestras mediante Western Blot. A: Condiciones a 37°C. B: Condiciones a 30°C. M: Marcador de peso molecular Prestained SDS PAGE Standards High Range (Bio-Rad). Carriles 2, 4 y 6: Fracciones solubles (S) de las concentraciones de 0%, 0.1 mM y 1 mM de IPTG a 6 horas de incubación, respectivamente. Carriles 3, 5 y 7: Fracciones insolubles (I) a 0%, 0.1 y 1 mM de concentración de IPTG a 6 horas de incubación, respectivamente. Carril 8: Fracción soluble, 12 horas de incubación, 0% IPTG. En A: Carril 9: Fracción insoluble, 0 % IPTG, 12 h. Carril 10: Fracción soluble, 0.1 mM IPTG, 12 h. En B: Carriles 9 y 10: Fracciones solubles e insolubles, respectivamente, 0.1 mM de IPTG, 12 horas. Las flechas indican la banda de interés.

Los resultados mostraron una mayor expresión de la proteína esperada de 70 kDa en todas las muestras obtenidas de los ensayos realizados a 30°C en comparación con las de 37°C, tanto con 6 h como con 12 h de incubación y en las fases solubles e insolubles. Sin embargo, en especial, se observó una mayor expresión en las muestras solubles de los cultivos a 30°C incubados por 12 h con la adición de 1 mM de IPTG (Fig. 11-B). Asimismo, el anticuerpo anti-His₆-HRP detectó una proteína adicional de alrededor de 48 kDa tanto en las fracciones insolubles como en las solubles (Figs. 10 y 11). Con el fin de obtener una mayor cantidad de proteína para los próximos análisis se purificaron todas las muestras obtenidas de las fracciones solubles en la condición de 30°C.

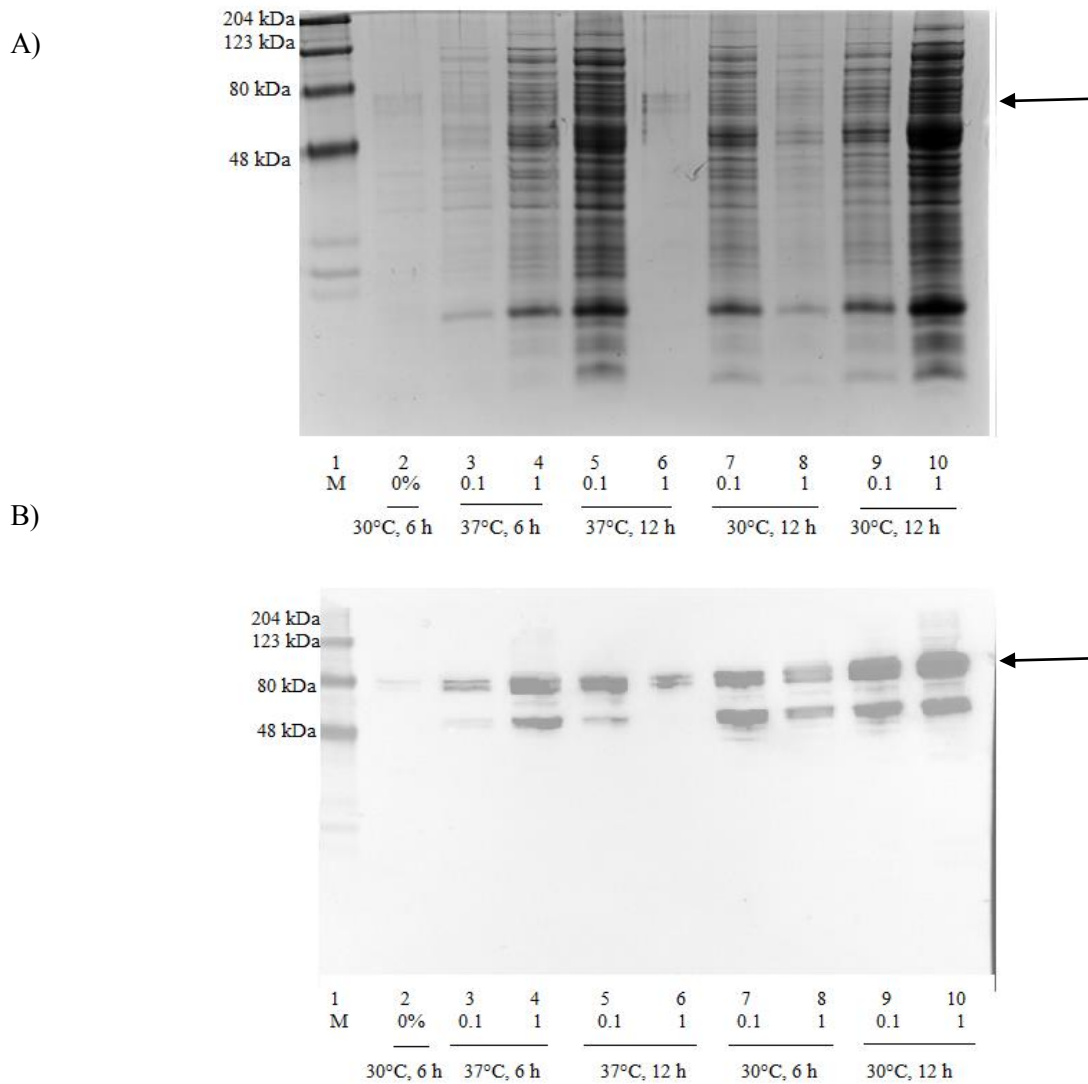


Figura 11. Visualización de las proteínas encontradas en los sobrenadantes mediante A: Gel de Tricina-SDS PAGE (10%) B: Western Blot. En ambas: M, marcador de peso molecular Prestained SDS PAGE Standards High Range, (Bio-Rad). Carril 2: 0% IPTG, tiempo de incubación de 6 h a 30°C. Carriles 3 y 4: Condiciones de temperatura a 37°C, 6 h, 0.1 y 1 mM IPTG, respectivamente. Carriles 5 y 6: 0.1 y 1 mM IPTG, 12 h de incubación y 37°C. Carriles 7 y 8: 0.1 y 1 mM IPTG, 6 h, 30°C. Carriles 9 y 10: 0.1 mM y 1 mM IPTG, 12 h de incubación, 30°C.

Las condiciones de mayor expresión concuerdan con las reportadas por Nagai et al (2009), quienes probaron temperaturas de 26.5°C, 30°C y 37°C así como concentraciones de IPTG de 0.1, 1, 1.5 y 2 mM para expresar el neuropéptido Pej-SGP-VII. Su mejor condición de

expresión fue en la cepa de *E. coli* BL21 Star (DE3), con una concentración de IPTG de 1 mM y a 30°C.

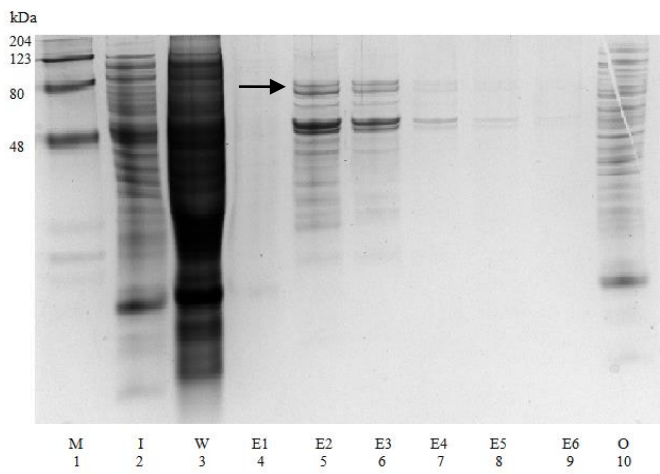
Al observarse expresión significativa en las fracciones solubles, no fue necesario llevar a cabo la disolución de cuerpos de inclusión de la parte insoluble y posteriores reacciones de repliegamiento de la proteína de fusión NusA-CHH-A. En ocasiones, para expresar péptidos recombinantes de la familia CHH se requiere llevar a cabo esta clase de reacciones para recuperar la proteína de las fracciones insolubles, como ha ocurrido con los neuropéptidos Hoa-VIH de la langosta americana *Homarus americanus* (Ohira et al, 2006), las neurohormonas Mar-CHH -2 y Mar-CHH-L del camarón gigante de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii* (Ohira et al, 2006) y una MIH recombinante del cangrejo azul *Callinectes sapidus* (Nakatsuji et al, 2006). Todas estos péptidos fueron expresados en distintas cepas de *E. coli* BL21 (DE3) en vectores pET (pET-32 a en el caso de las neurohormonas expresadas por Ohira y colaboradores y pET-101 usado por Nakatsuji y colaboradores).

Purificación por cromatografía de afinidad

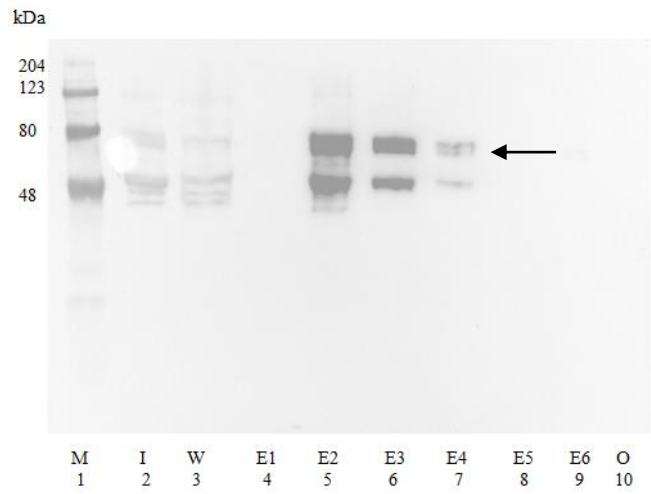
Los resultados de la purificación por afinidad revelaron la obtención de dos bandas principales de proteínas en los geles de Tricina-SDS PAGE (Fig.12-A, C, E, G) las cuales fueron detectadas por el anticuerpo monoclonal anti-His₆-HRP en el Western Blot (Fig.12-B, D, F, H). Como se observa en los Western Blot, una de las bandas obtenidas se encuentra alrededor de los 70 kDa, que corresponde con el peso molecular esperado y la otra se encuentra cercana a los 48 kDa. Esto se observó en todas las condiciones evaluadas. La observación de diversas bandas adicionales en los geles de Tricina-SDS PAGE teñidos con azul de Coomassie sugiere que se obtuvo una purificación parcial de la proteína recombinante. La mayor cantidad de proteína de interés se obtuvo en la segunda y la tercera

elución de cada purificación, por lo tanto fueron las que se utilizaron para llevar a cabo la diálisis.

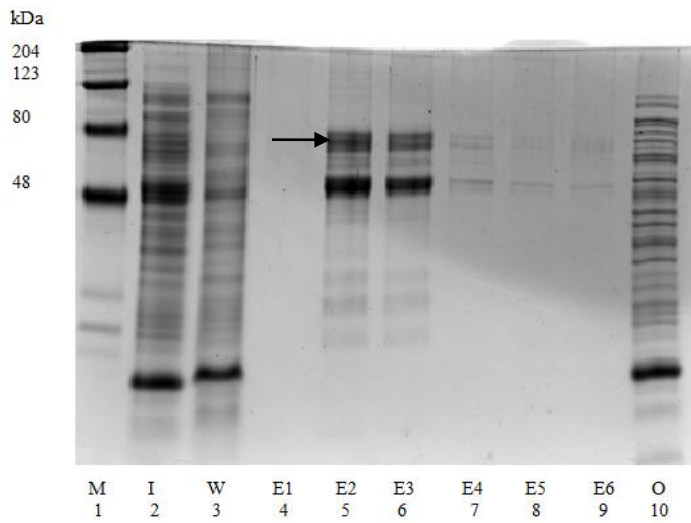
A)



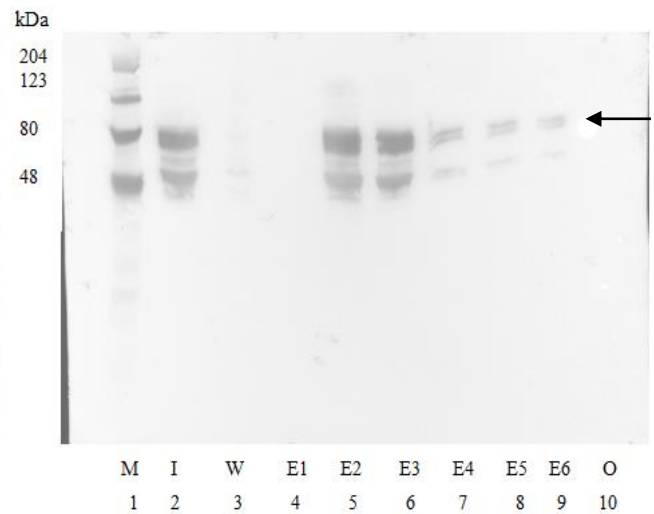
B)



C)



D)



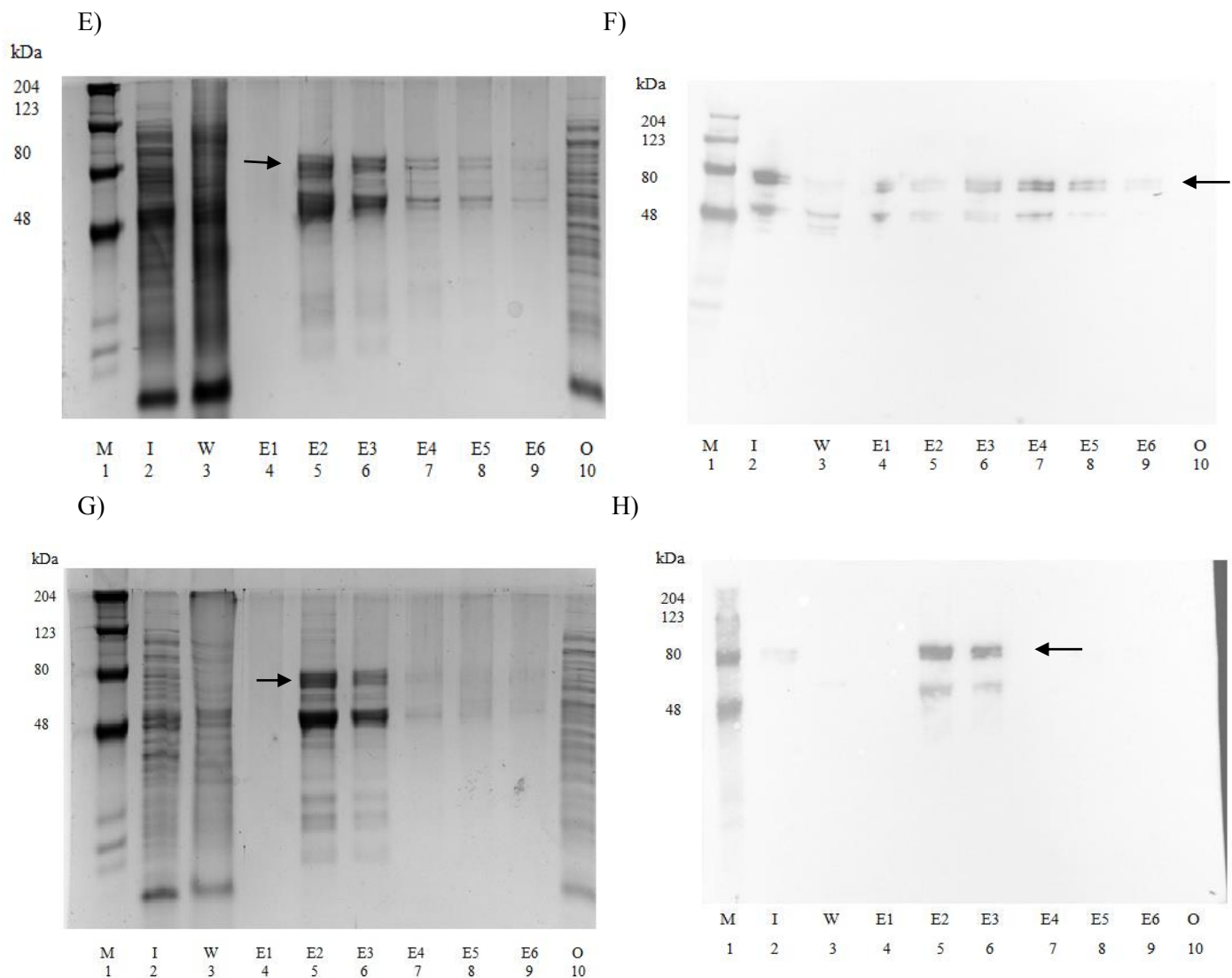


Figura 12. Análisis de la purificación de proteína recombinante mediante geles de Tricina - SDS PAGE (A, C, E, G) y Western Blot (B, D, F, H).

A y B: Proteínas purificadas de la condición 0.1 mM IPTG, 6 h, 30°C. C y D: Purificación correspondiente a la condición 0.1 mM IPTG, 12 h, 30°C. E y F: Condición de 1 mM IPTG, 6 h, 30°C. G y H: Condición de 1 mM IPTG, 12 h y 30°C. En todas: M, marcador de peso molecular Prestained SDS PAGE Standards High Range, de Bio-Rad, I es la muestra de entrada, W representa las proteínas presentes en el lavado, las eluciones (1-6) van de los carriles 4-9 y O es la salida de la muestra.

Diálisis

Las proteínas dializadas y analizadas en un gel de Tricina-SDS PAGE (10%) no mostraron signos de degradación o pérdida por la diálisis. Para la diálisis se eligieron las eluciones 2 y 3 de las condiciones de IPTG 0.1 mM, 6 h; IPTG 0.1 mM, 12 h e IPTG 1mM, 12 h, por lo que se juntaron para hacer una sola muestra. La condición de IPTG 1 mM a 6 h no fue colocada en el casete de diálisis debido a que en el Western Blot las bandas correspondientes a la elución 2 no fueron tan intensas como en el resto del análisis de las purificaciones y a que se detectó proteína recombinante en la elución 1 (Fig.12-F).

Una vez que se comprobó que las proteínas seguían en buen estado después de ser dializadas al observarse que no existía modificación alguna después de llevar a cabo este procedimiento, se procedió a cuantificar las proteínas totales en la muestra (Fig.13).

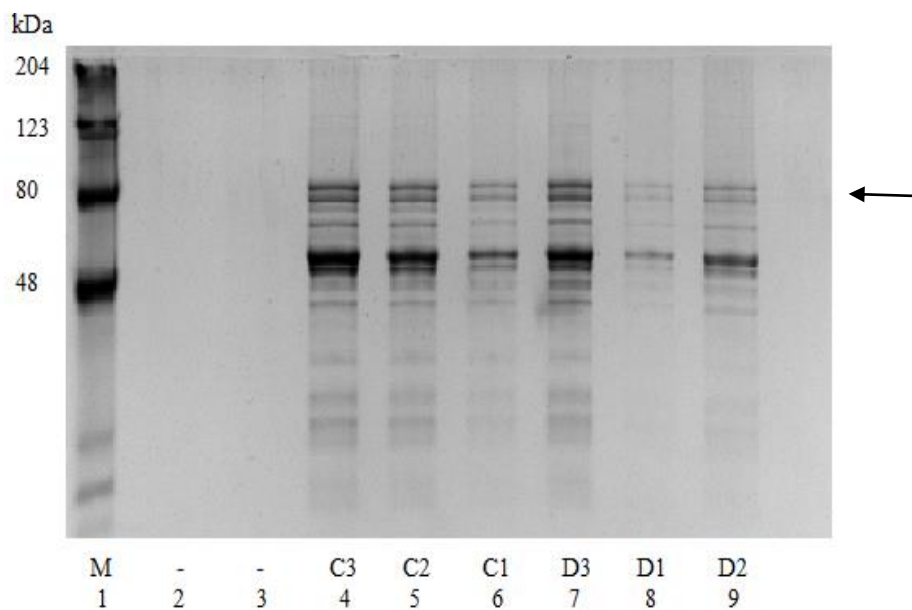


Figura 13. Comparación entre muestras sin dializar y dializadas en diferentes cantidades. M: marcador de peso molecular Prestained SDS PAGE Standards High Range de Bio-Rad. Carriles 4-6: Muestras sin dializar en volúmenes de 3, 2 y 1 μ l en PBS 1X. Carriles 7-9: Proteína dializada en volúmenes de 3, 1 y 2 μ l en Buffer de Reacción.

Cuantificación de proteínas

Se obtuvieron dos curvas de calibración con los estándares de albumina por cada método utilizado (Figs. 14 y 15). Las curvas fueron construidas con los promedios de las lecturas. La ecuación de regresión lineal obtenida de la curva de calibración por el método de Bradford arrojó una concentración de proteína de 474.50 $\mu\text{g/ml}$, mientras que la concentración obtenida por el método del BCA fue de 406.99 $\mu\text{g/ml}$. Dado que el coeficiente de determinación es más cercano a 1 en la curva de calibración construida mediante el uso de las lecturas adquiridas por el método del BCA, se usó el dato de concentración obtenido por la ecuación de regresión lineal de esta curva para calcular la cantidad de proteína recombinante requerida para realizar la digestión con enterocinasa.

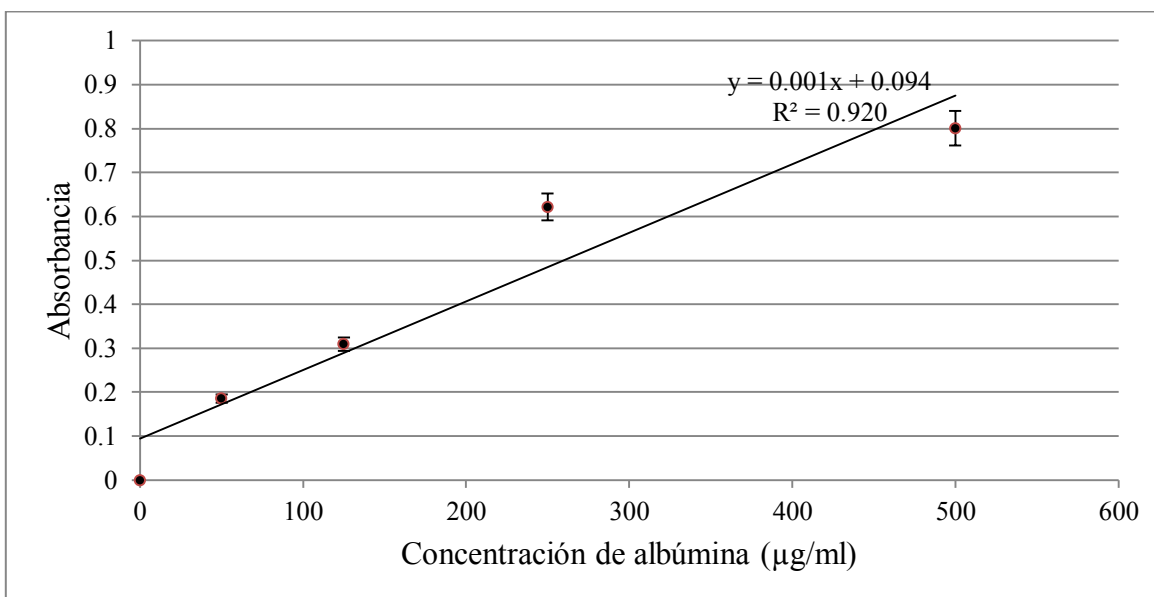


Figura 14. Curva de calibración para determinar concentración de proteínas obtenida mediante el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay). Los puntos representan el promedio de las lecturas \pm el error.

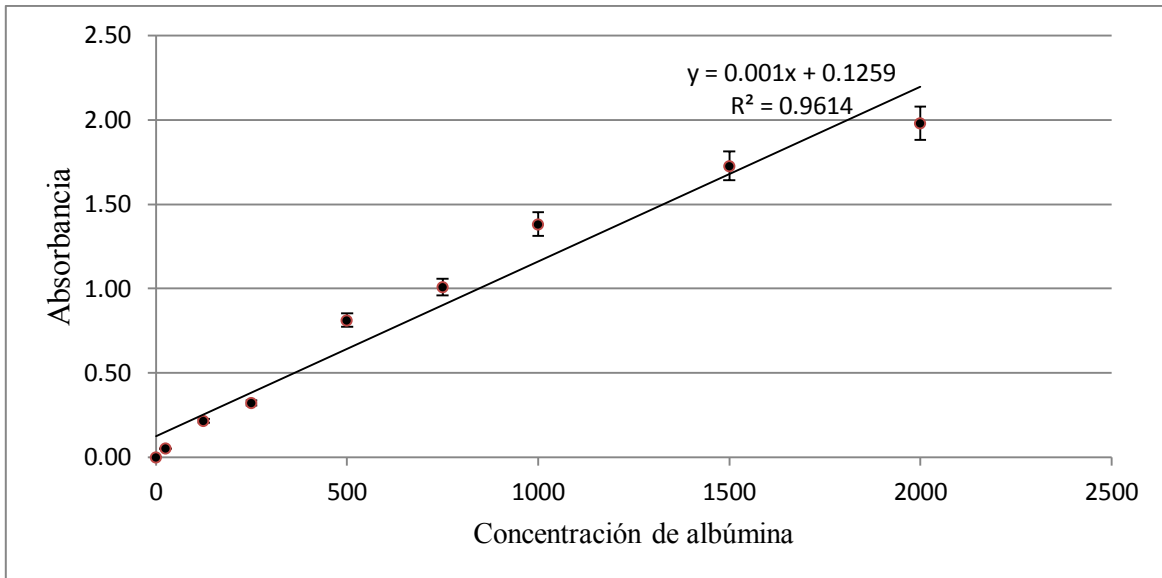


Figura 15. Curva de calibración de concentración de proteínas construida con los datos adquiridos por el método del BCA (Pierce™ BCA Protein Assay). Los puntos representan el promedio de las lecturas \pm el error.

Considerando que la cuantificación fue realizada a partir de una muestra original de 3 ml que a la vez se obtuvo de un total de 75 ml de cultivo, el rendimiento calculado fue de 16 mg/L. En comparación con el trabajo de Nagai et al (2009), el rendimiento obtenido en este trabajo fue bajo ya que ellos obtuvieron 120 mg/L de proteína. Aun así, el rendimiento fue similar al obtenido en experimentos previos realizados en nuestro grupo con *P. pastoris*. Balderas-González (2014) obtuvo un rendimiento de 12.19 mg/L de CHH-A sin aminoácidos adicionales una vez que este péptido fue purificado por RP-HPLC. Sin embargo, debe considerarse que la purificación de NusA-CHH-A fue parcial.

Digestión con enterocinasa

Al llevar a cabo la digestión usando menos volumen de enzima, se comprobó que la enterocinasa de Invitrogen es más eficiente que la enterocinasa de Roche (Fig. 16).

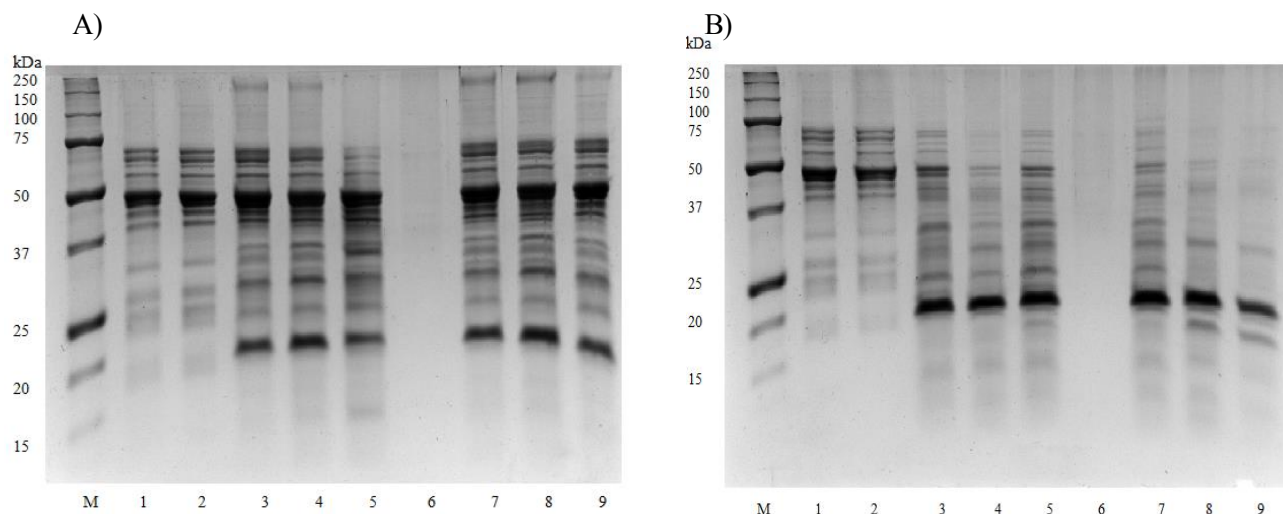


Figura 16. Geles de Tricina-SDS PAGE de las pruebas realizadas con las diferentes enterocinasas. En ambos: M es el marcador de peso molecular Precision Plus Protein Unstained Standards (Bio-Rad). Carriles 1 y 2: Controles negativos a 3 y 6 h respectivamente.

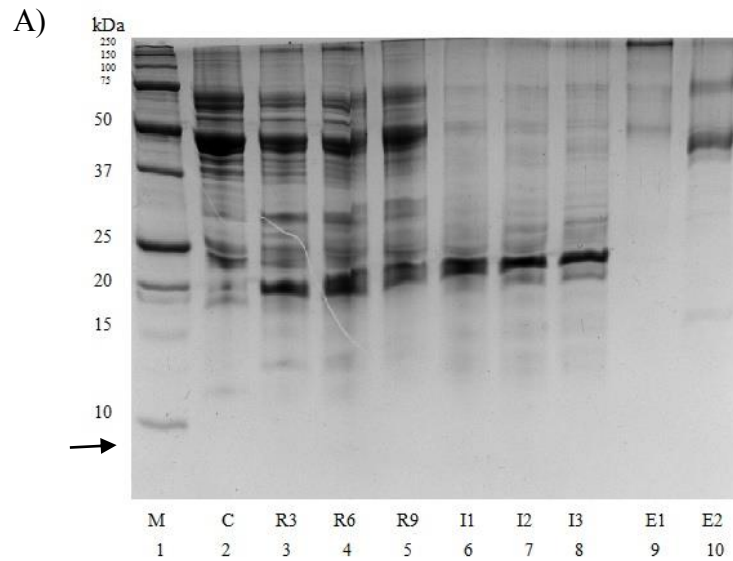
A: Enterocinasa de Roche. Carriles 3-5: Muestras con tiempo de incubación de 3 h con 3, 6 y 9 µl de enzima (0.9, 1.8 y 2.7 µg de enzima, respectivamente). Carriles: 7-9: Incubación de 6 h con las mismas cantidades de enzima.

B: Enterocinasa EK Max (Invitrogen). Carriles 3-5: Muestras con 3, 2 y 1 µl de enzima, (0.003, 0.002 y 0.001 U de enzima, respectivamente) en 3 h de incubación. Carriles 7-9: Incubación de 6 h con los mismos volúmenes de enzima.

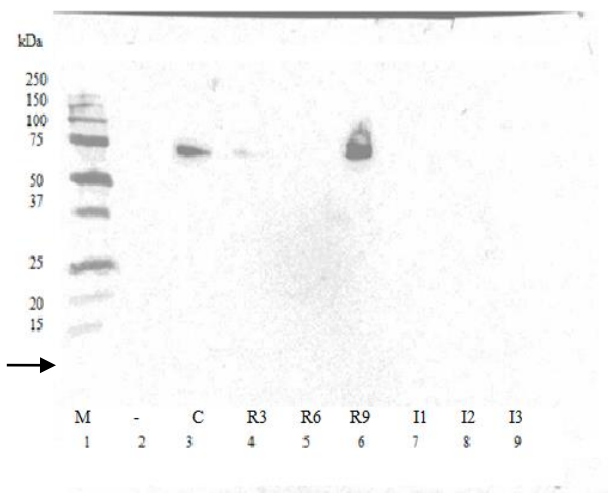
Una vez que se obtuvieron las digestiones y se comprobó que el tiempo de incubación no provocó diferencias significativas en la eficiencia de la actividad enzimática, estas fueron analizadas mediante un gel de Tricina-SDS PAGE. Esta vez se procuró que la banda del marcador molecular de 10 kDa fuese visible (Fig. 17-A). Este análisis confirmó que las fracciones digeridas observadas pesan alrededor de 20-22 kDa. Como el peso esperado de

la proteína recombinante sin el N-terminal es de alrededor de 9 kDa, se esperaba observar una banda de ese peso y otra de alrededor de 61.5 kDa, que corresponde mayoritariamente a la proteína de fusión NusA, sin embargo no fue de esta manera. Para hacer una detección más sensible del péptido buscado, se realizaron dos Western Blot con los anticuerpos anti-His₆-HRP y anti-CHH-A (Fig.17).

Como se puede observar en el Western Blot utilizando el anticuerpo anti-CHH-A (Fig.17-B) sólo se obtiene una banda de 70 kDa, lo que concuerda con el peso molecular esperado para la proteína de fusión completa NusA-CHH-A. Por otro lado, el fragmento de alrededor de 20-22 kD fue detectado por el anticuerpo anti-His₆-HRP lo que sugiere la presencia de la secuencia de histidinas en ese péptido (Fig.17-C).



B)



C)

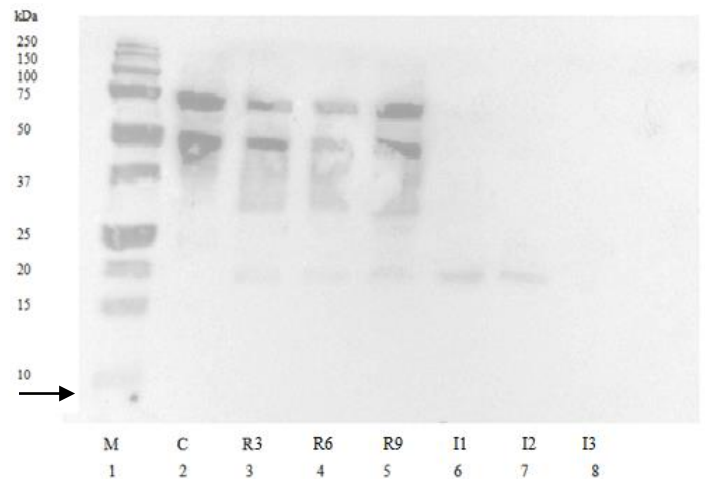


Figura 17. Análisis de las digestiones con enterocinasa con incubación de 6 horas. A: Gel de Tricina-SDS PAGE. B: Inmunodetección con anticuerpo anti-CHH-A. C: Inmunodetección con anticuerpo anti-His-6HRP. M: Marcador de peso molecular All Blue Precision Plus Standards (Bio-Rad). C: Proteína sin digerir. Carriles R3, R6 y R9: Digestiones con 3, 6, 9 μ l de enterocinasa de Roche (0.9, 1.8 y 2.7 μ g de enzima, respectivamente). Carriles I1, I2 e I3: Reacciones realizadas con la enterocinasa de Invitrogen en volúmenes de 1, 2 y 3 μ l (0.003, 0.002 y 0.001 U de enzima, respectivamente). En A: Los carriles 9 y 10 contienen 3 μ l de las enzimas utilizadas. E1: enterocinasa de Roche (0.9 μ g). E2: Enterocinasa de Invitrogen (0.003 U). Las flechas señalan el sitio donde se esperaba ver las bandas de interés.

La fracción de 48 kDa contiene la secuencia de histidinas que hace posible su purificación, pero no es detectada por el anticuerpo anti-CHH-A, por lo que no contiene la hormona. Los resultados sugieren que esta fracción podría estar siendo digerida inespecíficamente por la enterocinasa.

Sitios inespecíficos de digestión de enterocinasa

Los resultados de los análisis de las secuencias mostraron que existe un sitio de digestión inespecífico para enterocinasa dentro de la proteína recombinante expresada en este trabajo. El sustrato natural de la enterocinasa es el tripsinógeno y su función original es la activación de este para producir la forma activa de la tripsina en el intestino delgado, siendo la secuencia canónica reconocida DDDDK (Light y Janska, 1989). Se requieren de al menos dos residuos de ácido aspártico seguidos del residuo de lisina para el reconocimiento por parte de la enzima (Maroux et al, 1971). Existen sustituciones para el sitio de reconocimiento, identificadas por Light, et al (1980). El análisis realizado en ese estudio reveló que los residuos de lisina, arginina y el derivado de cisteína S-aminoetil cisteína satisfacen el requerimiento del residuo básico mientras que los residuos de ácido aspártico, glutámico y el derivado de cisteína S-carboximetil cisteína cumplen los requisitos del residuo ácido reconocidos por la enzima. La presencia de residuos de asparagina en la cuarta y tercera posición a la izquierda del sitio de corte da como resultado una hidrólisis más lenta, así como la sustitución de residuos en la posición 4 siendo esta sustitución menos crítica. Las reacciones con enterocinasa se llevaron a cabo con enzima purificada de

mucosa intestinal bovina a 25°C en proteínas reducidas. Los resultados de ese estudio se resumen en la Figura 18.

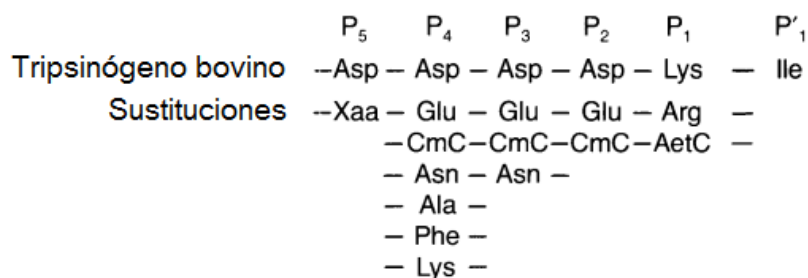


Figura 18. Sitios de sustitución para el reconocimiento de enterocinasa identificados por Light y colaboradores (1980). En la figura se muestra la secuencia canónica original del tripsinógeno bovino. Modificado de Light y Janska (1989).

Anteriormente, ha sido demostrado que las enterocinasas de diferentes especies poseen especificidad secundaria por otras secuencias cortas de péptidos diferentes de la secuencia canónica DDDDK. Kim et al (2008), en ensayos con enterocinasas bovina y porcina purificadas a 37°C, observaron que si se realizaba la digestión con péptidos que sustituyeran residuos de alanina en las posiciones 5 y 4 de la secuencia DDDDK esta era más eficiente. Lo mismo ocurría si se sustituía la lisina de la posición 1 con una arginina. Se ha encontrado que al llevar a cabo esta sustitución se requiere de 3 a 6 veces menos cantidad de enzima para llevar a cabo una digestión efectiva (Gasparian et al, 2011).

Inespecificidad de la digestión con enterocinasa en proteínas recombinantes

En cuanto a la producción de proteínas recombinantes, Kenig et al (2006) dieron a conocer la digestión inespecífica de un factor de necrosis tumoral alfa (TNF) recombinante en la secuencia VRSSSR. Los cortes fueron realizados después de ambos residuos de arginina,

por lo que descartaron este método de remoción de etiquetas de aminoácidos sin hacer ensayos posteriores.

Se ha reportado digestión inespecífica en la producción de cuatro toxinas de escorpiones con más de dos puentes disulfuro en el trabajo de Chen et al (2003). Una de ellas, con un punto isoeléctrico de 9.2, fue digerida de manera exitosa. En cambio, las proteínas con punto isoeléctrico menor (entre 6.2 y 4.7) fueron digeridas de forma inespecífica en las secuencias DNDK, QNAR, WEYR y EDK. Las proteínas que fueron digeridas de forma inespecífica en este caso se encontraban en un buffer con un pH más alto que su punto isoeléctrico. En el caso de la proteína de fusión NusA-CHH-A, esta se encontraba en un buffer con pH de 8.00 (50 mM Tris HCl, 1 mM CaCl₂ y Tween 20 0.1%), lo cual es un valor más alto que su punto isoeléctrico. Esto significa que estas proteínas se encuentran cargadas de forma negativa, por lo tanto esto pudiese tener un efecto en la especificidad de la reacción. Sin embargo, algunos trabajos señalan que disminuir o aumentar el pH no produce cambios significativos en la especificidad (Shahravan et al, 2008).

En la producción recombinante de la proteína AhR6-C/EBP, la cual es un híbrido de la región básica del receptor de aril hidrocarburo junto con la proteína potenciadora de unión a CCAAT, se presentó, al igual que en este caso, el corte inespecífico de la enterocinasa nativa de Roche (Shahravan et al, 2008). Después de 15 min de reacción, el 82% de la proteína había sido digerida en sitios inespecíficos, mientras que a las dos horas los subproductos habían sido degradados. Para optimizar la especificidad de la enzima, en este estudio se probaron diversas condiciones de pH, temperatura, cantidad de enzima y la adición de agentes desnaturalizantes. La adición de urea 1 M mejoró la especificidad de la enterocinasa. Los autores atribuyen a que la inespecificidad se debe a la falta de acceso a la

secuencia canónica DDDDK e identificaron los motivos SR, IK y DR como los sitios de digestión secundaria. Cabe señalar que los sitios con la secuencia DR que no fueron digeridos fue debido a que son precedidos por residuos básicos lo que impide su proteólisis. Sin embargo, esto no significa que cualquier sitio que contenga un aminoácido básico seguido de un residuo ácido sea un sitio inespecífico de enterocinasa (Shahravan et al, 2008).

Zhang et al (2005) produjeron hepcidina recombinante. Para remover una His-tag, se llevó a cabo la reacción en un amortiguador que contenía 2 M de urea, la cual había sido agregada para prevenir la precipitación de la proteína recombinante, que poseía cuatro enlaces disulfuro. La reacción tuvo un rendimiento del 20%, lo que permitió recuperar 970 µg de hepcidina a partir de 5 mg de proteína de fusión. De manera usual, los fabricantes de enterocinasa recomiendan eliminar inhibidores mediante diálisis. En el caso de la urea, se recomienda que esta no se encuentre en una concentración mayor a 2 M.

Todos estos experimentos, incluidos los de este trabajo, se llevaron a cabo con proteínas recombinantes provenientes de cepas de *E. coli* BL21 (DE3) o derivadas de ésta. Las enzimas utilizadas fueron comerciales (Roche, Invitrogen). Existen variaciones entre las reacciones en lo que respecta a los tiempos de incubación, la temperatura (siendo temperatura ambiente y 37°C), el pH (7.2 y 8.0) y la preparación del buffer. De todos estos factores, el único que parece modificar la especificidad de la reacción es la adición de urea al buffer de reacción.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se utilizó la herramienta bioinformática en línea 3 of 5 (<http://www.dkfz.de/mga2/3of5/3of5.html>), la cual encuentra patrones cortos en una

secuencia de aminoácidos mayor, ambos provistos por el usuario. En la Tabla 2 se muestran las secuencias de aminoácidos que aparecen en la proteína de fusión NusA-CHH-A que han sido dadas a conocer como sitios de corte inespecífico. En la tabla también se indica el número de repeticiones de dichas secuencias y el tamaño que tendrían los fragmentos de haber sido ese el sitio de corte secundario.

Tabla 2. Secuencias de corte inespecífico en la proteína de fusión NusA-CHH-A

Secuencia	Repeticiones	Posición	Tamaño esperado de fragmentos (kDa)
DDDDK (Canónica)	1	555 – 559	61.50-8.95
DEDK	1	311 - 314:	35.29-35.25
NDK	1	254 – 255	29.05-41.1
DR	5	62 – 63	7.17-63.37
		115 – 116	13.31-57.23
		189 – 190	21.8-48.74
		453 – 454	50.60-19.9
		571 – 572	61.90-8.64
IK	1	235 - 236:	27.10-42.9
SR	1	244 – 245	29.89-40.65

Remoción de la etiqueta de fusión Nus-tag

Otra posibilidad para explicar la falta especificidad es que el sitio de reconocimiento de la enterocinasa en la proteína de fusión NusA-CHH-A no se encuentre de manera accesible y por lo tanto esta situación derive en digestión inespecífica. Dado que NusA es una proteína

de 54.8 kDa, es factible que haya problemas estéricos que impidan la correcta digestión con enterocinasa. Si se introduce la secuencia completa en la herramienta bioinformática en línea Peptide Cutter (http://web.expasy.org/peptide_cutter/) en la cual se pueden conocer los sitios de corte por diversas proteasas, esta reconoce el sitio DEDK (posición 311 - 314) como un potencial lugar de reconocimiento para enterocinasa. Asimismo, se ha reportado que la proteína NusA es digerida de forma inespecífica por la proteasa factor Xa (Davies et al, 1999), aunque según reveló Peptide Cutter, no existen sitios de corte de esta enzima en la secuencia de la proteína.

Por otro lado, autores como Nagai et al (2009) observaron que NusA es digerida en diversos sitios inespecíficos por la enzima trombina, ya que no fue posible observar la porción correspondiente a esta etiqueta después de la digestión del neuropéptido recombinante Pej-SGP-VII. El rendimiento de la reacción fue bajo dado que la adición de mayor cantidad de enzima no causa diferencias significativas (Nagai et al, 2009). En este sentido, en el presente trabajo no se descarta que exista uno o varios sitios de digestión secundaria que se encuentren más expuestos que la secuencia DDDDK en la proteína de fusión NusA-CHH-A. En las reacciones con la enzima de Invitrogen el resto de las fracciones no pueden ser visualizadas en los geles de Tricina SDS-PAGE, lo que indica que son degradadas.

En cambio, las proteínas de fusión que contienen Nus-tag y un sitio de reconocimiento para proteasa TEV, además de tener una secuencia de unión entre este sitio y la proteína recombinante, son expresadas de forma soluble, con el plegamiento correcto y son procesadas correctamente en el sitio de reconocimiento (Nallamsetty y Waugh, 2006).

Por otra parte, se ha demostrado que otra etiqueta de fusión ampliamente usada para conferir solubilidad, Maltose Binding Protein (MBP), de 42 kDa, forma agregados solubles que no permiten el fácil acceso a las endoproteasas (Waugh, 2011). Se ha sugerido que en estos casos la MBP mantiene a los péptidos de fusión en estado soluble dentro de *E. coli*, sin que estos se encuentren en su conformación nativa pudiendo dar lugar a agregados proteicos solubles (Waugh, 2011).

La proteína NusA de *E. coli* posee alta termoestabilidad en condiciones fisiológicas. Usualmente existe en forma monomérica en solución (Gill et al, 1991). Sin embargo, bajo condiciones de shock de temperatura, tiende a formar oligómeros de alto peso molecular en vez de formar agregados, como lo hacen la mayor parte de las proteínas. Esta transformación, que es dependiente de la temperatura, puede ocurrir a partir de los 45°C. Los oligómeros de NusA parecen tener actividad chaperona por su interacción con proteínas parcialmente desnaturalizadas *in vitro*, ya que se ha observado que pueden reducir la agregación de proteínas provocada por temperatura o por la adición de 1,4-diotiotreitol (Li et al, 2013). Estos oligómeros capturan a las proteínas desnaturalizadas, formando complejos estables y solubles pero no facilita el replegamiento dado que no las liberan si no se encuentran otras chaperonas presentes. Cuando NusA sufre este cambio de conformación quedan expuestos sitios hidrófobos e incrementa su diámetro (Li et al, 2013). Se sugiere que este proceso se debe a su estructura secundaria, ya que posee 9 α -hélices en el C-terminal al igual que otras proteínas NusA bacterianas que también pueden formar oligómeros. NusA contiene dos repeticiones de dominios ácidos (aminoácidos en las posiciones 353-416 y 431-490) con dos motivos hélice-horquilla-hélice (HhH). Estas repeticiones son estructuralmente similares al dominio motivo alfa-estéril (SAM), del cual

se ha descrito su oligomerización (Einsenmann et al, 2005). Al momento de retirar ambas repeticiones de la proteína NusA, pierde su capacidad para oligomerizarse y es más sensible al shock de calor, formando agregados solubles (Li et al, 2013). Se desconoce si NusA puede formar oligómeros en condiciones fisiológicas.

Las proteínas que forman oligómeros son complicadas de purificar una vez que se realiza las digestiones con endoproteasas debido a la baja eficiencia de las reacciones por la distribución de las subunidades (Kenig et al, 2006).

Para obtener una proteína recombinante pura, las enzimas utilizadas para remover aminoácidos adicionales se tienen que retirar, al igual que las proteínas sin digerir. Por esta razón se realizan purificaciones adicionales. En el caso de la purificación de proteínas oligoméricas por cromatografía de afinidad de metales, el rendimiento es bajo. Esto se debe a pérdidas que a su vez se encuentran relacionadas con la conformación de la proteína y con la baja eficiencia de la digestión enzimática (Kenig et al, 2006).

Es probable que el fragmento de 48 kDa sea una variación de conformación de la etiqueta de fusión NusA dadas las propiedades que esta proteína posee. Se descarta que sea producto de una proteasa endógena de *E. coli* dado que en los geles de Tricina-SDS PAGE no se visualiza como fragmentos degradados, si no que se muestra en bandas consistentes en todas las condiciones de cultivo con inductor. Además, las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) son deficientes en la proteasa Lon, la cual tienen como función la degradación de proteínas que no son propias de la célula. Tampoco posee el gen que codifica para la proteasa de membrana OmpT, la cual tiene la función de degradar proteínas extracelulares (Rosano y Cecarelli, 2014).

A nivel transcripcional, NusA no posee codones de paro dentro de su secuencia. De ser así, no se obtendría la proteína de fusión completa de 70 kDa con la neurohormona CHH-A recombinante. Esto sugiere que la modificación se debe llevar a nivel traduccional o postraduccional. El péptido de 48 kDa contiene una secuencia His-tag, esto le permite ser detectado por el anticuerpo anti-His₆-HRP y purificado mediante la cromatografía de afinidad. Los resultados mostraron que el fragmento de 48 kDa no fue detectado por el anticuerpo anti-CHH-A, lo que indica que no contiene el C-terminal completo de la proteína de fusión y por ende, no contiene la neurohormona recombinante. Como este péptido también está siendo digerido, es probable que la o las secuencias de reconocimiento secundario se encuentren dentro de lo que es la proteína de fusión NusA.

Conclusiones

El uso del sistema *E. coli* BL21 Star-pET permitió la expresión de la proteína de fusión NusA-CHH-A en forma soluble con etiquetas de polihistidinas (6X His) y un sitio de reconocimiento para enterocinasa.

El análisis electroforético en Tricina SDS- PAGE mostró la expresión de la proteína de fusión con un peso molecular de 70 kDa, lo cual fue corroborado por Western Blot utilizando los anticuerpos anti-His₆-HRP y anti-CHH-A.

Las mejores condiciones de expresión de la proteína de fusión se obtuvieron a una temperatura de 30°C, 12 horas de incubación y una concentración de 1 mM del inductor IPTG.

Las etiquetas de polihistidinas permitieron la purificación mediante cromatografía de afinidad, la cual fue de manera parcial dada la presencia de otras bandas de proteínas visualizadas por geles de Tricina SDS- PAGE. El rendimiento de la purificación parcial de NusA-CHH-A fue de 16 mg/L.

Las condiciones utilizadas con la enzima enterocinasa para remover las regiones adicionales de la proteína de fusión NusA-CHH-A dieron lugar a cortes inespecíficos. El análisis de secuencias de la proteína de fusión NusA-CHH-A obtenida y la literatura sobre el tema sugieren la existencia de sitios de corte inespecíficos dentro de NusA, los cuales podrían ser eliminados modificando las condiciones de la digestión de la enzima enterocinasa.

Perspectivas

Optimizar las condiciones de purificación mediante el uso de imidazol en el buffer de unión para evitar la unión de proteínas que no contengan His-tag.

Optimizar las condiciones de digestión con enterocinasa para obtener la neurohormona CHH sin aminoácidos adicionales en el N-terminal, por lo que se sugiere el uso de urea para mejorar la especificidad de la reacción.

Determinar la secuencia del N-terminal de los subproductos obtenidos mediante la técnica de degradación de Edman.

Eliminar el fragmento del N-terminal adicional de la mezcla de reacción una vez que sea cortado con la enterocinasa por cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC).

Realizar ensayos *in vivo* para probar la actividad biológica de la hormona recombinante CHH-A de *L. vannamei* producida por medio del sistema de expresión pET en *E. coli*.

Bibliografía

- Abascal y Macías, R. (2009). Estudio de mercado para el camarón congelado para el mercado nacional. *SAGARPA*. Recuperado de: http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/CAMARONCONGELADO.pdf
- Arredondo -Espinoza, R.C. (2014) *Expresión de la hormona hiperglucémica de crustáceos recombinante (rCHH-A) de Litopenaeus vannamei y su efecto en la modulación de los niveles de glucosa*. Tesis de maestría en ciencias. CICESE. Ensenada, B.C, México. 54 p.
- Balderas -González, V.Y. (2014) *Expresión y purificación de la hormona hiperglucémica de crustáceos recombinante nativa (rCHH- A_N) y su participación en osmoregulación de Litopenaeus vannamei*. Tesis de maestría en ciencias. CICESE. Ensenada, B.C, México. 86 p.
- Baneyx, F. and Mujacic, M. (2004) Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1399 -1408.
- Böcking, D., Dirksen, H. and Keller, R. (2002). The crustacean neuropeptides of the CHH/MIH/GIH family: structures and biological activities. In: Korand, W. (Ed). *The Crustacean Nervous System*. Springer, pp. 84-97.
- Candiano G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L. and Righetti, P. G. 2004. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 25(9), 1327–1333.
- Camacho-Jiménez, L. (2016). *Efecto de las hormonas hiperglucémicas de crustáceos recombinantes CHH-B1 y CHH-B2 de Litopenaeus vannamei en los niveles de glucosa, triglicéridos, proteínas y osmorregulación*. Tesis de doctorado en ciencias. CICESE. Ensenada, B.C, México. 134 p.
- Camacho-Jiménez, L., Sanchez-Castrejón, E., Ponce-Rivas, E., Muñoz-Márquez, M.E., Aguilar, M.B., Re, A.D., Díaz, F. (2015) Hyperglycemic activity of the recombinant crustacean hyperglycemic hormone B1 isoform (CHH-B1) of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Peptides*, 71, 32 -37.
- Chang, E.S. (2005) Stressed-out lobsters: crustacean hyperglycemic hormone and stress proteins. *Integrative and Comparative Biology*. 45(1), 43-50.
- Chang, C.C., Tsai K.W., Hsiao, N.W., Chang, C.Y., Ling, C.L., Watson, R.D., Lee, C.Y. (2010) Structural and functional comparisons and production of recombinant crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and CHH-like peptides from the mud crab *Scylla olivacea*. *General and Comparative Endocrinology*, 167(1), 68–76.
- Chen, Z., Han, S., Cao, Z., Wu, Y., Zhuo, R., Li, W. (2003) Fusion expression and purification of four disulfide-rich peptides reveals enterokinase secondary cleavage sites in animal toxins. *Peptides*, 39, 145–151

Chen, S.H., Lin, C.Y., Kuo., C.M. (2005) *In Silico* Analysis of Crustacean Hyperglycemic Hormone Family. *Marine Biotechnology*, 7(3), 193–206.

Chung, J.S., Dirksen, H. and Webster, S.G. (1999). A remarkable, precisely timed release of hyperglycemic hormone from endocrine cells in the gut is associate to ecdysis in the crab *Carcinus maenas*. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 96(23), 13103-13107.

Chung, J.S. and Webster, S.G. (2003). Moults cycle-related changes in biological activity of moult-inhibiting hormone (MIH) and crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in the crab *Carcinus maenas*. From target to transcript. *European Journal of Biochemistry*. 270 (15), 3280–3288

Chung, J.S., Zmora, N., Katayama, H., Tsutsui, N. (2010) Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) neuropeptides family: Functions, titer, and binding to target tissues. *General and Comparative Endocrinology*, 166(3), 447–454.

Cooke, I.M., Sullivan, R.E.(1982). Hormones and neurosecretion. In: Bliss, D.E. (Ed). *The Biology of Crustaceans*, vol. 3. Academic Press, New York, pp. 205–290.

Cregg, J.M. and Higgins, D.R. (1995) Production of foreign proteins in the yeast *Pichia pastoris*. *Canadian Journal of Botany*, 73(1), 891-897.

Daly, R. and Hearn, M. T. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*, 18(2), 119-138.

Davies, G.D., Elisee, C., Newham, D.M., Harrison, R.G. (1999) New Fusion Protein Systems Designed to Give Soluble Expression in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 65(4), 382-388.

De Kleijn, D.P.V. and Van Herp, F. (1995) Molecular biology of neurohormone precursors in the eyestalk of Crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 112(4), 573–579.

De Kleijn, D.P.V. and Van Herp, F. (1998). Involvement of the hyperglycemic neurohormone family in the control of reproduction in decapod crustaceans. *Invertebrate Reproduction and Development*, 33(2-3), 263–272.

De Marco, V., Stier, G., Blandin, S., De Marco, A. (2004) The solubility and stability of recombinant proteins are increased by their fusion to NusA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322(3), 766–771.

Díaz, F., Farfan, C., Sierra, E., Re, A.D. (2001) Effects of temperature and salinity fluctuation on the ammonium excretion and osmoregulation of juveniles of *Penaeus vannamei*, Boone. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 34(2), 93-104.

Dubendorff, J.W. and Studier, F.W. (1991) Controlling Basal Expression in an Inducible T7 Expression System by Blocking the Target T7 Promoter with *lac* Repressor. *Journal of Molecular Biology*, 219(1), 45-59.

Einsenmann, A., Schwarz, S., Prash, S., Schweimer, K., Rösch, P. (2005) The *E. coli* NusA carboxy-terminal domains are structurally similar and show specific RNAP and λ N interaction. *Protein Science*, 14(8), 2018–2029.

Fanjul-Moles, L.M (2006) Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycemic hormone in decapod crustaceans: Review and update. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 142(3), 390-400.

FAO (2006) Programa de información de especies acuáticas-*Penaeus vannamei* (Boone, 1931) *Programa de información de especies acuáticas*. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Recuperado en línea: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/es

Fingerman, M., Rodríguez, E.M. (2009). Regulación endócrina de crustáceos. In: Paniagua-Michel, J.J. *Biotecnología Marina*. AGT Editores, pp. 277-307.

FIRA (2009) Situación actual y perspectivas del camarón en México. *FIRA*, 3, 122 p.

Gasparian, M.E., Bychkov, M.L., Dolgikh, D.A., Kirpichnikov, M.P. (2011) Strategy for improvement of enteropeptidase efficiency in tag removal processes. *Protein Expression and Purification*, 79(2), 191–196.

Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., and Bairoch A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker, J.M. (Ed.). *The Proteomics Protocols Handbook*. (pp. 571-607). Humana Press.

Gill, S.C., Yager, T.D., von Hippel, P.H. (1991) *Escherichia coli* σ^{70} and NusA Proteins II. Physical Properties and Self-association States. *Journal of Molecular Biology*, 220(2), 325-333.

González, R.A., Díaz, F., Licea, A., Re, A.D., Sánchez, N.L., García-Esquivel, Z. (2010) Thermal preference, tolerance and oxygen consumption of adult white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) exposed to different acclimation temperatures. *Journal of Thermal Biology*, 35(5), 218–224.

Gu, P.L., Yu, K.L., Chan, S.M. (2000) Molecular characterization of an additional shrimp hyperglycemic hormone: cDNA cloning, gene organization, expression and biological assay of recombinant proteins. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 472 (1), 122-128.

Gutierrez-Salazar, G.J., Molina-Garza, Z.J., Hernández-Acosta, M., García-Salas J.A., Mercado-Hernández, R., Galaviz-Silva, L. (2011) Pathogens in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) and their relationship with physicochemical parameters in three different culture systems in Tamaulipas, Mexico. *Aquaculture*, 321 (1-2), 34-40.

Hopkins, P.M. (2012) The eyes have it: A brief history of crustacean neuroendocrinology. *General and comparative endocrinology*. 175(3), 357-366.

- Huberman, A (2000) Shrimp endocrinology. A review. *Aquaculture*, 191(1), 191-208.
- Inoue, H., Tsutsui, N., Nagai, C., Nagata, K., Tanokura, M., Nagasawa H. (2011) Crystallization and preliminary X-ray analysis of crustacean hyperglycaemic hormone from the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* in its weakly active precursor form. *Acta Crystallographica, Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 67(12), 1586-1589.
- Katayama, H., Ohira, T., Aida, K., Nagasawa, H. (2002) Significance of a carboxyl-terminal amide moiety in the folding and biological activity of crustacean hyperglycemic hormone. *Peptides*, 23(9), 1537–1546.
- Keller, R. (1992) Crustacean neuropeptides: Structures, functions and comparative aspects. *Experientia*, 48(5), 439- 448.
- Kenig, M., Peternel, S., Garbec-Porekar, V., Menart, V. (2006) Influence of the protein oligomericity on final yield after affinity tagremoval in purification of recombinant proteins. *Journal of Chromatography Part A*, 1101(1-2), 293–306.
- Kim, Y.T., Nishii, W., Matsushima., M., Inoue, H., Ito, H., Park., S.J., Takahashi, K. (2008). Substrate Specificities of Porcine and Bovine Enteropeptidases toward the Peptide Val-(Asp)⁴-Lys-Ile-Val-Gly and Its Analogs. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(3), 905-980.
- Kobayashi, K., Kuwae, S, Ohya, T., Ohda, T., Ohyama, M., Ohi, H., Tomomitsu, K., Ohmura, T (2000) High-Level Expression of Recombinant Human Serum Albumin from the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris* with Minimal Protease Production and Activation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89(1), 55-61.
- Lacombe, C., Greve, P., Martin, G. (1999) Overview on the sub-grouping of the crustacean hyperglycemic hormone family. *Neuropeptides*, 33(1), 71-80.
- Lago-Lestón, A., Ponce, E., Muñoz, M.E. (2007) Cloning and expression of hyperglycemic (CHH) and molt-inhibiting (MIH) hormones mRNAs from the eyestalk of shrimps of *Litopenaeus vannamei* grown in different temperature and salinity conditions. *Aquaculture* 270 (1), 343-357.
- Lee, C.Y., Tsai, K.W., Tsai, W.S., Jiang, J.Y., Chen, Y.J. (2014) Crustacean hyperglycemic hormone: Structural, variants, physiological function and cellular mechanism of action. *Journal of Marine Science and Technology*, 22(1), 75-81.
- Li, K., Jiang, T., Yu, B., Wang, L., Gao, C., Ma, C., Xu, P., Ma, X. (2013) *Escherichia coli* transcription termination factor NusA: heat-induced oligomerization and chaperone activity. *Scientific Reports*, 3: 2347 | DOI: 10.1038/srep02347.
- Light, A. and Janska, H. (1989) Enterokinase (enteropeptidase) comparative aspects. *Trends in Biochemical Sciences*. 14(3), 110-112.

Light, A., Savithri, H.S., Liepnieks, J.J. (1980) Specificity of Bovine Enterokinase toward Protein Substrates. *Analytical Biochemistry*, 106(1), 199-206.

Liu, M; Pan, L; Li, L; Zheng, D (2014) Molecular cloning, characterization and recombinant expression of crustacean hyperglycemic hormone in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Peptides* 53, 115-124.

López-Rodríguez, H. (2009). *Clonación y expresión de la isoforma 2 de la hormona hiperglucémica de crustáceos de Litopenaeus vannamei (Liv-CHH-SG2) en Pichia pastoris*. Tesis de maestría en ciencias. CICESE. Ensenada, B.C, México. 66 p.

Lorimer, G. H. (1996) A quantitative assessment of the role of the chaperonin proteins in protein folding *in vivo*. *FASEB Journal*, 10(1), 5-9.

Makrides, S.C. (1996) Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 190 (1), 512-538.

Maroux, S., Baratti, J., Desnuelle, P. (1971) Purification and Specificity of Porcine Enterokinase. *Journal of Biological Chemistry*, 246(16), 5031-5039.

Marston, F.A.O. (1986) The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*, 240(1), 1-12.

Mosco, A., Edomi, P., Guarnaccia, C., Lorenzo, S., Pongor, S., Ferrero, E.A., Giulianini, P.G. (2008) Functional aspects of cHH C-terminal amidation in crayfish species. *Regulatory Peptides*, 147(1), 88-95.

Montagné, N., Desdevises, Y., Soyeux, D., Toullec, J.Y. (2010) Molecular evolution of the crustacean hyperglycemic hormone family in ecdysozoans. *BMC Evolutionary Biology*, 10:62.

Nagai, C., Asazuma, H., Nagata, S., Ohira, T, Nagasawa, H. (2009) A convenient method for preparation of biologically active recombinant CHH of the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*, using the bacterial expression system. *Peptides*, 30(3), 507-517.

Nakatsuji, T., Han D.W., Jablonsky, J.M., Harville, S.R., Muccio, D.D., Watson, R.D. (2006) Expression of crustacean (*Callinectes sapidus*) molt-inhibiting hormone in *Escherichia coli*: Characterization of the recombinant peptide and assessment of its effects on cellular signaling pathways in Y-organs. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 253(1-2), 96-104.

Nallamsetty, S and Waugh, D.S. (2006) Solubility-enhancing proteins MBP and NusA play a passive role in the folding of their fusion partners. *Protein Expression and Purification*, 45(1), 175-182.

Ohira, T., Tsutsui, N., Nagasawa, H., Wilder, M.N. (2006) Preparation of two recombinant crustacean hyperglycemic hormones for giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* and their hyperglycemic activities. *Zoological Science*, 23(4), 383-391.

- Ohira, T., Okumura, T., Suzuki, M., Yajima, Y., Tsutsui, N., Wilder, M.N., Nagasawa, H. (2006) Production and characterization of recombinant vitellogenesis-inhibiting hormone from the American lobster *Homarus americanus*. *Peptides*, 27(6), 1251-1258.
- Overton, T.W. (2013) Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discovery Today*, 19(5), 590-601.
- Rosano, G.L. and Ceccarelli, E.A. (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5(172), 1-7.
- Sánchez-Castrejón, E., Ponce-Rivas, E., Aguilar, M.B. and Díaz, F. (2008) Molecular Cloning and Expression of a putative crustacean hyperglycemic hormone (CHH) of *Litopenaeus vannamei* in *Pichia pastoris*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(4), 1-9.
- Santos, E.A., Maia-Nery, L.E., Keller, R. and Gonçalves, A.A. (1997). Evidence for the involvement of the crustacean hyperglycemic hormone in the regulation of lipid metabolism. *Physiological Zoology*, 70(4), 415-420.
- Schägger, H. (2006). Tricine SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 1(1), 16-23.
- Sedlmeier, D. (1982) The mode of action of the crustacean neurosecretory hyperglycemic hormone (CHH). II. Involvement of glycogen synthase. *General and Comparative Endocrinology*, 47(4), 426-432.
- Sedlmeier, D. (1985) Mode of action of Hyperglucemic Hormone. *American Zoologist*. 25(1), 223-232.
- Sedlmeier, D. (1988) The crustacean hyperglycemic hormone (CHH) releases amylase from the crayfish midgut gland. *Regulatory Peptides*, 20(2), 91-98.
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., D'Ari, R. (2007) *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *Journal of Bacteriology*, 189(23), 8746-8749.
- Shahravan, S.H., Qu, X., Chan, I.S., Shin, J.A. (2008) Enhancing the specificity of the enterokinase cleavage reaction to promote efficient cleavage of a fusion tag. *Protein Expression and Purification*, 59(2), 314-319.
- Sigala-Andrade, H. M. (2010). *Análisis de expresión por RT-PCR tiempo real de las hormonas hiperglucémicas de crustáceos CHH-A, CHH-B1 y CHH-B2 del camarón blanco Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de Baja California. B.C. México. 100 p.
- Sørensen, H.P. and Mortensen, K.K. (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 115(2), 113-128.
- Sreekrishna, K., Brankamp, R.G., Kropp, K.E., Blankenship, D.T., Tsay, J.T., Smith, P.L., Wierschke, J.D., Subramaniam, A., Birkenberger, L. A. (1997) Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 190(1), 55-62.

Studier, F.W. and Moffatt, B. A. (1986) Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes. *Journal of Molecular Biology*, 189, (1) 113-130.

Ventura-López, C., Gómez-Anduro, G., Arcos, F.G., Llera-Herrera, R., Racotta, I.S. and Ibarra, A.M. (2016). A novel CHH gene from the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* was characterized and found highly expressed in gut and less in eyestalk and other extra-eyestalk tissues. *Gene*, 58(2), 148-160.

Wanlem, S., Supamattaya, K. Tantikitti, C., Prasetsan, P., Graidist, P. (2011) Expression and applications of recombinant crustacean hyperglycemic hormone from eyestalks of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against bacterial infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 30(3), 877-885.

Waugh, D.S. (2011) An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein Expression and Purification* 80(2), 283-293.

Webster, S.G., Keller, R., Dircksen, H. (2012) The CHH-superfamily of multifunctional peptide hormones controlling crustacean metabolism, osmoregulation, moulting, and reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 175(2), 217-233.

Woo, J.H., Liu Y.Y., Neville, D.R Jr. (2006). Minimization of aggregation of secreted bivalent anti-human T cell immunotoxin in *Pichia pastoris* bioreactor culture by optimizing culture conditions for protein secretion. *Journal of Biotechnology*, 121(1), 75–85.

Wu, D., Hao, Y.Y., Chu, J., Zhuang, Y.P., Zhang, S.L. (2008) Inhibition of degradation and aggregation of recombinant human consensus interferon- α mutant expressed in *Pichia pastoris* with complex medium in bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(6), 1063–1071.

Wu, S. H., Chen, Y. J., Huang, S. Y., Tsai, W. S., Wu, H. J., Hsu, T. T., Lee, C. Y. (2012a) Demonstration of expression of a neuropeptide-encoding gene in crustacean hemocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 161(4), 463-468.

Zhang, H., Yuan, Q., Zhu, Y., Ma, R. (2005) Expression and preparation of recombinant hepcidin in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 41(2), 409-416.

Anexos

Secuencia completa de la proteína de fusión NusA-CHH-A

ATG	GGC	AGC	AGC	CAT	CAC	CAC	CAT	CAC	CAT	TCT	AGT	
Met	Gly	Ser	Ser	His	His	His	His	His	His	Ser	Ser	
ATG	AAC	AAA	GAA	ATT	TTG	GCT	GTA	GTT	GAA	GCC	GTA	TCC
Met	Asn	Lys	Glu	Ile	Leu	Ala	Val	Val	Glu	Ala	Val	Ser
AAT	GAA	AAG	GCG	CTA	CCT	CGC	GAG	AAG	ATT	TTC	GAA	GCA
Asn	Glu	Lys	Ala	Leu	Pro	Arg	Glu	Lys	Ile	Phe	Glu	Ala
TTG	GAA	AGC	GCG	CTG	GCG	ACA	GCA	ACA	AAG	AAA	AAA	TAT
Leu	Glu	Ser	Ala	Leu	Ala	Thr	Ala	Thr	Lys	Lys	Lys	Tyr
GAA	CAA	GAG	ATC	GAC	GTC	CGC	GTA	CAG	ATC	GAT	CGC	AAA
Glu	Gln	Glu	Ile	Asp	Val	Arg	Val	Gln	Ile	Asp	Arg	Lys
AGC	GGT	GAT	TTT	GAC	ACT	TTC	CGT	CGC	TGG	TTA	GTT	GTT
Ser	Gly	Asp	Phe	Asp	Thr	Phe	Arg	Arg	Trp	Leu	Val	Val
GAT	GAA	GTC	ACC	CAG	CCG	ACC	AAG	GAA	ATC	ACC	CTT	GAA
Asp	Glu	Val	Thr	Gln	Pro	Thr	Lys	Glu	Ile	Thr	Leu	Glu
GCC	GCA	CGT	TAT	GAA	GAT	GAA	AGC	CTG	AAC	CTG	GGC	GAT
Ala	Ala	Arg	Tyr	Glu	Asp	Glu	Ser	Leu	Asn	Leu	Gly	Asp
TAC	GTT	GAA	GAT	CAG	ATT	GAG	TCT	GTT	ACC	TTT	GAC	CGT
Tyr	Val	Glu	Asp	Gln	Ile	Glu	Ser	Val	Thr	Phe	Asp	Arg
ATC	ACT	ACC	CAG	ACG	GCA	AAA	CAG	GTT	ATC	GTG	CAG	AAA
Ile	Thr	Thr	Gln	Thr	Ala	Lys	Gln	Val	Ile	Val	Gln	Lys
GTG	CGT	GAA	GCC	GAA	CGT	GCG	ATG	GTG	GTT	GAT	CAG	TTC
Val	Arg	Glu	Ala	Glu	Arg	Ala	Met	Val	Val	Asp	Gln	Phe
CGT	GAA	CAC	GAA	GGT	GAA	ATC	ATC	ACC	GGC	GTG	GTG	AAA
Arg	Glu	His	Glu	Gly	Glu	Ile	Ile	Thr	Gly	Val	Val	Lys
AAA	GTA	AAC	CGC	GAC	AAC	ATC	TCT	CTG	GAT	CTG	GGC	AAC
Lys	Val	Asn	Arg	Asp	Asn	Ile	Ser	Leu	Asp	Leu	Gly	Asn
AAC	GCT	GAA	GCC	GTG	ATC	CTG	CGC	GAA	GAT	ATG	CTG	CCG
Asn	Ala	Glu	Ala	Val	Ile	Leu	Arg	Glu	Asp	Met	Leu	Pro
CGT	GAA	AAC	TTC	CGC	CCT	GGC	GAC	CGC	GTT	CGT	GGC	GTG
Arg	Glu	Asn	Phe	Arg	Pro	Gly	Asp	Arg	Val	Arg	Gly	Val
CTC	TAT	TCC	GTT	CGC	CCG	GAA	GCG	CGT	GGC	GCG	CAA	CTG
Leu	Tyr	Ser	Val	Arg	Pro	Glu	Ala	Arg	Gly	Ala	Gln	Leu
TTC	GTC	ACT	CGT	TCC	AAG	CCG	GAA	ATG	CTG	ATC	GAA	CTG
Phe	Val	Thr	Arg	Ser	Lys	Pro	Glu	Met	Leu	Ile	Glu	Leu
TTC	CGT	ATT	GAA	GTG	CCA	GAA	ATC	GGC	GAA	GAA	GTG	ATT
Phe	Arg	Ile	Glu	Val	Pro	Glu	Ile	Gly	Glu	Glu	Val	Ile
GAA	ATT	AAA	GCA	GCG	GCT	CGC	GAT	CCG	GGT	TCT	CGT	GCG
Glu	Ile	Lys	Ala	Ala	Ala	Arg	Asp	Pro	Gly	Ser	Arg	Ala
AAA	ATC	GCG	GTG	AAA	ACC	AAC	GAT	AAA	CGT	ATC	GAT	CCG
Lys	Ile	Ala	Val	Lys	Thr	Asn	Asp	Lys	Arg	Ile	Asp	Pro
GTA	GGT	GCT	TGC	GTA	GGT	ATG	CGT	GGC	GCG	CGT	GTT	CAG
Val	Gly	Ala	Cys	Val	Gly	Met	Arg	Gly	Ala	Arg	Val	Gln
GCG	GTG	TCT	ACT	GAA	CTG	GGT	GGC	GAG	CGT	ATC	GAT	ATC
Ala	Val	Ser	Thr	Glu	Leu	Gly	Gly	Glu	Arg	Ile	Asp	Ile
GTC	CTG	TGG	GAT	GAT	AAC	CCG	GCG	CAG	TTC	GTG	ATT	AAC
Val	Leu	Trp	Asp	Asp	Asn	Pro	Ala	Gln	Phe	Val	Ile	Asn
GCA	ATG	GCA	CCG	GCA	GAC	GTT	GCT	TCT	ATC	GTG	GTG	GAT
Ala	Met	Ala	Pro	Ala	Asp	Val	Ala	Ser	Ile	Val	Val	Asp

GAA GAT AAA CAC ACC ATG GAT ATC GCC GTT GAA GCC GGT
 Glu Asp Lys His Thr Met Asp Ile Ala Val Glu Ala Gly
 AAC CTG GCG CAG GCG ATT GGC CGT AAC GGT CAG AAC GTG
 Asn Leu Ala Gln Ala Ile Gly Arg Asn Gly Gln Asn Val
 CGT CTG GCT TCG CAG CTG AGC GGT TGG GAA CTC AAC GTG
 Arg Leu Ala Ser Gln Leu Ser Gly Trp Glu Leu Asn Val
 ATG ACC GTT GAC GAC CTG CAG GCT AAG CAT CAG GCG GAA
 Met Thr Val Asp Asp Leu Gln Ala Lys His Gln Ala Glu
 GCG CAC GCA GCG ATC GAC ACC TTC ACC AAA TAT CTC GAC
 Ala His Ala Ala Ile Asp Thr Phe Thr Lys Tyr Leu Asp
 ATC GAC GAA GAC TTC GCG ACT GTT CTG GTA GAA GAA GGC
 Ile Asp Glu Asp Phe Ala Thr Val Leu Val Glu Glu Gly
 TTC TCG ACG CTG GAA GAA TTG GCC TAT GTG CCG ATG AAA
 Phe Ser Thr Leu Glu Glu Leu Ala Tyr Val Pro Met Lys
 GAG CTG TTG GAA ATC GAA GGC CTT GAT GAG CCG ACC GTT
 Glu Leu Leu Glu Ile Glu Gly Leu Asp Glu Pro Thr Val
 GAA GCA CTG CGC GAG CGT GCT AAA AAT GCA CTG GCC ACC
 Glu Ala Leu Arg Glu Arg Ala Lys Asn Ala Leu Ala Thr
 ATT GCA CAG GCC CAG GAA GAA AGC CTC GGT GAT AAC AAA
 Ile Ala Gln Ala Gln Glu Glu Ser Leu Gly Asp Asn Lys
 CCG GCT GAC GAT CTG CTG AAC CTT GAA GGG GTA GAT CGT
 Pro Ala Asp Asp Leu Leu Asn Leu Glu Gly Val Asp Arg
 GAT TTG GCA TTC AAA CTG GCC GCC CGT GGC GTT TGT ACG
 Asp Leu Ala Phe Lys Leu Ala Ala Arg Gly Val Cys Thr
 CTG GAA GAT CTC GCC GAA CAG GGC ATT GAT GAT CTG GCT
 Leu Glu Asp Leu Ala Glu Gln Gly Ile Asp Asp Leu Ala
 GAT ATC GAA GGG TTG ACC GAC GAA AAA GCC GGA GCA CTG
 Asp Ile Glu Gly Leu Thr Asp Glu Lys Ala Gly Ala Leu
 ATT ATG GCT GCC CGT AAT ATT TGC TGG TTC GGT GAC GAA
 Ile Met Ala Ala Arg Asn Ile Cys Trp Phe Gly Asp Glu
 GCG ACT AGT GGT TCT GGT CAT CAC CAT CAC CAT CAC TCC
 Ala Thr Ser Gly Ser Gly His His His His His His Ser
 GCG GGT AAA GAA ACC GCG GGT AAA GAA ACC GCT GCT GCG
 Ala Gly Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln
 CAG CAC ATG GAC TCG CCA CCG CCA ACT GGT CTG
 Gln His Met Asp Ser Pro Pro Pro Thr Gly Leu
 GTC CCC CGG GGC AGC GCG GGT TCT GGT ACG ATT
 Val Pro Arg Gly Ser Ala Gly Ser Gly Thr Ile
 GAT GAC GAC GAC AAG AGT CTC TTT GAC CCG TCC
 Asp Asp Asp Asp Lys Ser Leu Phe Asp Pro Ser
 TGT ACC GGC GTT TTT GAC CGC CAA CTG CTG CGT
 Cys Thr Gly Val Phe Asp Arg Gln Leu Leu Arg
 CGT CTG CGT CTG GTG TGT GAT GAT TGC TTT AAT
 Arg Leu Arg Arg Val Cys Asp Asp Cys Phe Asn

GTT	TTT	CGT	GAA	CCG	AAC	GTG	AGC	ACC	GAA	TGC	CGT
Val	Phe	Arg	Glu	Pro	Asn	Val	Ser	Thr	Glu	Cys	Arg
TCT	AAC	TGT	TAC	AAC	AAC	GAA	GTT	TTC	CGC	CAG	
Ser	Asn	Cys	Tyr	Asn	Asn	Glu	Val	Phe	Arg	Gln	
TGC	ATG	GAA	TAC	CTG	CTG	CCG	CCG	CAC	CTG	CAC	
Cys	Met	Glu	Tyr	Leu	Leu	Pro	Pro	His	Leu	His	
GAA	GAA	CAT	CGC	CTG	GCT	GTC	CAA	ATG	GTC	GGT	TAA
Glu	Glu	His	Arg	Leu	Ala	Val	Gln	Met	Val	Gly	*

Secuencia completa de la proteína de fusión expresada por *E. coli* BL21 Star CHH-A. Los aminoácidos en letra verde indican la proteína de NusA. Los aminoácidos en naranja son correspondientes a la neurohormona CHH-A. Se resaltaron las etiquetas His-tag, S-tag, el sitio de reconocimiento de trombina y el sitio de reconocimiento de enterocinasa en azul turquesa, verde, gris y azul respectivamente. En amarillo se resaltó el inicio de la traducción y en letras rojas el término de la misma.