

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería



**Expresión heteróloga y purificación del dominio soluble de la proteína de
unión a acetilcolina de *Aplysia californica* (AcAChBP)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACOBIOÓLOGO

P R E S E N T A

Celina Terán Ramírez

Tijuana, Baja California, México.

Abril de 2018.

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

FOLIO No. 22

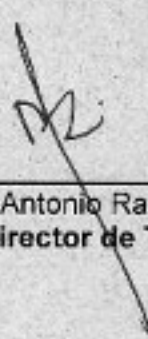
Tijuana, B. C., a 05 de Abril de 2018

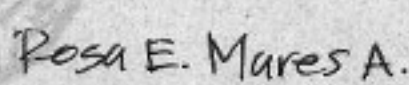
C. Celina Terán Ramírez
Pasante de Químico Farmacobiólogo
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción Tesis

Es propuesto, por el Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra y la Dra. Rosa Elena Mares
Alejandre quienes serán los responsables de la calidad del trabajo que usted
presente, referido al tema "Expresión Heteróloga y Purificación del Dominio
Soluble de la Proteína de Unión a Acetilcolina de *Aplysia californica* (AcAChBP)",
el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- RESUMEN
- II.- INTRODUCCIÓN
- III.- PARTE EXPERIMENTAL
- IV.- DISCUSIÓN Y RESULTADOS
- V.- CONCLUSIONES
- VI.- REFERENCIAS
- VII.- ANEXOS


Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra
Co-Director de Tesis


Dra. Rosa Elena Mares Alejandre
Co-Directora de Tesis


Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA


Dr. José Luis González Vázquez
Subdirector

Terán Ramírez, Celina
**Expresión heteróloga y purificación del dominio soluble de la proteína de unión a acetilcolina de
Aplysia californica (AcAChBP)**
Tesis de licenciatura

Todos los derechos sobre los datos y resultados, derivados de la investigación realizada, contenidos en este documento son propiedad de los autores y de las instituciones donde se realizó el estudio. Por tal motivo, se prohíbe la reproducción, distribución, publicación, traducción, y cualquier otro uso o adaptación (total o parcial) de la información, por cualquier medio o forma de difusión.

La prohibición anterior no tendrá validez, de forma exclusiva y limitada, cuando el uso o adaptación de la información cumpla los siguientes requisitos:

- 1) el material o medio de difusión sea utilizado sólo para fines académicos, no lucrativos ni comerciales;
- 2) incluir la siguiente cita: “Terán Ramírez, Celina. Expresión heteróloga y purificación del dominio soluble de la proteína de unión a acetilcolina de *Aplysia californica* (AcAChBP). Tesis de licenciatura. Programa Educativo de Químico Farmacobiólogo, Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California. Marzo de 2018.”
- 3) enviar un correo electrónico a mramos@uabc.edu.mx, solicitando anuencia y dando aviso de qué datos se van a utilizar y cuál es el propósito de su uso.

Lo anterior no otorga derecho o licencia alguna, respecto a la información utilizada.

Para cualquier otro asunto relacionado, contactar a mramos@uabc.edu.mx.

D.R. © Terán Ramírez, Celina. Tesista.

D.R. © Ramos Ibarra, Marco Antonio. Director de tesis.

D.R. © Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. Unidad Académica de la UABC.

D.R. © Universidad Autónoma de Baja California. Institución de Educación Superior.

©2018.

Tesis: Expresión heteróloga y purificación del dominio soluble de la proteína de unión a acetilcolina de *Aplysia californica* (AcAChBP).
Grado: Licenciatura, Programa Educativo de Químico Farmacobiólogo.
Institución: Universidad Autónoma de Baja California.
Sustentante: Celina Terán Ramírez.
Fecha: Abril de 2018.

El presente proyecto de investigación fue realizado en el **Laboratorio de Biotecnología** de la **Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la UABC**, bajo la co-dirección de los profesores **Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra** y **Dra. Rosa Elena Mares Alejandre**, con el financiamiento del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**: Fondo Sectorial SEP-CONACYT para **Investigación en Ciencia Básica** (apoyo 155714) y Fondo Sectorial SSA/IMSS/ISSSTE para **Investigación en Salud** (apoyo 161544), otorgados al Dr. Ramos Ibarra.

Los resultados correspondientes fueron presentados en el **5to. Encuentro Estatal de Jóvenes Investigadores en Baja California**, realizado en el BIT Center de Tijuana, Baja California, los días 28 y 29 de septiembre de 2017. La participación en el evento académico fue apoyada por la Dirección de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la UABC.

Tesis: Expresión heteróloga y purificación del dominio soluble de la proteína de unión a acetilcolina de *Aplysia californica* (AcAChBP).
Grado: Licenciatura, Programa Educativo de Químico Farmacobiólogo.
Institución: Universidad Autónoma de Baja California.
Sustentante: Celina Terán Ramírez.
Fecha: Abril de 2018.

El presente **Manuscrito de Tesis** fue **Revisado y Aprobado** por un **Comité Académico**, conformado por los profesores:

Samuel Guillermo Meléndez López, Dr. (Presiente)
Marco Antonio Ramos Ibarra, Dr. (Secretario)
Rosa Elena Mares Alejandre, Dra. (Sinodal)
Patricia Lilián Alejandra Muñoz Muñoz, Dra. (Suplente)
Pablo Alfonso Madero Ayala, QFB (Suplente)

En la búsqueda de conocimiento, algo es agregado cada día.

En la búsqueda de iluminación, algo es dejado cada día.

-Lao-Tzu

Agradecimientos

Gracias a mi familia, mi mayor inspiración para querer ser mejor cada día; **a mis padres** por darme la vida y mucho más que eso, por la libertad de decisión y sobre todo por el apoyo incondicional. Gracias **a mis hermanos** por todo lo que hacen por mí y porque su ejemplo ha sido y siempre será la mejor guía.

A todos los miembros de la familia Biotech, incluyendo a los que ya no están, por hacer que esta experiencia trascienda más allá de lo académico: **Jimena, Ana, Bere, Pablo, Álvaro, Jorge, Uzziel, Profe Alexis, Profe Lilian, Dr. Sam.**

A los tres más galanes, ojalá la vida nos permita seguirnos viendo:

A **Eliseo**, gracias por ser mi primer compañero de la aventura “tesis” y por permitirme compartir contigo muchas tardes en el laboratorio, por escucharme cuando necesitaba practicar y por aguantar mis quejas existenciales. A **Vero**, por aguantarme 12 horas al día o hasta más, por la confianza, por convertirme en mi amiga después de cuatro años de conocerte y compartir mucho más que lo académico. A **Kat**, por todas las pláticas, comidas, raites, clases de manejo, por hacer tan agradables muchas tardes, por todos los consejos, por el gran apoyo y siempre evitar que incendiara el laboratorio.

Al **Dr. Marco** y **Dra. Rosy**, dos estupendos maestros y extraordinarias personas, gracias por enseñarnos tanto, por toda la paciencia mostrada, por permitirnos aprender de su gran experiencia y compartir mucho más que su gran conocimiento.

Muchas gracias a los profesores miembros del comité evaluador de mi tesis, **Dr. Marco Ramos, Dra. Rosy Mares, Dr. Samuel Meléndez, Dra. Lilian Muñoz y QFB Pablo Madero**, quienes se tomaron el tiempo de leer este documento y hacerme llegar sus correcciones y sugerencias.

Contenido

Agradecimientos.....	6
Contenido.....	7
Índice de Figuras y Tablas.....	9
Abreviaturas.....	10
1. Introducción.....	11
1.1. Receptores y neurotransmisores.....	11
1.1.1. Clasificación y tipos de receptores.....	11
1.1.2. Importancia fisiológica de los receptores.....	11
1.1.3. Neurotransmisores.....	12
1.1.4. Clasificación de los neurotransmisores.....	12
1.2. Fisiología de la interacción receptor-neurotransmisor.....	13
1.3. Patologías humanas asociadas a receptores de neurotransmisores.....	14
1.4. Receptor de acetilcolina (AChR).....	14
1.4.1. Tipos de AChR.....	15
1.4.2. Respuesta fisiológica de la unión AChR-ACh.....	16
1.4.3. Patologías relacionadas a AChR.....	16
1.4.4. Farmacología de AChR.....	17
1.5. AChBP de <i>Aplysia californica</i> (AcAChBP) como modelo de AChR.....	17
1.5.1. Estructura de AcAChBP.....	17
1.5.2. Ensayos con AcAChBP.....	17
1.5.3. Expresión heteróloga en levaduras y bacterias.....	18
1.6. <i>E. coli</i> como modelo bacteriano de expresión heteróloga de proteínas.....	18
1.6.1. <i>E. coli</i> como modelo: genética y bioquímica.....	18
1.6.2. Sistema de expresión y modulación <i>T7RNAP/T7LysY</i> en <i>E. coli</i>	18
1.6.3. Expresión en compartimentos de <i>E. coli</i>	20
1.7. El periplasma de <i>E. coli</i> como sistema de expresión de AcAChBP.....	20
2. Hipótesis y Objetivo.....	22
2.1. Hipótesis.....	22
2.2. Objetivo general.....	22
2.3. Objetivos específicos.....	22
3. Materiales y Métodos.....	23
3.1. Reactivos biológicos y químicos.....	23
3.1.1. Reactivos químicos y bioquímicos.....	23
3.1.2. Enzimas y estuches comerciales.....	23
3.1.3. Células bacterianas y medios de cultivo.....	23
3.1.4. Plásmidos: pET22b(+) y pEYebF-R12.....	24
3.2. Equipos y programas computacionales.....	24
3.3. Protocolos generales.....	25

3.3.1.	Cultivos bacterianos	25
3.3.2.	Preparación de bacterias competentes	25
3.3.3.	Transformación bacteriana	25
3.3.4.	Mini-purificación de ADN (plásmidos, productos de <i>PCR</i> , y fragmentos de digestión)	26
3.3.5.	Electroforesis de ADN en gel de agarosa.....	26
3.3.6.	Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida	26
3.3.7.	Cuantificación de proteínas mediante micro-Bradford.....	26
3.4.	Obtención del plásmido pET22b(+)/AcAChBP	27
3.4.1.	Amplificación de AcAChBP	27
3.4.2.	Ligación molecular: inserción de AcAChBP en pET22b(+)	27
3.5.	Análisis de expresión de AcAChBP a mini-escala	27
3.5.1.	Inducción de la expresión.....	27
3.5.2.	Fraccionamiento subcelular.....	28
3.5.3.	Análisis de solubilidad	28
3.6.	Producción recombinante de AcAChBP	28
3.6.1.	Inducción de la expresión a midi-escala.....	28
3.6.2.	Extracción en condiciones desnaturizantes	29
3.6.3.	Purificación: cromatografía de afinidad acoplada a replegamiento oxidativo.....	29
3.6.4.	Concentración y cuantificación	29
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
4.1.	Obtención del plásmido pET22b(+)/AcAChBP	30
4.2.	<i>E. coli</i> BL21(DE3) no expresa AcAChBP	31
4.3.	<i>E. coli</i> Lemo21(DE3) expresa AcAChBP de manera eficiente	32
4.4.	AcAChBP se retiene en el citoplasma de <i>E. coli</i> Lemo21(DE3)	33
4.5.	AcAChBP es soluble en condiciones de lisis celular desnaturizantes	33
4.6.	Purificación de AcAChBP	34
5.	CONCLUSIONES	37
6.	BIBLIOGRAFÍA	38

Índice de Figuras y Tablas

Figura 1-1. Tipos de receptores.	11
Figura 1-2. Etapas de la liberación de neurotransmisores.	13
Figura 1-3. Estructura cristalográfica de AChR de <i>Torpedo californica</i>	15
Figura 1-4. Sistema de expresión y modulación de la polimerasa de ARN del bacteriófago T7 en <i>E. coli</i> : T7RNAP/T7LysY.	19
Figura 4-1. Análisis del producto de PCR AcAChBP.	30
Figura 4-2. Análisis de los productos de digestión con las endonucleasas NcoI y XhoI de las clonas pET22b(+)/AcAChBP.	31
Figura 4-3. Representación esquemática del plásmido pET22b(+)/AcAChBP.	31
Figura 4-4. Análisis de la expresión recombinante de AcAChBP en <i>E. coli</i> Lemo21(DE3).....	32
Figura 4-5. Análisis de localización subcelular de AcAChBP.....	33
Figura 4-6. Análisis de solubilidad de AcAChBP.	34
Figura 4-7. Purificación de AcAChBP mediante cromatografía de afinidad a níquel.	35
Figura 4-7. Análisis de formación de agregados.	35
Tabla 3-1. Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas.	24

Abreviaturas

°C	Grados centígrados (Celsius)
AcAChBP	Proteína de unión a acetilcolina de <i>Aplysia californica</i>
ACh	Acetilcolina
AChR	Receptor de acetilcolina
dNTPs	deoxirribonucleótidos trifosfatados
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GLRA1	Subunidad alfa 1 del receptor de glicina
GSSG	Glutación oxidado
h, min, s	Horas, minutos, segundos
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido
LB	Luria-Bertani
LsAChBP	Proteína de unión a acetilcolina de <i>Limnaea stagnalis</i>
M, mM, μ M	Molar, milimolar, micromolar
mL, μ L	Mililitros, microlitros
μ g, mg	microgramos, miligramos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Peso molecular
RACI	Receptores acoplados a canal iónico
RAPG	Receptores acoplados a proteína G
rpm	Revoluciones por minuto
kDa	Kilodaltons
pb, bp	Pares de bases
BrEt	Bromuro de etidio
UFC	Unidades formadoras de colonias

1. Introducción

1.1. Receptores y neurotransmisores

1.1.1. Clasificación y tipos de receptores

Los receptores son proteínas presentes en membranas, citoplasma, y núcleo de las células; que interactúan específicamente con ciertas moléculas (ligandos), tanto endógenas como exógenas, rindiendo como resultado un conjunto de reacciones que, posteriormente, conducirán hacia una respuesta fisiológica [Katzung *et al.*, 2013]. Existen diversos tipos de receptores, los cuales se clasifican de acuerdo con su mecanismo de acción y la velocidad con la que presentan respuesta (Figura 1-1) [Schatzberg y Nemeroff, 2006; Rang *et al.*, 2012].

1.1.2. Importancia fisiológica de los receptores

Una propiedad de las células vivas es su capacidad de reconocer y responder a estímulos externos. Para ello, los receptores celulares deben cumplir dos funciones esenciales: (1) reconocer a ligandos específicos, mediante afinidad, y (2) transmitir un mensaje, vía distintos procesos celulares [Schatzberg y Nemeroff, 2006]. La naturaleza de la respuesta puede ser variada y depende tanto del

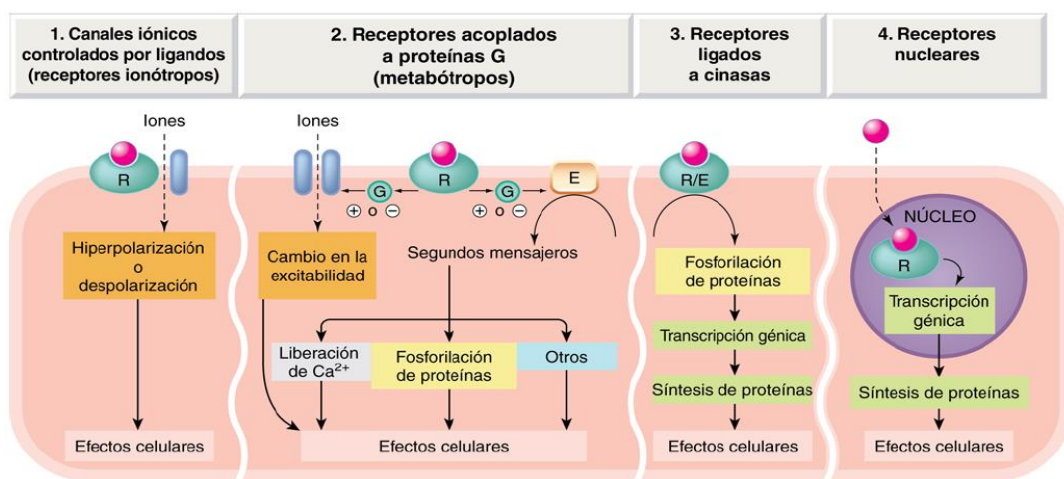


Figura 1-1. Tipos de receptores.
Imagen tomada de Rang *et al.* (2012).

receptor como del ligando; por ejemplo: (i) cambio en la permeabilidad de la membrana, o (ii) apertura de un canal iónico [Hernández *et al.*, 2011].

1.1.3. Neurotransmisores

Los neurotransmisores son moléculas (ligandos) liberadas por células nerviosas, durante la interacción neurona-neurona (sinapsis neuronal) o neurona-músculo (unión neuromuscular), se unen a receptores de membrana, y son responsables de la propagación de señales nerviosas. Los neurotransmisores son sintetizados tanto en el soma neural como en las terminaciones nerviosas, almacenados en vesículas sinápticas, y liberados en respuesta a un potencial de acción. Dependiente de la naturaleza de la unión neurotransmisor-receptor, la respuesta puede ser excitatoria o inhibitoria [Webster, 2001]. Una vez obtenida la respuesta deseada, el neurotransmisor puede ser recapturado por la neurona presináptica, degradado enzimáticamente, o transportado por difusión hacia líquido extracelular [Córdova, 2003].

1.1.4. Clasificación de los neurotransmisores

Existen variantes con relación a la clasificación; sin embargo, la más utilizada se basa en la estructura química del neurotransmisor [Webster, 2003; Martín *et al.*, 2005]:

1. Ésteres: acetilcolina, el primer neurotransmisor descubierto, es el más abundante en el sistema nervioso (SN); interviene en procesos del SN autónomo y en la unión neuromuscular; su síntesis es catalizada por la enzima colina acetiltransferasa, en tanto su degradación es mediada por la enzima acetilcolinesterasa.
2. Monoaminas: (i) *catecolaminas*, sintetizados a partir de tirosina (p. ej., adrenalina, noradrenalina, y dopamina); su función principal es la participación en procesos del SN simpático, activando los receptores adrenérgicos; (ii) *indolaminas*, sintetizados a partir de triptófano (p. ej., 5-hidroxitriptamina, 5-HT); presentes tanto en SN central como periférico, así como en el sistema cardiovascular; (iii) *aminas de imidazol*, sintetizadas a partir de histidina (p. ej., histamina); a diferencia de otros neurotransmisores, está presente a baja concentración en el cerebro; participa en procesos alérgicos y de inflamación.
3. Aminoácidos: en este grupo se distinguen dos tipos de neurotransmisores, (i) excitadores (p. ej., glutamato y aspartato), e (ii) inhibidores (p. ej., GABA y glicina).
4. Neuropeptidos: polipéptidos menores a 35 residuos de aminoácidos (p. ej., encefalinas, endorfinas, etc.); no pueden ser recapturados por la neurona presináptica, por lo que son eliminados vía

degradación enzimática; algunos están involucrados en procesos de percepción de dolor, actuando de manera similar a algunos agonistas opioides.

5. Purinas (adenosina y guanosina): actúan en el SN, tanto central como periférico; generalmente, acompañan a otro neurotransmisor, por lo tanto, su papel se considera secundario.

1.2. Fisiología de la interacción receptor-neurotransmisor

El neurotransmisor es liberado por una neurona presináptica y viaja a través del espacio sináptico para unirse a un receptor presente en la membrana postsináptica (Figura 1-2) [Córdova, 2003]. Cada neurotransmisor se une específicamente a un receptor (interacción específica) [Katzung *et al.*, 2013]. Los receptores que participan en este tipo de propagación se clasifican en dos grupos: (a) acoplados a canal iónico, RACI, y (b) acoplados a proteína G, RAPG, los cuales inducirán, de manera directa o indirecta, la apertura o cierre de un canal iónico específico [Webster, 2003]. Los RACI presentan una respuesta rápida y participan en mecanismos donde una acción inmediata es demandada, p. ej., la contracción de músculo estriado. De manera contraria, los RAPG presentan una respuesta más lenta y participan en mecanismos donde es requerida una acción a mediano o largo plazo, p. ej., el control sobre ganglios linfáticos y músculo liso.

El potencial eléctrico de una membrana celular está determinado por los iones presentes dentro y fuera de ella [Rang *et al.*, 2012]. Al presentarse la interacción neurotransmisor-receptor, dos tipos de respuesta pueden ocurrir: (a) en caso de un neurotransmisor excitatorio se producirá la apertura de canales de Na^+ , Ca^{++} , y K^+ , lo cual producirá una despolarización de la membrana, generando el potencial

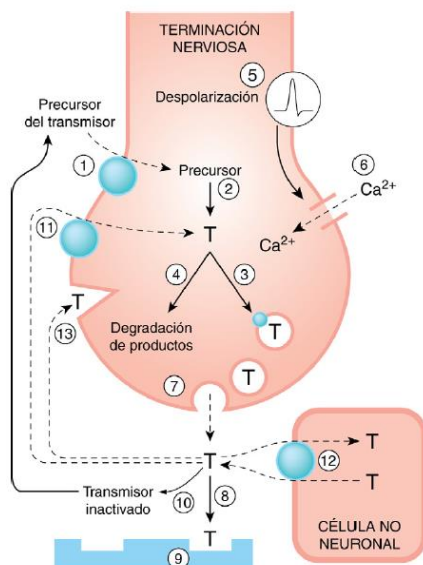


Figura 1-2. Etapas de la liberación de neurotransmisores.

Se distingue la síntesis del neurotransmisor y almacenamiento en vesículas, la entrada de calcio (durante el potencial de acción) liberando el neurotransmisor, la unión al receptor (para generar la respuesta), la degradación o recaptura por la neurona presináptica. Imagen tomada de Rang *et al.* (2012).

de acción; y (b) en caso contrario, un neurotransmisor inhibitorio inducirá la apertura de canales de Cl^- , produciendo una hiperpolarización de la membrana [Córdova, 2003].

1.3. Patologías humanas asociadas a receptores de neurotransmisores

En humanos, existen enfermedades asociadas a numerosas anormalidades relacionadas con los receptores de neurotransmisores. Aunque las causas pueden ser diversas, dos mecanismos son los más frecuentes: (i) anticuerpos dirigidos contra receptores y (ii) mutaciones en los genes que los codifican [Rang *et al.*, 2012]. Una enfermedad muy reconocida, la esclerosis lateral amiotrófica, se caracteriza por una deficiencia en la recaptación de glutamato (por parte de la célula presináptica), el cual se acumula en el espacio sináptico (generando toxicidad) y provoca la destrucción de neuronas motoras y, por ende, pérdida de la movilidad muscular. En otra patología, la encefalitis de Rassmussen, se generan anticuerpos contra los receptores de glutamato que bloquean el canal iónico, lo que conduce a la pérdida de la coordinación motora y convulsiones. En una enfermedad poco común, la hiperekplexia hereditaria, se reconoce un mal funcionamiento del receptor de glicina debido a una mutación en el gen *GLRA1*, que codifica para la subunidad $\alpha 1$ del receptor, lo que ocasiona rigidez muscular y sobresaltos excesivos ante mínimos estímulos [García *et al.* , 2012].

1.4. Receptor de acetilcolina (AChR)

Los receptores de acetilcolina (AChR) son RACI involucrados en el paso de iones hacia el interior de la célula y están modulados por el neurotransmisor acetilcolina (ACh). Debido a su participación en diferentes condiciones fisiopatológicas, son considerados como dianas terapéuticas prometedoras para el control de diversas enfermedades neurológicas en humanos [Conolly *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2005].

Los AChR están conformados por 5 subunidades, iguales o diferentes, adoptando conformaciones homo- o hetero-pentaméricas. A la fecha, se conocen 17 subunidades homologas: $\alpha 1$ - $\alpha 10$, $\beta 1$ - $\beta 4$, γ , δ y ϵ , que pueden integrar un pentámero y formar un canal [Kouvatsos *et al.*, 2014]. Cada subunidad está conformada por tres dominios: extracelular (ECD, N-terminal), transmembranal (TMD, constituido por cuatro helices), e intracelular (ICD, C-terminal) (Figura 1-3) [Lazaridis *et al.* , 2013].

Los AChR son miembros de la superfamilia de canales iónicos regulados por ligando (CIRL) del tipo *Cys-loop*, a la que también pertenecen los receptores de GABA, glicina, y serotonina. De manera interesante, esta familia se caracteriza por la presencia de una estructura tipo asa (*loop*) muy conservada, de 13 residuos de aminoácidos y flanqueada por dos cisteínas, ubicada en el dominio N-terminal de cada subunidad [Zouridakis *et al.*, 2009].

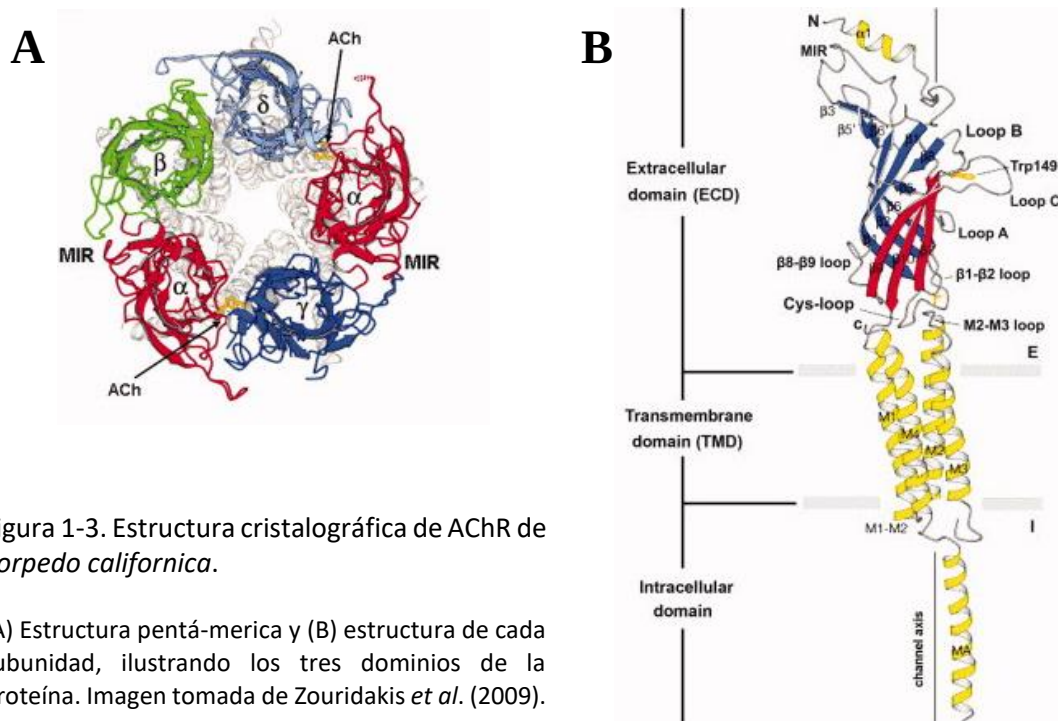


Figura 1-3. Estructura cristalográfica de AChR de *Torpedo californica*.

(A) Estructura pentá-merica y (B) estructura de cada subunidad, ilustrando los tres dominios de la proteína. Imagen tomada de Zouridakis *et al.* (2009).

1.4.1. Tipos de AChR

AChR_M (receptores muscarínicos). Están acoplados a proteína G y participan en la acción de ACh sobre músculo liso, corazón y glándulas. Los *AChR_M* se subdividen en 3 grupos: (i) M1, presentes en la corteza cerebral y ganglios autónomos, son considerados excitatorios (ya que disminuyen la entrada de K^+); (ii) M2, presentes principalmente en el corazón, son considerados inhibitorios (ya que aumentan la entrada de K^+); y (iii) M3, presentes en el musculo liso y ganglios, son similares a los M1 [Cardinali, 1992].

AChR_N (receptores nicotínicos). Están asociados a canal iónico; por lo tanto, su respuesta es más rápida que los *AChR_M*. Al unirse la ACh, el canal permite la entrada de Na^+ a la célula, generando una despolarización y dando lugar a una respuesta fisiológica. Adicionalmente, los *AChR_N* se subdividen en dos tipos: musculares (*AChR_{Nm}*) y neuronales (*AChR_{Nn}*). Los *AChR_{Nm}* están presentes en la unión neuromuscular y se componen de un pentámero α - α - β - δ - γ , donde cada subunidad α contiene un sitio de unión a ACh. Después de la unión *AChR_{Nm}*-ACh, el canal iónico se abre, permitiendo la entrada de cationes (Na^+ , K^+ , y Ca^{++}) evitando el paso de aniones, lo que a su vez deja el exterior del canal cargado negativamente [López, J., 2013]. Los *AChR_{Nn}* están presentes en el SN central, ganglios autonómicos, y médula adrenal; aunque su papel principal lo juegan en la transmisión colinérgica del SN. Los *AChR_{Nn}* están conformados por arreglos de cinco monómeros similares (homo-pentámero) o diferentes (hetero-pentámero) a partir de ocho subunidades α (α_2 - α_7 , α_9 , α_{10}) y tres β (β_2 - β_4), siendo el arreglo α_4/β_2 el más

abundante en el SN central. De manera interesante, la presencia de las distintas subunidades en el pentámero es lo que determinará la afinidad y función del receptor [Gallego *et al.*, 2012].

1.4.2. Respuesta fisiológica de la unión AChR-ACh

Después de la interacción receptor-neurotransmisor, la respuesta fisiológica puede presentarse en diversas maneras; donde destacan la contracción muscular, el aprendizaje, y la memoria. De manera sorprendente, la respuesta también está determinada por la localización de los AChR [Gahring *et al.*, 2005; Zouridakis *et al.*, 2009]. Por ejemplo, si ACh se une a un receptor presente en una neurona presináptica, el canal iónico se abre y permite la entrada selectiva de ciertos cationes (Na^+ , K^+ , y Ca^{++}), lo que genera una despolarización de la membrana celular. En el caso de los receptores ubicados en la unión neuromuscular, la despolarización se extiende a células vecinas, produciendo un potencial de acción que, al propagarse a las fibras neuromusculares, genera una contracción muscular [Rang *et al.*, 2012].

1.4.3. Patologías relacionadas a AChR

Miastenia gravis. Es una enfermedad autoinmune caracterizada principalmente por la presencia de anticuerpos dirigidos contra los AChR [Lazardis *et al.*, 2013; Ohno *et al.*, 2017]. La disminución de AChR funcionales afecta en mayor medida a los músculos estriados, dando como resultado un cuadro clínico característico: debilidad muscular y fatiga, disminución de la capacidad de habla y deglución, casos de afección a músculos respiratorios y disminución de la capacidad respiratoria (lo que pone en riesgo la vida del paciente) [Romi *et al.*, 2017].

Alzheimer (AD). En estudios post-mortem, se ha reportado una disminución de AChR, ChT (transportadores de colina) y ChAT (colina-acetiltransferasa) en cerebros de pacientes con AD [Kem, W., 2000]. Aunque no existen estudios que demuestren la asociación AChR-AD, se sabe que la proteína AChR se expresa en regiones cerebrales implicadas en tareas de memoria, concentración, y procesamiento de información sensorial, lo que permite inferir una posible contribución al desarrollo de AD [Vallés *et al.*, 2014].

Síndrome de Tourette (TS). Aunque la etiología no está esclarecida, TS ha sido asociado a un aumento de la actividad del sistema dopaminérgico. De manera interesante, se ha observado que la administración de nicotina reduce los síntomas, de ahí la relación AChR-TS [Quik *et al.*, 2014].

Esquizofrenia y otros. En la esquizofrenia, una región del hipocampo deficiente de AChR está afectada, ocasionando una alteración en la percepción de estímulos auditivos [Barrantes, F. 1998]. Otros padecimientos asociados a AChR son: (i) la adicción al tabaco, (ii) la enfermedad de Parkinson, (iii) la depresión, y (iv) el trastorno de déficit de atención e hiperactividad [Shahsavari *et al.*, 2016].

1.4.4. Farmacología de AChR

Los AChR son considerados importantes dianas terapéuticas para el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos a tratar el deterioro cognitivo, la epilepsia, la dependencia a nicotina, el dolor, y la enfermedad de Alzheimer, entre otros [Lin *et al.*, 2016]. Las estructuras cristalográficas resueltas para proteínas de unión a acetilcolina (AChBP), de diversos moluscos, han mostrado que el sitio de unión a ACh se encuentra localizado en las subunidades α , ya que éstas cuentan con una horquilla estructuralmente única, *Cys loop*, caracterizada por dos cisteínas separadas por 12 aminoácidos [Albuquerque *et al.*, 2009; Zouridakis *et al.*, 2009]. Como se mencionó anteriormente, el ligando fisiológico de los AChR es ACh; sin embargo, pueden unirse otros ligandos, ya sean agonistas (nicotina, lobelina y epibatidina) o antagonistas (tubocurarina y pancuronio) [Rang *et al.*, 2012].

1.5. AChBP de *Aplysia californica* (AcAChBP) como modelo de AChR

La estructura cristalográfica de AcAChBP fue resuelta y reportada en el año 2005. Desde ese momento, ha sido considerada como modelo del dominio de unión a ligando de AChR, tanto por su homología estructural como funcional [Brejc *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2016; Shahsavar *et al.*, 2016].

1.5.1. Estructura de AcAChBP

El precursor de la proteína AcAChBP tiene una longitud de 236 aminoácidos y un peso molecular teórico de 26.57 kDa (UniProt Q8WSF8). La estructura primaria es homóloga a la subunidad α_7 de mamíferos (similitud 42.9%) [Lin *et al.*, 2014], y la conformación homo-pentamérica presenta 5 sitios de unión a ligando [Shahsavar *et al.*, 2016].

Cada subunidad de la proteína madura (217 aminoácidos; 24.61 kDa) contiene dos enlaces disulfuro (Cys144-Cys157; Cys207-Cys208), importantes para mantener su estructura nativa. La estructura secundaria contiene 2 α -hélices y 10 hojas β -plegadas. La estructura terciaria se caracteriza por el denominado *núcleo hidrofóbico* (Figura 1-3B), conformado por las horquillas (*loops*) A, B, C, β 1- β 2, β 8- β 9, el característico *Cys loop* y la región denominada *MIR* (inmunogénica) [Zouridakis *et al.*, 2009; Hansen *et al.*, 2005].

1.5.2. Ensayos con AcAChBP

Los ensayos con AcAChBP obtenida mediante expresión recombinante en células HEK 293 corroboraron la formación de un pentámero, mediante cromatografía de exclusión molecular; además, se observó que muestra una alta afinidad por α -conotoxina [Hansen *et al.*, 2004], y es susceptible a cambios conformacionales cuando se une a otros ligandos [Hansen *et al.*, 2005]. De manera adicional, esta proteína ha sido ampliamente utilizada en ensayos radiométricos usando a epibatidina como ligando

radiomarcado [Hibbs *et al.*, 2009]. De manera alternativa, se ha implementado un ensayo fluorométrico utilizando a derivados de anabaseina como ligandos fluorogénicos [Talley *et al.*, 2006].

1.5.3. Expresión heteróloga en levaduras y bacterias

Diversos sistemas de expresión recombinante de proteínas utilizan a levaduras y bacterias como células hospederas, ya que éstas ofrecen como ventaja una alta capacidad de proliferación en medios de cultivo económicos. Además, las levaduras, p. ej., *Pichia pastoris*, tienen la habilidad celular de realizar modificaciones post-traduccionales y favorecer el plegamiento correcto de proteínas [Porro, D. *et al.*, 2005]. Por otro lado, la bacteria *Escherichia coli* ofrece muchas ventajas fisiológicas, figurando su simpleza genética y bioquímica [Rosano & Ceccareli, 2014].

AcAChBP ha sido expresada tanto en levadura como en bacteria: (i) en *P. pastoris*, cepa GS115, fue secretada como proteína glicosilada (N-glucosilación en Asn91), obtenida correctamente plegada, y utilizada para cristalización [Celie *et al.*, 2004]; y en *E. coli*, cepa BL21(DE3), fue fusionada a ubiquitina para favorecer su solubilidad en el citoplasma bacteriano, obtenida correctamente plegada, y utilizada en ensayos de unión [Abraham *et al.*, 2016].

1.6. *E. coli* como modelo bacteriano de expresión heteróloga de proteínas

1.6.1. *E. coli* como modelo: genética y bioquímica

E. coli es un bacilo Gram-negativo que forma parte de la microbiota del intestino humano. Las cepas utilizadas en investigación son inocuas y han sido modificadas genéticamente para diversas aplicaciones científicas. En la actualidad, las cepas mayormente utilizadas provienen de dos ancestros: el linaje B (p.ej., BL21) y el linaje K-12 (p.ej., MG1655) [Schlegel, 2013]. Su genoma (4.6×10^6 pb) está contenido en un solo cromosoma circular y codifica para alrededor de 4,300 proteínas [Jiménez & Merchant, 2003]. Su transcripción génica constitutiva depende de la interacción de una ARN polimerasa con la región promotora del gen. Sin embargo, su transcripción regulada requiere de la participación adicional de proteínas moduladoras y las correspondientes regiones de respuesta, p.ej. la proteína represora LacI y la región operadora *lacO*. Con esto último, regula la expresión de genes codificantes para enzimas de la misma ruta metabólica mediante sistemas de control global (denominados operones), p. ej., el operón *lac*, importante para el catabolismo de lactosa [Jawetz *et al.*, 2011].

1.6.2. Sistema de expresión y modulación *T7RNAP/T7LysY* en *E. coli*

La producción recombinante de proteínas en *E. coli* depende de dos elementos clave: primero, un vector de expresión, donde la secuencia nucleotídica de interés (p.ej. región codificante del gen) será

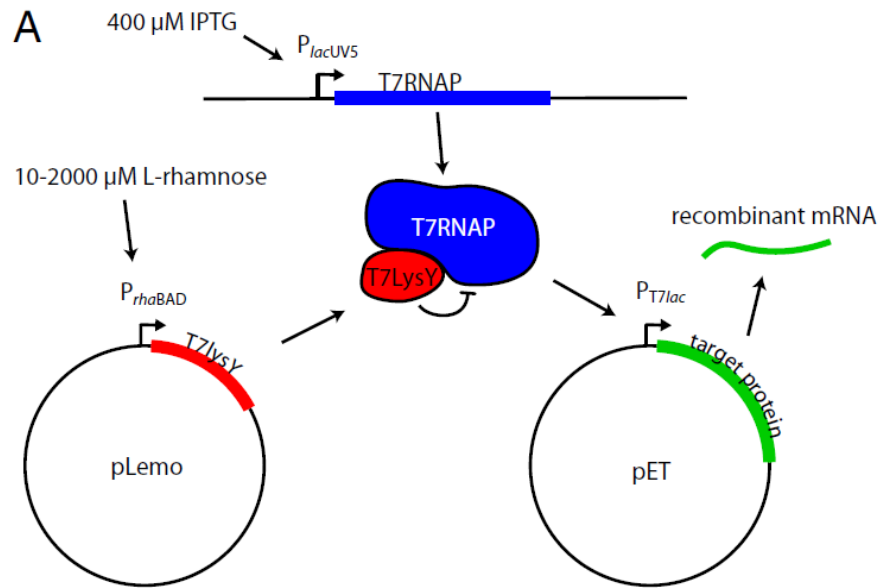


Figura 1-4. Sistema de expresión y modulación de la polimerasa de ARN del bacteriófago T7 en *E. coli*: *T7RNAP/T7LysY*.

Imagen tomada de www.neb.com.

clonada bajo el control un promotor inducible; segundo, una cepa productora, donde el plásmido recombinante será hospedado. Tanto el vector de expresión como la cepa productora deben ser seleccionados de acuerdo con las condiciones de expresión deseadas: (i) compartimiento de expresión, p.ej., citosol o periplasma; (ii) inductor, p.ej., IPTG o arabinosa; y (iii) etiqueta de purificación, p.ej. 6xHis, GST o MBP.

El sistema de expresión y modulación de la polimerasa de ARN del bacteriófago T7, *T7RNAP* (Figura 1-4), fue desarrollado con el objetivo de reducir la toxicidad producida por la sobreexpresión de proteínas membranales en *E. coli*. Habitualmente, el sistema pET (desarrollado por Novagen®) utiliza a la cepa hospedera BL21(DE3), la cual porta el lisógeno λ DE3 con una copia del gen codificante para la *T7RNAP* bajo en control del promotor quimérico *lacUV5* (inducible por IPTG y reprimible por LacI). En condiciones típicas de expresión (p.ej., 400 μ M de IPTG), la cepa transcribe 8 veces más rápido la *T7RNAP*, lo que favorece altos rendimientos de proteína recombinante. Sin embargo, esta sobreexpresión puede resultar tóxica, repercutiendo en los rendimientos globales de producción. Ante este problema, inicialmente se desarrollaron los vectores pLyS y pLysE, que expresan constitutivamente a la lisozima del bacteriófago T7 (*T7LysY*), un inhibidor natural de la *T7RNAP*. Para mejorar el nivel de regulación del inhibidor, recientemente se desarrolló el vector pLemo, que expresa de manera modulada a la *T7LysY*

bajo el control del promotor de ramnosa (*rhaBAD*). Actualmente, la cepa Lemo21(DE3) está disponible para fines de expresión modulada de proteínas, donde la expresión de la *T7RNAP* puede ser finamente modulada a concentraciones específicas de ramnosa (donde el nivel de expresión no sea tóxico) [Wagner *et al.*, 2008].

1.6.3. Expresión en compartimentos de *E. coli*

A nivel de la organización celular, *E. coli* posee dos sistemas membranosos (interno y externo) que delimitan sus principales compartimentos subcelulares: citosol y periplasma. La membrana interna separa el citosol y el periplasma, y la membrana externa funge como frontera entre el periplasma y el medio extracelular. Mientras que la síntesis de proteínas y otros procesos bioquímicos importantes ocurren en el citosol; la síntesis del peptidoglucano, el transporte de nutrientes, y el plegamiento y degradación de proteínas se llevan a cabo en el periplasma [Schlegel, 2013].

De manera general, los procesos intracelulares suceden en una de dos posibles condiciones redox: (1) reductoras en el citosol, mantenidas por sistemas como tiorredoxina/tiorredoxina-reductasa, glutatión/glutatión-reductasa, y glutarredoxina/glutarredoxina-reductasa; y (2) oxidantes en el periplasma, mantenidas por un conjunto de oxidorreductasas y chaperonas. Con esto, es posible asumir que el ambiente fisiológico del citosol favorece la producción recombinante de proteínas con cisteínas reducidas (tiol libre), siendo útil para la expresión y localización de proteínas que demanden esa condición estructural. Por otro lado, las condiciones fisiológicas del periplasma promueven la producción recombinante de proteínas con cisteínas oxidadas (disulfuro), siendo importante para la expresión y localización de proteínas cuya estructura y función exijan un plegamiento oxidativo correcto [Schumann & Ferreira, 2004].

1.7. El periplasma de *E. coli* como sistema de expresión de AcAChBP

Existen varias razones por las que el periplasma de *E. coli* es un compartimento ideal para la expresión de proteínas: (1) un ambiente que favorece un plegamiento oxidativo correcto, (2) una mayor probabilidad de expresión soluble, (3) una menor cantidad de proteínas periplásmicas nativas, (4) una menor posibilidad de degradación, y (5) una mayor eficiencia de extracción y purificación de proteínas, en comparación con lisados totales o extractos citosólicos [Sokolosky & Szoka, 2013].

De manera específica, el periplasma de *E. coli* contiene oxidorreductasas que catalizan la formación correcta de enlaces disulfuro en polipéptidos sustrato mediante dos vías claramente establecidas: oxidación e isomerización. La oxidación de dos tioles libres de cisteína comprometidas en un enlace disulfuro es asistida por la enzima DsbA (oxidada), que al interactuar con el polipéptido

sustrato se reduce (DsbA reducida). Para recuperar su estado oxidado, DsbA (reducida) se convierte en sustrato de la enzima DsbB oxidada, la cual se mantiene siempre en ese estado gracias a un mecanismo de oxidación constitutivo de membrana interna (vía ubiquinona). Sin embargo, en polipéptidos sustratos con múltiples enlaces disulfuro o con enlaces de cisteínas no consecutivas, DsbA puede formar enlaces disulfuro incorrectos, lo que es corregido por un mecanismo de isomerización catalizado por la enzima DsbC, o DsbG (en menor grado) [Schumann & Ferreira, 2004].

Algunos vectores de expresión están diseñados para exportar la proteína recombinante al compartimento periplásmico, con la finalidad de favorecer su solubilidad y plegamiento. La familia de plásmidos pET ha sido ampliamente utilizada para la expresión recombinante de proteínas en *E. coli*, tanto en citosol como en periplasma. De manera interesante, la secuencia codificante para el péptido señal de la proteína PelB (Pectato Liasa B de *Erwinia carotovora*) ha rendido excelentes resultados en la exportación de proteínas heterólogas hacia el periplasma de *E. coli* [Sokolosky & Szoka, 2013].

2. Hipótesis y Objetivo

2.1. Hipótesis

El mecanismo de regulación bacteriana *T7RNAP/T7LysY* es un sistema eficiente para la producción recombinante de la AcAChBP en el periplasma de *E. coli*.

2.2. Objetivo general

Emplear el vector pET22b(+) y la bacteria *E. coli* Lemo21(DE3) como sistema de producción recombinante de la AcAChBP, mediante una estrategia de expresión en el periplasma y purificación a partir de extractos bacterianos.

2.3. Objetivos específicos

1. Obtener el plásmido pET22b(+)/AcAChBP mediante técnicas de clonación molecular.
2. Obtener células de *E. coli* Lemo21(DE3) que expresen a la AcAChBP mediante transformación bacteriana y análisis de lisados totales.
3. Determinar la localización de la AcAChBP mediante análisis de fracciones subcelulares.
4. Determinar la solubilidad de la AcAChBP mediante análisis de lisados bacterianos obtenidos en diferentes condiciones.
5. Obtener un procedimiento estándar para la producción recombinante de la AcAChBP mediante ensayos de expresión inducida, solubilización en condiciones desnaturalizantes y purificación por afinidad a níquel acoplada a replegamiento oxidativo en columna.
6. Obtener la AcAChBP pura mediante ensayos de producción recombinante a media escala.

3. Materiales y Métodos

3.1. Reactivos biológicos y químicos

3.1.1. Reactivos químicos y bioquímicos

Amresco: cloruro de sodio (NaCl). *Becton Dickinson*: agar bacteriológico; extracto de levadura; triptona. *Biorad*: azul brillante de *Coomassie*; agarosa; solución de acrilamida/bis-acrilamida al 30%. *EM Science*: 2-mercaptoetanol. *JT Baker*: ácido acético; urea. *MP Biomedicals*: glicina. *New England Biolabs*: deoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs); estándares para electroforesis de proteínas (*Blue Protein Standard - Broad Range, 11-190 kDa*); marcadores de PM para electroforesis de ADN (λ DNA-*HindIII*; *100-bp DNA Ladder*). *Productos Químicos Monterrey*: cloruro de calcio (CaCl₂); ácido etilendiamino-tetra-acético (EDTA). *Qiagen*: resina de agarosa-NTA-níquel. *Scientific Industries*: perlas de vidrio (0.1 mm). *Shelton Scientific*: dodecil sulfato de sodio (SDS); Tris (tris-[hidroximetil]-aminometano); glicerol; Tritón X-100. *Sigma*: ampicilina; azul de bromofenol; azul de xilencianol; bromuro de etidio; cloramfenicol; glutatión oxidado (GSSG); imidazol; isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG); reactivo de Bradford; reactivo *CellLytic B*.

3.1.2. Enzimas y estuches comerciales

La polimerasa de ADN de la bacteria *Pyrococcus furiosus* (*Pfu* ADN-pol) y su solución 10X del amortiguador se adquirieron de *Agilent*. La fosfatasa alcalina de becerro recombinante (*bCIP*) se obtuvo de *Boehringer Mannheim*. La ligasa de ADN del bacteriófago T4 (T4 ADN-ligasa) y su solución 10X del amortiguador, las endonucleasas *NcoI* y *XhoI*, y la solución 10X del amortiguador NEB2 se consiguieron de *New England Biolabs*. Los estuches comerciales utilizados para la mini-purificación de ADN plasmídico (*QIAprep® Spin Miniprep Kit*) y de productos de PCR (*QIAquick® PCR Purification Kit*) fueron comprados a *Qiagen*.

3.1.3. Células bacterianas y medios de cultivo

Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo se enlistan en la Tabla 3-1. ER2738 se utilizó como hospedera en la construcción y clonación molecular del plásmido pET22b(+)/AcAChBP. BL21(DE3) y Lemo21(DE3) se emplearon como hospederas en los ensayos de expresión y producción recombinante de AcAChBP. Todas células bacterianas fueron cultivadas en medio *Luria Bertani* (LB) líquido (1% de triptona; 0.5% de extracto de levadura; 1% de NaCl).

Tabla 3-1. Cepas de *E. coli* utilizadas.

Cepa	Genotipo	Fuente
ER2738	F' <i>proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15 zzf::Tn10(Tet^R)/fhuA2 glnV Δ(lac-proAB)</i>	New England Biolabs
BL21(DE3)	<i>thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5 fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS</i>	Novagen
Lemo21(DE3)	<i>λ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i> <i>BL21(DE3)/pLemo (Cam^R)</i> <i>pLemo = pACYC184-PrhaBAD-lysY</i>	New England Biolabs

Todas las cepas se obtuvieron de la reserva de productos biológicos del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería (UABC).

3.1.4. Plásmidos: pET22b(+) y pEYebF-R12

El plásmido comercial pET22b(+) (Novagen) se utilizó como vector parental en la producción recombinante de AcAChBP en el periplasma de *E. coli*. El plásmido contiene los orígenes de replicación ColE1 (para bacterias) y f1 (para bacteriófagos filamentosos), las secuencias de regulación (promotora y terminadora) de la *T7RNAP*, y los genes codificantes para la proteína represora LacI y la enzima β-lactamasa (que confiere resistencia a ampicilina). Además, bajo el control de la secuencia promotora de la *T7RNAP* contiene la secuencia codificante para la señal N-terminal de la proteína Pectato Liasa (PelB), que favorece la exportación al periplasma, y una etiqueta molecular de 6 histidinas (6xHis), que permite la purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad a metales (IMAC). El plásmido recombinante pEYebF-R12 se utilizó como molde para la amplificación de la secuencia nucleotídica codificante para AcAChBP. El plásmido es filial de pET22b(+) y contiene la fusión génica YebF-AcAChBP bajo el control de la secuencia promotora de la *T7RNAP* (en fase con la señal PelB, pero con la etiqueta 6xHis fuera de fase). Ambos plásmidos se obtuvieron de la reserva de productos biológicos del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería (UABC).

3.2. Equipos y programas computacionales

Las amplificaciones moleculares se completaron en un termociclador *Gradient Thermal Cycler Multigene* (Labnet International Inc.), La fotodocumentación de fragmentos de ADN teñidos con bromuro de etidio se llevó a cabo en un sistema *Gel Doc™ EZ Imager* (Biorad). Los cultivos bacterianos se propagaron en incubadoras con ambiente controlado: *Incubator Shaker Series 25* (New Brunswick Scientific Co.) y *Boekel Mini Incubator* (Boekel Industries Inc.). La incubación en microtubos se realizó en un bloque térmico *Digital Dry Heat Block* (VWR). Las separaciones en bajo volumen (< 2 mL) se efectuaron en micro-centrífugas: *Biocentrifuge Fresco* (Heraeus), y *MiniSpin® Plus* (Eppendorf). Las separaciones en alto volumen (> 10 mL) se realizaron en una centrífuga *Allegra™ X-22R* (Beckman Coulter). La lisis celular se completó en un sonicador *Ultrasonic Liquid Processor XL-2000* (Misonix). Las lecturas de absorbancia en micro-ensayos se lograron mediante un espectrofotómetro *Microplate*

Reader 680 (Biorad). Las lecturas de fluorescencia en micro-ensayos se adquirieron mediante un espectrofluorómetro *Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Varian)*. Todos los resultados obtenidos fueron analizados con el paquete computacional para tratamiento estadístico de datos *Prism®* v.4 para Windows (*GraphPad*). La construcción *in silico* y la representación esquemática de los plásmidos se obtuvo usando los programas computacionales libres (de dominio público) *Serial Cloner* (<http://serialbasics.free.fr>) y *SnapGene® Viewer* (<http://www.snapgene.com>).

3.3. Protocolos generales

3.3.1. Cultivos bacterianos

Todas las cepas bacterianas se cultivaron en medio LB suplementado con los antibióticos requeridos: ampicilina (150 µg/mL) y cloramfenicol (15 µg/mL). Cada cultivo (independiente) se preparó inoculando una colonia bacteriana en 2 mL de medio selectivo. De manera alternativa, se prepararon mediante sub-cultivos 1:100. Los cultivos bacterianos se propagaron mediante incubación durante la noche (12-14 h) a 37 °C con agitación constante (300 rpm), y se preservaron en refrigeración por plazos no mayores a 2 meses.

3.3.2. Preparación de bacterias competentes

Las bacterias competentes para transformación mediante choque térmico se prepararon usando un protocolo estándar de laboratorio [Sambrook *et al.*, 2001]. A partir de 1 mL de cultivo joven (0.4-0.8 UDO₆₀₀) se obtuvo la fracción celular mediante centrifugación leve (5 min; 5,000 rpm; 10°C). Enseguida, el paquete bacteriano se lavó con 0.5 mL de agua destilada fría y se acondicionó 0.5 mL de solución 100 mM de CaCl₂ fría (ambos tratamientos procedieron mediante resuspensión celular, centrifugación leve e incubación durante 5 min en hielo). Finalmente, las bacterias se resuspendieron en 0.1 mL de solución 100 mM de CaCl₂ fría y se mantuvieron en hielo durante 5 min.

3.3.3. Transformación bacteriana

Inicialmente, la muestra de ADN: plásmido puro (1 µL) o mezcla de ligación (2 µL), se adicionó a una suspensión de bacterias competentes. Después de 30 min en hielo, la mezcla ADN/bacterias se sometió a un procedimiento típico de choque térmico (1.5 min a 42 °C; 5 min en hielo). Inmediatamente, las bacterias transformadas se recuperaron en 1 mL de medio 2X YT (1% de triptona, 1% de extracto de levadura, 0.5% de NaCl) y se incubaron a 37 °C durante 1 h. La selección de transformantes estables se realizó mediante sembrado en superficie de medio LB sólido, suplementado con el (los) antibiótico(s) requerido(s), e incubación a 37 °C durante la noche (12-16 h).

3.3.4. Mini-purificación de ADN (plásmidos, productos de *PCR*, y fragmentos de digestión)

El ADN plasmídico y los fragmentos de ADN (obtenidos mediante amplificación molecular o digestión endonucleolítica) se purificaron siguiendo los protocolos típicos proporcionados por el fabricante de los estuches *QIAprep® Spin Miniprep Kit* y *QIAquick® PCR Purification Kit* (Qiagen).

3.3.5. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Las muestras de ADN (10 µL) se mezclaron con un décimo de su volumen (1 µL) de solución de carga para ADN (0.25% de azul de bromofenol; 0.25% de azul de xilencianol; 30% de glicerol). El volumen total se cargó en un gel de agarosa al 1%, suplementado con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) y preparado en solución 1X del amortiguador TAE (40 mM de Tris; 20 mM de ácido acético; 1 mM de EDTA). Los fragmentos de ADN se separaron mediante electroforesis en gel sumergido (en solución 1X del amortiguador TAE) durante 20-40 min a voltaje constante (100 V). El patrón de migración electroforética se analizó en un sistema fotodocumentador digital.

3.3.6. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida

Las muestras de proteínas se prepararon mediante mezclas 1:1 con solución 2X del amortiguador de carga para proteínas (10% de glicerol; 2.5% de SDS; 50 mM Tris-HCl, pH 6.8; 5% de 2-mercaptoetanol; 0.002% de azul de bromofenol). La desnaturalización térmica de proteínas se promovió mediante incubación a 95-100 °C durante 10 min. El volumen analítico (10 µL) de cada muestra se cargó en un gel SDS-poliacrilamida al 13.5%. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel sumergido (en solución 1X del amortiguador TANK: 25 mM de Tris; 200 mM de glicina; 0.1% de SDS) durante 90-120 min a voltajes constantes: 80 V (fase de concentración) y 120 V (fase de separación). El patrón de migración electroforética se analizó mediante la tinción con azul brillante de *Coomassie* y se documentó mediante fotografía digital.

3.3.7. Cuantificación de proteínas mediante micro-Bradford

De manera conveniente, las soluciones de proteína se diluyeron a una concentración de 10-40 µg/mL, usando agua destilada como diluyente. Habitualmente, se utilizaron 4 factores de dilución como prueba: 10, 25, 50 y 100. Paralelamente, se realizó una curva estándar usando diferentes concentraciones de BSA: 0, 10, 20, 30, 40 y 50 µg/mL. En una micro-placa de titulación, los volúmenes analíticos de las muestras de proteína (50 µL) se mezclaron con 100 µL del reactivo de Bradford. Después de 5 min de incubación a temperatura ambiente, las absorbancias a longitudes de onda de 450 y 595 nm (A_{450} , A_{595}) se registraron usando un lector de microplacas. La concentración de proteína fue determinada

interpolando la relación A_{450}/A_{595} de la muestra analítica en la curva estándar de BSA (A_{450}/A_{595} en función de $\mu\text{g/mL}$) y multiplicando por el factor de dilución utilizado.

3.4. Obtención del plásmido pET22b(+)/AcAChBP

3.4.1. Amplificación de AcAChBP

Una reacción de *PCR* (50 μL) se preparó en solución 1X del amortiguador para *Pfu* ADN-pol conteniendo 20 picomoles de cada oligonucleótido: ACHBPF11 (5'-cag tcg cca tgg cca ttc cca ggg cca acc tta tga gac tg -3') y ACHBPR11 (5'-cat ctc gag cga gtc aaa gag att cct gaa gc -3'), 0.2 mM de dNTPs, 2 μL de pEYebF-R12 (2-4 ng/ μL) y 1 μL de *Pfu* ADN-pol (2.5 U/ μL). La secuencia nucleotídica codificante para AcAChBP se amplificó en un termociclador, utilizando las siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización inicial [2 min a 94 °C], 45 ciclos de amplificación exponencial [20 seg a 94 °C; 20 seg a 55 °C; 60 seg a 72 °C], y 1 ciclo de extensión final [7 min a 72 °C]. El producto de *PCR* se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa.

3.4.2. Ligación molecular: inserción de AcAChBP en pET22b(+)

Inicialmente, el inserto [AcAChBP] y el vector [pET22b(+)] se trataron con las endonucleasas de restricción *Nco*I y *Xho*I, rindiendo fragmentos de ADN con extremos cohesivos-compatibles para inserción molecular en fase y unidireccional. Las reacciones de digestión se realizaron siguiendo las recomendaciones del proveedor (New England Biolabs). De manera simultánea, el vector se defosforiló usando una fosfatasa alcalina (*b*CIP, Roche Biochemicals). Ambos fragmentos puros se mezclaron en proporción 7:1 (7 μL de inserto y 1 μL de vector) y se suplementaron con 1 μL de solución 10X del amortiguador para T4 ADN-ligasa y 1 μL de T4 ADN-ligasa (400 U/ μL). La reacción se mantuvo en refrigeración (14-16 °C) durante la noche (12-14 h). El producto se utilizó para transformación bacteriana. El plásmido recombinante pET22b(+)/AcAChBP se aisló a partir de una transformante estable. La autenticidad del inserto se verificó mediante secuenciación automática de ADN.

3.5. Análisis de expresión de AcAChBP a mini-escala

3.5.1. Inducción de la expresión

Inicialmente, una suspensión bacteriana (10-20 μL) portadora del plásmido de interés se cultivó durante la noche en condiciones de proliferación celular [2 mL de medio LB, suplementado con el (los) antibiótico(s) de selección; 37 °C; 300 rpm]. Al día siguiente, se preparó un sub-cultivo (1:100) en 4 mL de medio fresco y se incubó durante 2 h a 37 °C y 300 rpm (fase de pre-inducción). Enseguida, se

suplementó con el inductor (IPTG) a una concentración final de 1 mM y se continuó la incubación durante 4 h (fase de sobreexpresión). Paquetes celulares, provenientes de 1 mL de cultivo, se colectaron mediante centrifugación (12,000 rpm; 2 min) y se almacenaron en congelamiento hasta su análisis.

3.5.2. Fraccionamiento subcelular

El paquete celular se resuspendió en 0.1 mL de solución amortiguadora TEX (50 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 3 mM de EDTA pH 8.0; 0.1% de Tritón X-100) usando un agitador para disrupción celular (5 min; 1,500 rpm). La extracción de proteínas periplásmicas se favoreció mediante incubación en hielo. Después de 30 min, la fracción soluble se aisló mediante centrifugación (13,000 rpm; 15 min; 10 °C). El sobrenadante (fracción periplásmica, FP) se conservó en hielo hasta su análisis. El precipitado se resuspendió en 0.1 mL de solución amortiguadora TEX y se agitó vigorosamente en disruptor celular (3,000 rpm) durante 5 min (la ruptura de membranas se garantizó incorporando perlas de vidrio a la suspensión). La fracción solubilizada se obtuvo mediante centrifugación (13,000 rpm; 15 min; 10 °C). El sobrenadante (fracción citosólica, FC) se conservó en hielo hasta su análisis.

3.5.3. Análisis de solubilidad

Tres soluciones se utilizaron para verificar la solubilidad de AcAChBP: (1) desnaturizante (8 M de urea; 100 mM de Tris-HCl, pH 8.0); (2) nativa (1% de Tritón X-100; 100 mM Tris-HCl, pH 8.0); y (3) reactivo *CellLytic*TM B de Sigma. Una pastilla celular se resuspendió en 100 µL de cada solución. La disrupción celular se favoreció mediante agitación vigorosa (5 min; 3,000 rpm) en presencia de perlas de vidrio (0.1 mm). Las fracciones solubles (FS) se separaron mediante centrifugación (14,500 rpm; 15 min) y se conservaron en hielo hasta su análisis. Las fracciones insolubles (FI) se resuspendieron en 100 µL de solución desnaturizante y se agitaron vigorosamente en disruptor (5 min; 3,000 rpm). Las FI, solubilizadas en urea, se separaron mediante centrifugación (14,500 rpm; 15 min). Todas las fracciones (FS y FI) se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

3.6. Producción recombinante de AcAChBP

3.6.1. Inducción de la expresión a midi-escala

Inicialmente, una suspensión bacteriana (10-20 µL) de la cepa Lemo21(DE3) portadora de pET22b(+)/AcAChBP se cultivó durante la noche en condiciones de proliferación celular [2 mL de medio LB, suplementado con ampicilina y cloramfenicol; 37 °C; 300 rpm]. Al día siguiente, se prepararon sub-cultivos (1:100) en 100 mL del medio selectivo y se incubó durante 2 h a 37 °C y 300 rpm. Enseguida, se suplementaron con el inductor (IPTG) a una concentración final de 0.5 mM y se

continuó la incubación durante 4 h a 37 °C y 300 rpm (alternativamente: 18 h a 30 °C y 300 rpm). Paquetes celulares, provenientes de 100 mL de cultivo, se colectaron mediante centrifugación (9,000 rpm; 15 min; 30 °C) y se almacenaron en congelación hasta la fase de extracción.

3.6.2. Extracción en condiciones desnaturalizantes

El paquete celular se resuspendió en 5 mL de solución desnaturalizante (8 M de urea; 100 mM de Tris-HCl, pH 8.0) usando un agitador tipo vórtex (1-2 min). Enseguida, la extracción y solubilización de proteínas se favoreció mediante un procedimiento típico de sonicación (10 pulsos: 30 seg ON, 30 seg OFF; en hielo). La fracción soluble se aisló mediante centrifugación (9,500 rpm; 15 min; 10 °C) y se clarificó mediante micro-centrifugación (13,000 rpm; 15 min; 10 °C). El extracto clarificado se conservó en refrigeración hasta la fase de purificación.

3.6.3. Purificación: cromatografía de afinidad acoplada a replegamiento oxidativo

Inicialmente, se preparó una columna conteniendo 0.5 mL (un volumen) de colchón de resina de agarosa-NTA-níquel (ambientada con solución desnaturalizante). El extracto clarificado se cargó a la columna y se pasó tres veces a través de la resina. Enseguida, el replegamiento oxidativo en columna se favoreció lavando la resina con 15 volúmenes de solución RO-10 (50 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 150 mM de NaCl; 1 mM de GSSG; 10 mM de imidazol, pH 8.0), seguidos de 15 volúmenes de solución RO-20 (50 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 150 mM de NaCl; 1 mM de GSSG; 20 mM de imidazol, pH 8.0). Finalmente, la proteína recombinante (AcAChBP) se obtuvo en fracciones de 1 volumen mediante elución con solución RO-E (50 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 150 mM de NaCl; 1 mM de GSSG; 250 mM de imidazol, pH 8.0). La eficiencia de la purificación se verificó mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (al 13.5%) de muestras analíticas obtenidas durante todo el proceso.

3.6.4. Concentración y cuantificación

Las fracciones de elución con mayor cantidad de proteína se combinaron y se mezclaron con 4 volúmenes de metanol. Enseguida, se incorporó 1 volumen de cloroformo, seguido de 3 volúmenes de agua destilada estéril. La separación de fases se realizó mediante centrifugación (9,500 rpm; 5 min). La fase acuosa se removió cuidadosamente, sin perturbar la interfase, y la fase orgánica se mezcló con 4 volúmenes de metanol. La proteína se aisló mediante centrifugación (9,500 rpm; 5 min). El sobrenadante se descartó y el precipitado se incubó a 37 °C durante 30 min, para eliminar remanentes de los solventes. Finalmente, la proteína precipitada se disolvió 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) a un décimo de volumen inicial y su concentración fue determinada mediante un micro-ensayo de Bradford.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Obtención del plásmido pET22b(+)/AcAChBP

El plásmido comercial pET22b(+), que favorece la expresión regulada de proteínas recombinantes y su transporte hacia el periplasma bacteriano, se utilizó como vector molecular para la expresión heteróloga de la proteína de unión a acetilcolina de *Aplysia californica* (AcAChBP) en la bacteria *Escherichia coli*.

Un fragmento del gen codificante, contenido en el plásmido recombinante pEYebF-R12, se amplificó (mediante una *PCR*) utilizando dos oligonucleótidos sintéticos como iniciadores y la *Pfu* ADN-pol como enzima de alta fidelidad.

Como se muestra en la Figura 4-1, se obtuvo un fragmento único del peso molecular esperado (660 pb), indicativo de una amplificación exitosa.

El producto de *PCR* AcAChBP y el plásmido pET22b(+) se prepararon para obtener extremos cohesivos-complementarios mediante digestión con las endonucleasas *Nco*I y *Xho*I. Los productos de digestión se ligaron utilizando la enzima T4 ADN-ligasa. Cabe destacar que la estrategia de clonación se planeó considerando una inserción direccional que favorezca la fusión PelB-AcAChBP-6xHis.

El producto de la ligación se utilizó para transformar la cepa ER2738 de *E. coli*. Después del proceso selectivo, se eligieron 5 unidades formadoras de colonias (UFC) y se cultivaron en medio líquido selectivo (LB con ampicilina) en condiciones de proliferación celular. Los plásmidos albergados en cada cultivo bacteriano se purificaron y se analizaron mediante digestión con las endonucleasas *Nco*I y *Xho*I para verificar la liberación del inserto (671 pb).

Como se observa en la Figura 4-2, las 5 clonas analizadas liberan un inserto del tamaño esperado (AcAChBP), sugestivo de una inserción molecular exitosa.

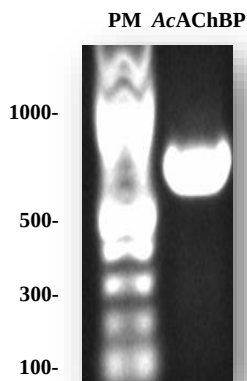


Figura 4-1. Análisis del producto de *PCR* AcAChBP.

Gel de agarosa al 1% teñido con BrEt. PM: Marcador de peso molecular (pb).

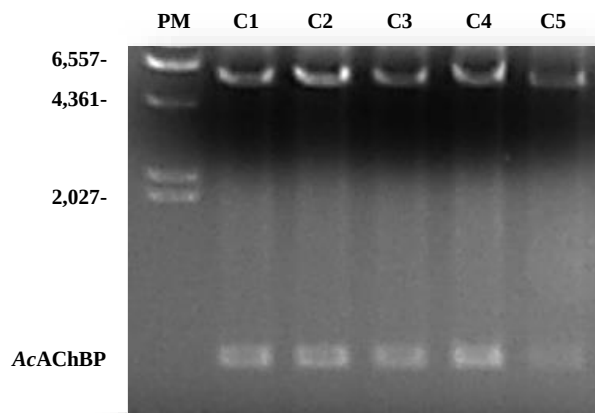


Figura 4-2. Análisis de los productos de digestión con las endonucleasas NcoI y XhoI de las clonas pET22b(+)/AcAChBP.

Gel de agarosa al 1% teñido con BrEt. MPM: Marcador de peso molecular (pb): λ DNA-HindIII. C1-C5, clonas 1 a 5. Izquierda: movilidad relativa de los marcadores de peso molecular (PM, pb) y del inserto (AcAChBP).

La integridad de la fusión PelB-AcAChBP-6xHis fue verificada mediante secuenciación de ADN, [servicio de secuenciación de DNA, Instituto de Biotecnología de la UNAM (www.ibt.unam.mx)], usando el plásmido aislado de la clona 1 (C1) como molde. La representación gráfica del plásmido recombinante pET22b(+)/AcAChBP se muestra en la Figura 4-3.

4.2. *E. coli* BL21(DE3) no expresa AcAChBP

De manera preliminar, se realizó un análisis de expresión de AcAChBP en *E. coli* BL21(DE3). Esta cepa es ampliamente utilizada para la expresión de proteínas recombinantes debido a su deficiencia en las proteasas Lon y OmpT. Además, alberga el lisógeno λ DE3 (que contiene el gen de la *T7RNAP* bajo el control de la secuencia promotora lacUV5). Ante lo último, IPTG es requerido para inducir la

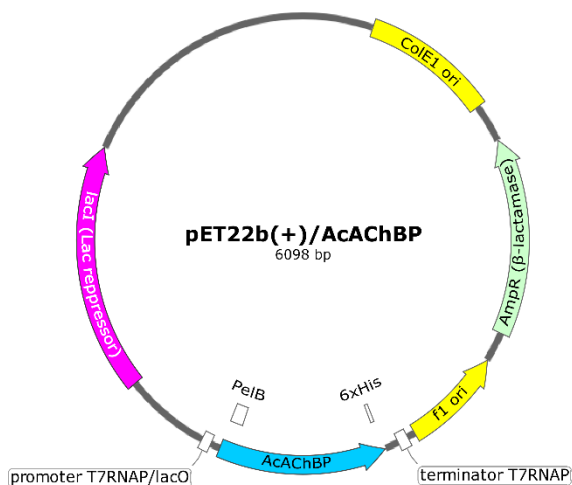


Figura 4-3. Representación esquemática del plásmido pET22b(+)/AcAChBP.

El plásmido recombinante (6098 pb) contiene los orígenes de replicación ColE1 (bacteria) y f1 (bacteriófago), y los genes codificantes para el represor del operón de lactosa (LacI), y la β -lactamasa (que confiere resistencia a ampicilina). La posición relativa de las secuencias regulatorias que controlan la expresión de PelB-AcAChBP-6xHis se indican en el exterior. Además, la localización relativa del péptido señal PelB y la etiqueta molecular 6xHis (hexahistidinas) se indican en el interior.

expresión de la *T7RNAP* y expresar eficientemente los genes recombinantes clonados en los plásmidos pET bajo el control de la secuencia promotora de la *T7RNAP* [Zhang *et al.*, 2015].

Los plásmidos recombinantes obtenidos de las 5 clonas (Figura 4-2) se transformaron en células BL21(DE3) competentes. Después de la selección en medio LB suplementado con ampicilina, 1 UFC de cada transformación fue elegida para el análisis de la expresión de AcAChBP mediante un ensayo a mini-escala. Los resultados mostraron ineficiencia en la expresión recombinante, lo que se atribuyó a la posible toxicidad asociada a la sobreexpresión de la *T7RNAP* y de la misma AcAChBP. Para circunvalar esa adversidad, se decidió utilizar a *E. coli* Lemo21(DE3) como célula hospedera.

4.3. *E. coli* Lemo21(DE3) expresa AcAChBP de manera eficiente

Filial de BL21(DE3), la cepa bacteriana Lemo21(DE3) alberga al plásmido pLemo. Este vector, derivado de pACYC184 (p15A ori; Cm^R), contiene del gen *T7LysY* bajo el control de la secuencia promotora del operón de ramnosa (rhaBAD), lo que aparentemente permite la expresión de proteínas difíciles de producir (p. ej., membranales, tóxicas, o insolubles).

Los plásmidos recombinantes correspondientes a las 3 primeras clonas (C1-C3, Figura 4-2) se transformaron en células Lemo21(DE3) competentes. Después de la selección en medio LB suplementado con ampicilina y cloramfenicol, 1 UFC de cada transformación fue elegida para el análisis de la expresión de AcAChBP mediante un ensayo a mini-escala.

Los resultados demostraron eficiencia en la expresión recombinante. Como se aprecia en la Figura 4-4, no se observa expresión diferencial en ausencia del inductor (sin IPTG); esto es, el patrón electroforético de las proteínas totales es muy similar tanto para el control (V) como para las clonas (C1-C3), sugiriendo una modulación adecuada de la expresión. Además, este resultado permite valorar (de manera cualitativa) el patrón de expresión basal. Por otro lado, es muy evidente la expresión diferencial en presencia de 0.5 mM del inductor (con IPTG), ya que se observa la sobreexpresión de una proteína

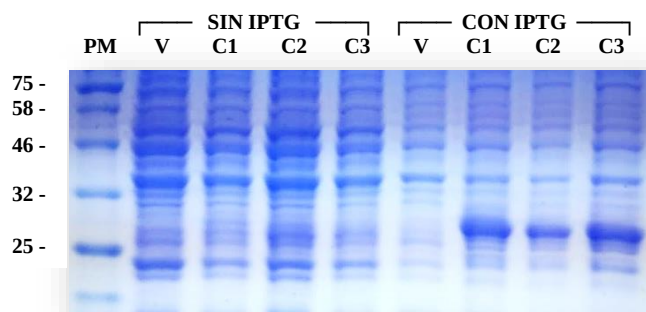


Figura 4-4. Análisis de la expresión recombinante de AcAChBP en *E. coli* Lemo21(DE3).

SDS-PAGE al 13.5% teñido con azul brillante de Coomassie (ABC). Extractos totales de cultivos no inducidos (sin IPTG) o inducidos (con IPTG; 0.5 mM de IPTG). V, pET22b(+); C1-C3, clonas 1 a 3. PM, marcadores de peso molecular (kDa).

de 26-27 kDa (concordante con el tamaño esperado para la AcAChBP) en las tres clonas (C1-C3) y está ausente en el control (V), indicando que las condiciones experimentales favorecen la producción recombinante de la proteína de interés. Inclusive, estos resultados corroboran el valor técnico y aplicativo del mecanismo regulatorio *T7RNAP/T7LysY* como sistema eficiente de expresión de proteínas recombinante en la bacteria *E. coli*.

4.4. AcAChBP se retiene en el citoplasma de *E. coli* Lemo21(DE3)

La localización subcelular de la AcAChBP producida de manera recombinante en *E. coli* Lemo21(DE3) se realizó analizando el patrón de proteínas retenidas en los compartimentos bacterianos implicados en su secreción: citosólico y periplásmico. Las fracciones subcelulares fueron aisladas a partir de paquetes celulares, obtenidos de un ensayo de expresión a mini-escala, utilizando un protocolo típico de permeabilización y extracción con Tritón X-100.

Como se nota en la Figura 4-5, la proteína recombinante (AcAChBP) se retiene y se acumula en el compartimiento citosólico (C) y, contrario a lo esperado, no se transporta hacia el compartimiento periplásmico (P). La acumulación de AcAChBP se adjudicó a la formación de aglomerados proteicos (cuerpos de inclusión) durante la biosíntesis citosólica, lo que dificultó su translocación hacia el periplasma. Esta noción se sustenta en atención a la predisposición que exhibe AcAChBP a formar pentámeros, en su forma nativa, lo que implica la exposición de regiones hidrofóbicas durante la biosíntesis del monómero.

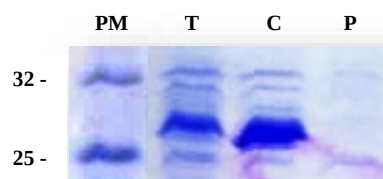


Figura 4-5. Análisis de localización subcelular de AcAChBP.

SDS-PAGE al 13.5% teñido con ABC. Extracto total (T), fracción citosólica (C) y periplásmica (P) de un cultivo de *E. coli* Lemo21(DE3) portadora de pET22b(+)/AcAChBP inducido (clona 1). PM, marcadores de peso molecular (kDa).

4.5. AcAChBP es soluble en condiciones de lisis celular desnaturalizantes

Los ensayos de solubilización se realizaron usando tres condiciones de lisis celular y extracción de proteínas: (1) desnaturalizantes, en solución *in-house* 8UTB (8 M de urea; 100 mM de Tris-HCl, pH 8.0), (2) nativas, en solución *in-house* TTB (1% de Tritón X-100; 100 mM de Tris-HCl, pH 8.0), y (3) nativas, en solución comercial *CellLytic B*.

Como se distingue en la Figura 4-6, ninguna de las condiciones nativas utilizadas facilitó la solubilidad de AcAChBP. Esto es, comparando las fracciones (FS y FI) obtenidas con la solución *in-house* TTB (1% Tritón X-100) o con la solución comercial *CellLytic B*, la proteína recombinante se encuentra totalmente en forma insoluble. Por el contrario, la condición desnaturalizante proporcionó un medio

apropiado para la solubilización de AcAChBP. Aunque el comparativo de las fracciones (FS y FI) obtenidas con la solución *in-house* 8UTB (8 M urea) advierte un rendimiento no mayor al 80% de proteína soluble. Cabe destacar que las condiciones desnaturalizantes perturban la estructura 3D de la proteína. Por tal motivo, se propuso un protocolo de replegamiento oxidativo en columna.

4.6. Purificación de AcAChBP

A partir de extractos proteicos obtenidos mediante lisis en condiciones desnaturalizante (solución *in-house* 8UTB), la proteína recombinante (AcAChBP) se purificó a midi-escala mediante un protocolo estándar de cromatografía de afinidad a metales acoplada a un procedimiento de replegamiento oxidativo en columna.

De manera típica, el paquete bacteriano de un cultivo (100 mL) de *E. coli* Lemo21(DE3) portadora de pET22b(+)/AcAChBP (clona 1) se lisó mediante sonicación en solución desnaturalizante conteniendo 8 M de urea (como agente caotrópico). En consideración a que la proteína recombinante contiene un hexámero de histidinas (6xHis) en su extremo C-terminal, y por ende exhibe afinidad por metales divalentes, el lisado bacteriano se pasó extensivamente a través de una columna de agarosa cargada de níquel. Una vez unida a la resina, mediante un complejo de coordinación formado entre el níquel y los anillos de imidazol de la etiqueta 6xHis, la proteína recombinante (desnaturalizada) se replegó y reoxidó en columna mediante dilución-remoción del agente caotrópico en presencia de 1 mM

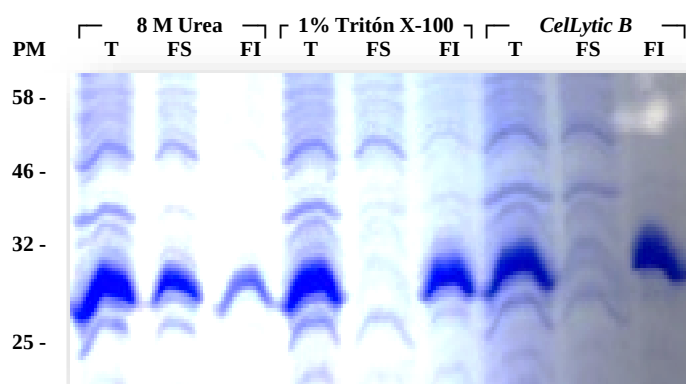


Figura 4-6. Análisis de solubilidad de AcAChBP.

SDS-PAGE al 13.5% teñido con ABC. Extractos totales (T), y fracciones solubles (FS) e insolubles (FI), obtenidas mediante diferentes condiciones de lisis celular y extracción de proteínas, de un cultivo de *E. coli* Lemo21(DE3) portadora de pET22b(+)/AcAChBP inducido (clona 1). PM, marcadores de peso molecular (kDa).

de glutatión oxidado (como agente oxidante). Después de un lavado en condiciones meramente oxidantes, AcAChBP se obtuvo mediante elución con 250 mM de imidazol (como agente competidor).

Como se aprecia en la Figura 4-7, se purificó una proteína con un peso molecular de 26-27 kDa, concordante con el valor esperado para la AcAChBP, indicativo del éxito obtenido con el procedimiento implementado. Esto es, la proteína recombinante se extrajo soluble en

condiciones desnaturalizantes (fracción LBST), no efluye en las siguientes etapas: replegamiento oxidativo en columna (fracciones NP, RO, y WO), y se recupera soluble (fracciones E1 y E2).

El proceso anterior se realizó en siete paquetes celulares cosechados de cultivos bacterianos, obteniendo un total de 0.772 mg de proteína recombinante (AcAChBP) pura.

La capacidad de integrar agregados se determinó mediante electroforesis de muestras analíticas de E1 y E2 que se trataron en condiciones desnaturalizantes o se mantuvieron en condiciones nativas. Como se observa en la Figura 4-8, la proteína recombinante (AcAChBP purificada) exhibe la capacidad de formar agregados proteicos. Es decir, en condiciones desnaturalizantes (DN), la proteína se mantiene totalmente dentro del peso molecular esperado para el monómero (26-27 kDa); sin embargo,

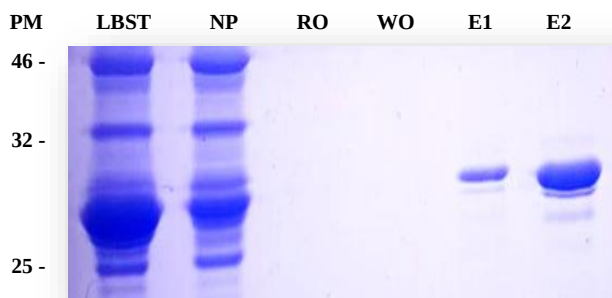


Figura 4-7. Purificación de AcAChBP mediante cromatografía de afinidad a níquel.

SDS-PAGE al 13.5% teñido con ABC. Muestras analíticas de las fracciones cromatográficas: LBST, lisado bacteriano soluble total; NP, no pegado; RO, replegamiento oxidativo; WO, lavado oxidativo; E1 y E2, eluciones 1 y 2. PM, marcadores de peso molecular (kDa).

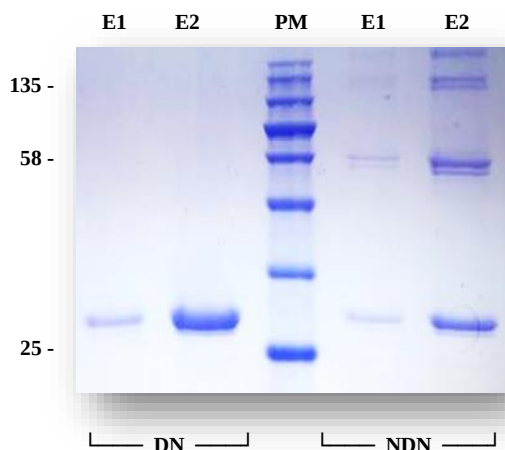


Figura 4-8. Análisis de formación de agregados.

SDS-PAGE al 13.5% teñido con ABC. Muestras analíticas de las fracciones E1 y E2. Condiciones: DN, desnaturalizantes; NDN, no desnaturalizantes. PM, marcadores de peso molecular (kDa).

en condiciones no desnaturizantes (NDN), una porción permanece en su forma monomérica y otra conforma agregados multiméricos de diferentes tamaños (aparentes): dímeros, pentámeros, y otros de muy alto peso molecular.

De manera general, es factible suponer que la AcAChBP producida es capaz de formar un pentámero, tal como sucede en condiciones *in vivo*.

5. CONCLUSIONES

El plásmido recombinante pET22b(+)/AcAChBP, que expresa la proteína de fusión PelB-AcAChBP-6xHis bajo el control de la secuencia promotora de la ARN polimerasa del bacteriófago T7, se obtuvo de manera correcta mediante técnicas de clonación molecular.

En condiciones típicas de inducción, la proteína recombinante se produce adecuadamente en *E. coli* Lemo21(DE3), que expresa de manera modulada la lisozima del bacteriófago T7; sin embargo, se acumula y se retiene de manera insoluble en el citosol, formando cuerpos de inclusión, lo cual supone un impedimento para su exportación hacia el periplasma.

La proteína recombinante se solubiliza en condiciones desnaturalizantes, conteniendo 8 M de urea (como agente caotrópico), y se purifica de manera eficiente mediante cromatografía de afinidad a níquel acoplada a un procedimiento de replegamiento oxidativo en columna, conteniendo 1 mM de glutatión oxidado (como agente oxidativo).

En condiciones nativas, la proteína recombinante purificada (AcAChBP) se aglomera formando dímeros y pentámeros, tal como sucede en condiciones fisiológicas (*in vivo*). Aunque los resultados preliminares de los ensayos de competencia no han sido consistentes (datos no mostrados), es posible suponer que la proteína obtenida tiene potencial como diana para la identificación de moléculas con actividad terapéutica.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, N., Paul, B., Ragnarsson, L., & Lewis, R. (2016). Escherichia coli Protein Expression System for Acetylcholine Binding Proteins (AChBPs). *Plos One*, 11(6), 1-15.
- Albuquerque, E., Pereira, E., Alkondon, M., Rogers, S. (2009). Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. *American Physiological Society*, 89(1), 73-120.
- Barrantes, F. (1998). The nicotinic acetylcholine receptor: current views and future trends. *Springer*
- Berjc, K., Dijk, W., Klaassen, R., Schuurmans, M., Oost, J., Smit, A., & Sixma, T. (2001). Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature*, 411, 269-276.
- Cardinali, D.P. (1992). *Manual de Neurofisiología*. Ediciones Díaz de Santos.
- Celie, P., Rossum-Fikkert, S., van Dijk, W., Brejc, K., Smith, A., & Sixma, T. (2004). Nicotine and Carbamylcholine Binding to Nicotinic Acetylcholine Receptors as Studied in AChBP Crystal Structures. *Cell Press*, 41, 907-914.
- Conolly, C.N., & Wafford, K.A. (2004). The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function. *Biochemical Society*, 32(3), 529- 534.
- Córdova, A. (2003). *Fisiología dinámica*. Barcelona: Masson.
- Gahring, L. C., & Rogers, S. W. (2005). Neuronal nicotinic acetylcholine receptor expression and function on nonneuronal cells. *The AAPS Journal*, 7(4), 885-894.
- Gallego, X., Molas, S., Amador, A., Marks, M., Robles, N., Murtra, P., Armengol, L., Fernández, R., Grataco, M., Pumarola, M., Cabrera, R., Maldonado, R., Sabria, J., Estivill, J., & Dierssen, M. (2012). Overexpression of the CHRNA5/A3/B4 genomic cluster in mice increases the sensitivity to nicotine and modifies its reinforcing effects. *Amino Acids*, 43, 897-909.
- García, A., & Quero, J.(2012). *Evaluación neurológica del recién nacido*. Ediciones Díaz de Santos.
- Hansen, S., Talley, T., Radic, Z., & Taylor, P. (2004). Structural and Ligand Recognition Characteristics of an Acetylcholine-binding Protein from Aplysia californica.
- Hansen, S.B., Sulzenbacher, G., Huxford, T., Marchot, P., Taylor, P., & Bourne, Y. (2005). Structures of Aplysia AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations. *The EMBO Journal*, 24(20), 3635-3646.
- Hernández, G. (2011). *Tratado de medicina farmacéutica*. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Hibbs, R., Sulzenbacher, G., Shi, J., Talley, T., Conrod, S., Kem, W., Taylor, P., Marchot, P., & Bourne, Y. (2009). Structural determinants for interaction of partial agonists with acetylcholine binding protein and neuronal $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *The EMBO Journal*, 28(19), 3040-3051.
- Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelberg, E. A., & Brooks, G. F. (2011). *Microbiología médica* Jawetz, Melnick y Adelberg. México: McGraw-Hill Interamericana.
- Jimenez, L., & Merchant, H. (2003). *Biología celular y molecular*. México: Pearson Educación.
- Katzung, B.G. (2013). *Basic & clinical pharmacology*. New York: McGraw-Hill Medical.
- Kem, W. (2000). The brain $\alpha 7$ nicotinic receptor may be an important therapeutic target for the treatment of Alzheimer's disease: studies with DMXBA (GTS-21). *Behavioral brain research*, 113, 169.181.
- Kouvatsos, N., Niarchos, A., Zisimopoulou, P., Eliopoulos, N., Poulas, K., & Tzartos, S. (2014). Purification and functional characterization of a truncated human $\alpha 4 \beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 320-326.
- Lazaridis, K., Zisimopoulou, P., Giastas, P., Bitzopoulou, K., Evangelakou, P., Sideri, A., & Tzartos, S. (2013). Expression of human AChR extracellular domain mutants with improved characteristics. *International Journal of Biological Macromolecules*, 63, 210- 217.
- Lin, B., Meng, H., Bing, H., Zhangsun, D., & Luo, S. (2014). Efficient Expression of Acetylcholine-Binding Protein from Aplysia californica in Bac-to-Bac System. *BioMed Research International*, 2014, 1-9.
- Lin, B., Xiang, S., & Li, M. (2016). Residues Responsible for the Selectivity of α -Conotoxins for Ac-AChBP or nAChRs. *Marine Drugs*, 14(10), 173
- López, J., & Fernández, A. (2013). *Fisiología del ejercicio*. Madrid: Médica Panamericana.
- Martin, A. V., & Lorenzo, P. (2005). *Velázquez farmacología básica y clínica*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Ohno, K., Ohkawara, B., & Ito, M. (2017). Agrin-LRP4-MuSK signaling as a therapeutic target for myasthenia gravis and other neuromuscular disorders. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 21(10), 949-958.
- Porro, D., Sauer, M., Branduarni, P., & Mattanovich, D. (2005). Recombinant Protein Production in Yeasts. *Molecular Biotechnology*, 31(3), 245- 260.
- Quik, M., Zhang, D., Perez, X. A., & Bordia, T. (2014). Role for the nicotinic cholinergic system in movement disorders; therapeutic implications. *Pharmacology & Therapeutics*, 144(1), 50-59
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., *et al.* (2012). *Rang y Dale Farmacología*. London: Elsevier.
- Romi, F., Hong, Y., & Gilhus, N. E. (2017). Pathophysiology and immunological profile of myasthenia gravis and its subgroups. *Current Opinion in Immunology*, 49, 9-13.
- Rosano, G., & Ceccareli, E. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*, 5(172), 1-17.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schatzberg, A.F. & Nemeroff, C.B. (2006). *Tratado de psicofarmacología*. Barcelona: Masson Elsevier.
- Schlegel, S. (2013). From protein production to genome evolution in *Escherichia coli*. Department of Biochemistry and Biophysics, Stockholm University.
- Schumann, W., & Ferreira, L. (2004). Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Genetics and Molecular Biology*, 27(3), 442-453.
- Shahsavari, A., Gajhede, M., Kastrop, J. S., & Balle, T. (2016). Structural Studies of Nicotinic Acetylcholine Receptors: Using Acetylcholine-Binding Protein as a Structural Surrogate. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 118(6), 399-407.
- Sokolosky, J., & Szoka, F. (2013). Periplasmic production via the pET expression system of soluble, bioactive human growth hormone. *Protein Expression and Purification*, 87(2), 129-135.
- Talley, T., Yalda, S., Yiu Ho, K., Tor, Y., Soti, F.S., Kem, W., & Taylor, P. (2006). Spectroscopic Analysis of Benzylidene Anabaseine Complexes with Acetylcholine Binding Proteins as Models for Ligand–Nicotinic Receptor Interactions. *Biochemistry*, 45(29), 8894–8902.
- Vallés, A. S., Borroni, M. V., & Barrantes, F. J. (2014). Targeting Brain $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors in Alzheimer’s Disease: Rationale and Current Status. *CNS Drugs*, 28(11), 975-987.
- Wagner, S., Klepsch, M., Schlegel, S., Appel, A., Draheim, R., Tarry, M., Högboom, M., van Wijks, K., Slotboom, D., Persson, J., & de Gier, J. (2008). Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. *PNAS*, 105(38), 14371-14376.
- Webster, R.A. (2003). *Neurotransmitters, drugs, and brain function*. Chichester: Wiley.
- Zhang, Z., Kuipers, G., Niemiec, Ł., Baumgarten, T., Slotboom, D. J., Gier, J. D., & Hjelm, A. (2015). High-level production of membrane proteins in *E. coli* BL21(DE3) by omitting the inducer IPTG. *Microbial Cell Factories*, 14(1).
- Zouridakis, M., Zisimopoulou, P., Poulas, K., & Tzartos, S. (2009). Recent advances in understanding the structure of Nicotinic Acetylcholine Receptors. *IUBMB Life*, 61(4), 407-423.