



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

DISEÑO DE UN SISTEMA DE PRODUCCIÓN RECOMBINANTE DE PÉPTIDOS CON POTENCIAL TERAPÉUTICO

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA EN
CIENCIAS DE LA INGENIERÍA MENCIÓN INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

VIDA RODRÍGUEZ GALLARDO

PROFESORES GUÍAS:
BARBARA A. ANDREWS FARROW
JUAN A. ASENJO DE LEUZE

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
YEDY ISRAEL JACARD
ALVARO OLIVERA-NAPPA
ORIANA SALAZAR AGUIRRE

SANTIAGO DE CHILE
2013

RESUMEN DE TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
Doctora en Ciencias de la Ingeniería mención Ingeniería
Química y Biotecnología
POR: Vida Rodríguez Gallardo
FECHA: Diciembre, 2013
PROFESORES GUÍA: Juan A. Asenjo y Barbara A. Andrews

DISEÑO DE UN SISTEMA DE PRODUCCIÓN RECOMBINANTE DE PÉPTIDOS CON POTENCIAL TERAPÉUTICO

El estudio de péptidos como moléculas terapéuticas ha generado gran interés en la industria farmacéutica debido a sus características de alta especificidad y actividad biológica y baja toxicidad. Igualmente, la exploración de nuevos blancos terapéuticos al interior de la célula es bastante atractiva ya que, posibilita la modulación e intervención de procesos intracelulares. En este contexto, disponer de un sistema de expresión recombinante de péptidos en un huésped como *Escherichia coli*, permitirá potenciar el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos, especialmente en el estudio de péptidos terapéuticos con actividad biológica intracelular y que requieran unión a péptidos de penetración celular como transportador, ya que el tamaño del péptido a sintetizar podría no ser adecuado para su síntesis química en forma eficiente y sustentable.

El trabajo realizado consiste en el diseño de un sistema de expresión bacteriana de péptidos potencialmente terapéuticos, con blanco intracelular y que utilicen al péptido de penetración celular Penetratin como transportador, que permita la producción de diversos péptidos con el fin de estudiar su potencial terapéutico. El sistema fue evaluado mediante la expresión de los péptidos p53pAnt y PNC27, los cuales han mostrado tener actividad biológica antitumoral *in vitro*.

Se diseñó el vector pET31HT que permite la expresión de los péptidos fusionados a la proteína cetoesteroide isomerasa (KSI) en una forma tal que puedan ser posteriormente separados y obtenidos con su secuencia original mediante corte con Trombina. Utilizando técnicas de ingeniería genética se construyó el vector de expresión diseñado. Para la implementación del sistema, se clonó las secuencias nucleotídicas correspondientes a los péptidos p53pAnt y PNC27 en el vector pET31HT. Se logró la producción de los péptidos fusionados en células transformadas con las construcciones pET31HT-p53pAnt y pET31HT-PNC27. La expresión se obtuvo en forma de cuerpos de inclusión y se determinó que los niveles de expresión de proteína recombinante se mantienen constantes y alrededor del 20% del peso seco celular, para distintas condiciones de inducción.

Los péptidos fusionados fueron purificados desde la fracción de proteína insoluble por cromatografía de afinidad en condiciones desnaturantes. Mediante una estrategia que incluye precipitación por dilución y solubilización de las muestras en un buffer específico, se logró la separación del péptido p53pAnt de la proteína KSI en un proceso de proteólisis altamente eficiente. Sin embargo, no se logró separar al péptido PNC27 desde la proteína de fusión probablemente debido a la rigidez impuesta por sus aminoácidos iniciales a la región de reconocimiento de la proteasa. El péptido p53pAnt fue purificado desde el producto de digestión, según la estrategia diseñada, obteniéndose un péptido altamente puro.

Las características del sistema, en conjunto con el proceso de purificación desarrollado, permiten la síntesis biológica de péptidos con una productividad mayor a 30 mg/g de peso seco celular y con una pureza de al menos un 95%. Con esto, el sistema diseñado es apropiado para su uso en la producción de péptidos para investigación científica.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera comenzar agradeciendo a mis padres, por su incondicional apoyo al desarrollo de mi carrera científica.

Mis agradecimientos al Dr. Juan Asenjo por haber confiado en mí y en mi proyecto, y a la Dra. Barbara Andrews por su apoyo en la realización de mi trabajo de doctorado. Agradezco también a la Dra. Oriana Salazar por su disposición a colaborar y su siempre constructivo análisis.

En forma especial, agradezco a Mario por su comprensión, apoyo y paciencia durante todo el tiempo que realicé mis estudios de postgrado.

A mis compañeros Daniela S., Carolina, Camila, Jorge, Gabriela, Patricia y Alicia por hacer del laboratorio un lugar agradable para trabajar y compartir. A Nancy por hacer siempre gratos los momentos en el laboratorio de proteínas con su compañía y buena voluntad.

Gracias a todos aquellos, familia y amigos, que mostraron interés en mi trabajo aunque quizás nunca entendieron de qué se trataba.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	2
<u>1 INTRODUCCIÓN</u>	10
1.1 ANTECEDENTES GENERALES	10
1.1.1 PÉPTIDOS TERAPÉUTICOS	10
1.2 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	12
1.2.1 SÍNTESIS DE PÉPTIDOS.....	12
1.2.2 PÉPTIDOS DE PENETRACIÓN CELULAR	14
1.2.3 PÉPTIDOS ANTITUMORALES CON BLANCO INTRACELULAR	17
1.3 DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO Y JUSTIFICACIÓN	20
1.4 OBJETIVOS	22
<u>2 MATERIALES Y MÉTODOS</u>	23
2.1 CÉLULAS HUÉSPED Y VECTORES.....	23
2.2 CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN pET31HT.....	23
2.3 CLONAMIENTO DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE P53PANT Y PNC27 EN pET31HT ...	26
2.4 EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE LOS PÉPTIDOS EN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	28
2.5 PURIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS FUSIONADOS.....	30
2.6 PROTEÓLISIS ENZIMÁTICA Y PURIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS RECOMBINANTES	31
2.7 CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO.....	32
<u>3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	33
3.1 DISEÑO Y LA MANIPULACIÓN GENÉTICA.....	33
3.1.1 CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN pET31HT	33
3.1.2 CLONAMIENTO DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE P53PANT Y PNC27 EN pET31HT ...	37
3.2 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS FUSIONADOS	40
3.2.1 EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE LOS PÉPTIDOS EN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	40
3.2.2 PURIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS FUSIONADOS	44
3.3 PROTEÓLISIS DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS	48
3.3.1 DISMINUCIÓN DEL AGENTE DESNATURANTE	48
3.3.2 PROTEÓLISIS ENZIMÁTICA.....	53
3.3.3 PURIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS.....	64
3.4 CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO.....	66
<u>4 DISCUSIÓN GENERAL</u>	73
<u>5 CONCLUSIONES</u>	80

6	BIBLIOGRAFÍA.....	82
A	ANEXOS.....	88
A.1	ESQUEMA DEL VECTOR pGEM-T EASY.....	88
A.2	ESQUEMA DEL VECTOR PET-31B(+).....	89
A.3	PREPARACIÓN DE GELES SDS-POLIACRILAMIDA	90
A.4	EJEMPLO DE DATOS	91
A.5	TABLA RESUMEN DEL PROCESO DE PURIFICACIÓN.....	92
A.6	RESULTADOS DE ANÁLISIS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Promedio anual de péptidos terapéuticos que ingresan a ensayos clínicos por década	11
Figura 2: Dominios funcionales de p53	17
Figura 3: Secuencia del péptido p53pAnt	18
Figura 4: Secuencia del péptido PNC27	19
Figura 5: Esquema de la región codificante del vector comercial pET-31b(+)	24
Figura 6: Esquema de la región codificante del vector diseñado pET31HT	25
Figura 7: Esquema de la proteína recombinante producida por el vector de expresión diseñado	34
Figura 8: Esquema del proceso de construcción del vector pET31HT.	35
Figura 9: Análisis electroforético de la digestión de pET-31b(+) con <i>NdeI</i> y <i>XhoI</i>	36
Figura 10: Análisis electroforético del producto de amplificación KSI'	37
Figura 11: Análisis electroforético de los productos de digestión de pET31HT, pGEM-T-p53pAnt y pGEM-T-PNC27 con <i>AvrII</i> y <i>Pacl</i>	39
Figura 12: Análisis electroforético de proteína intracelular	41
Figura 13: Curva de calibración en gel elaborada con distintas concentraciones de BSA	42
Figura 14: Análisis electroforético del caso base para el proceso de purificación de proteína recombinante	44
Figura 15: Análisis electroforético del proceso de purificación por cromatografía de afinidad.	45
Figura 16: Análisis electroforético del proceso de purificación por cromatografía de afinidad para KSI-p53pAnt	46
Figura 17: Análisis electroforético de proteínas insolubles en gel SDS-acrilamida no desnaturalante.	47
Figura 18: Análisis del efecto de sarkosyl en la proteólisis con Trombina	55
Figura 19: Análisis electroforético del producto de digestión de KSI-p53pAnt con Trombina en solución	59
Figura 20: Comparación de los productos de digestión de KSI-p53pAnt obtenidos mediante distintas estrategias de proteólisis	61
Figura 21: Progreso de la reacción de proteólisis enzimática para 0,35 U de Trombina por mg de proteína	62
Figura 22: Análisis electroforético del proceso de purificación del péptido	65

Figura 23: Análisis electroforético del péptido p53pAnt purificado	66
Figura 24: Análisis de pureza para el péptido p53pAnt purificado	67
Figura 25: Sitios de ruptura del péptido p53pAnt inferidos a partir del análisis de espectrometría de masas	68
Figura 26: Espectro de señales m/z detectadas por análisis MALDI-TOF	70
Figura 27: Diagrama del proceso de producción de péptidos generado en este trabajo de tesis.	74
Figura 28: Mapa del vector pGEM-T Easy	88
Figura 29: Mapa del vector pET-31b(+).	89
Figura 30: Espectro de señales m/z detectadas por análisis MALDI-TOF para el péptido p53pAnt purificado.	93
Figura 31: Espectro de señales m/z detectadas por análisis MALDI-TOF para el producto de digestión de 8 horas con Trombina.	94
Figura 32: Espectro de señales m/z detectadas por análisis MALDI-TOF para el producto de digestión de 96 horas con Trombina.	95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Péptidos de penetración celular	15
Tabla 2: Secuencias nucleotídicas de los partidores utilizados para generar KSI'	25
Tabla 3: Programa de amplificación de KSI desde pET-31b(+).....	25
Tabla 4: Secuencias nucleotídicas de los oligonucleótidos sintetizados.....	27
Tabla 5: Resultados del estudio del efecto de las condiciones de inducción en la producción de proteína recombinante	43
Tabla 6: Cuantificación de proteína en las fracciones del extracto crudo	91
Tabla 7: Cuantificación de proteína en las fracciones de purificación de KSI-p53pAnt.....	91
Tabla 8: Cuantificación de proteína en las fracciones de purificación del péptido p53pAnt desde el producto de la digestión de la proteína KSI-p53pAnt en la fracción EB	91
Tabla 9: Resumen del proceso de purificación de la proteína recombinante KSI-p53pAnt y del péptido p53pAnt.....	92
Tabla 10: Identificación de señales correspondientes a formas incompletas de p53pAnt	93

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucléico
BSA	Albúmina de suero de bovino
bp	Pares de bases
CPP	Péptido de penetración celular
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
HCl	Ácido clorhídrico
IPTG	Isopropil - β -D-1-tiogalactopiranosido
kDa	Kilo Dalton
KSI	Cetoesteroide Isomerasa
LB	Medio Luria-Bertani
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida.
pH	Potencial hidrógeno
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletildiamina
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
V	Voltio
x-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

1 INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES GENERALES

1.1.1 PÉPTIDOS TERAPÉUTICOS

Los péptidos se definen como polímeros cortos de aminoácidos, definición acotada generalmente a polímeros de hasta 50 aminoácidos o 5 kDa de peso molecular [1].

Las proteínas son las moléculas orgánicas más abundantes en las células y son fundamentales tanto para su estructura como para su funcionalidad [2]. Están constituidas por regiones con distintas secuencias peptídicas, que son las responsables de su reconocimiento molecular y actividad biológica. Esto hace de los péptidos moléculas con aplicaciones interesantes, ya que pueden simular estas regiones y, de esta forma, modular interacciones proteína-proteína, centrales en procesos celulares y determinantes en muchas enfermedades.

Como agentes terapéuticos, los péptidos son particularmente atractivos ya que presentan alta actividad biológica y alta especificidad, lo que disminuye su interacción con otras moléculas y la probabilidad de producir efectos secundarios. Además, presentan baja acumulación en los tejidos y no generan metabolitos secundarios, lo que les otorga características de baja toxicidad [3-5].

Sin embargo, los péptidos tienen algunas desventajas con respecto a otras moléculas terapéuticas tradicionales, como son su mayor costo de síntesis y su baja vida media [4]; esta última debido a que éstos carecen de estructura terciaria, lo que los hace particularmente sensibles a la degradación enzimática.

El desarrollo de nuevas tecnologías ha ido generando mejoras tanto en los métodos de síntesis [6] como en su estabilidad *in vivo* y sistemas de administración [3, 4], aumentando así el interés de la industria farmacéutica [7]. Actualmente, esta industria dirige gran cantidad de recursos a investigación y desarrollo de nuevos péptidos con potencial terapéutico, lo que se ve reflejado en un aumento en la cantidad anual de péptidos que entran a estudios clínicos (ver Figura 1); la mayor parte de ellos en las categorías terapéuticas de enfermedades metabólicas y oncológicas [7].

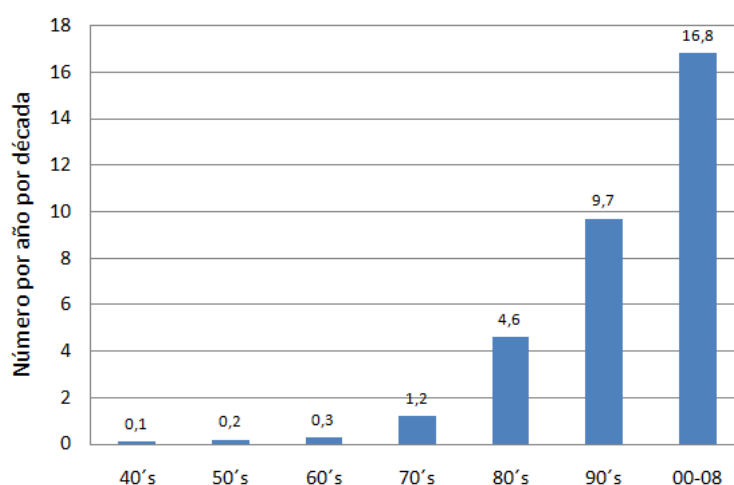


Figura 1: Promedio anual de péptidos terapéuticos que ingresan a ensayos clínicos por década [7]

El diseño de péptidos con blancos intracelulares abre nuevas posibilidades terapéuticas, permitiendo la modulación de procesos que ocurren dentro de la célula o la intervención en vías de señalización. Se ha encontrado que existe interés por investigar y desarrollar éste tipo de péptidos, tanto a nivel científico como industrial. Entre las empresas farmacéuticas interesadas se encuentran Aileron Therapeutics, Xigen, Compugen y CLL Pharma. Sin embargo, de los péptidos que ingresan a estudios clínicos, menos del 10% poseen un blanco terapéutico intracelular [8], probablemente por la dificultad que ofrece la membrana celular al ingreso de la mayoría de las macromoléculas.

1.2 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1.2.1 SÍNTESIS DE PÉPTIDOS

Actualmente, el principal método de síntesis de péptidos es la síntesis química, en el que cada aminoácido es agregado en forma secuencial hasta completar la secuencia deseada, generando una disminución acumulativa del rendimiento [9]. Puede realizarse en fase líquida o en fase sólida. La síntesis en fase líquida requiere de la purificación de cada producto intermedio, por lo que en general se usa para sintetizar péptidos cortos [9]. En la síntesis en fase sólida, la elongación de la cadena peptídica se realiza en un soporte sólido; una vez que el péptido está totalmente ensamblado, es liberado desde la matriz junto con la mayoría de los subproductos generados durante la síntesis, para posteriormente ser purificado [10]. Generalmente, es eficiente sólo para producir péptidos de hasta unos 15 aminoácidos [11].

Aunque en ambos casos se ha logrado sintetizar péptidos de más de 30 aminoácidos, y se han desarrollado tecnologías que han permitido reducir los costos y mejorar la escalabilidad de la síntesis química, el grado de dificultad para la síntesis de un péptido específico sólo puede evaluarse empíricamente, ya que cada secuencia posee propiedades fisicoquímicas únicas [12].

Una estrategia más reciente es la síntesis híbrida, donde los fragmentos del péptido son sintetizados en fase sólida y luego son combinados en solución para generar el péptido final [11]. Mediante esta estrategia, se sintetiza el péptido terapéutico enfuvirtide (Fuzeon[®], de Roche), formado por 36 aminoácidos y utilizado para tratar la infección por VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana). Este péptido requiere de 106 pasos para ser sintetizado, en un proceso de alto costo que dura de 5 a 6 meses y genera una gran cantidad de desechos [6, 13].

La producción recombinante de péptidos se ha convertido en una buena alternativa para la producción a gran escala de péptidos largos (mayores a 25 aa), principalmente debido a que ofrece una buena combinación de costo-efectividad, escalabilidad y sustentabilidad [13-15]. La producción recombinante de péptidos mediante fermentación microbiana en *Escherichia coli* es más rápida, manejable y económica que el uso de células mamíferas [15].

La expresión directa de péptidos en *Escherichia coli* puede llevar a la degradación citoplasmática del producto, o bien, generar toxicidad en el huésped, por lo que los sistemas de expresión suelen producir los péptidos recombinantes como péptidos fusionados, unidos a una proteína con propiedades específicas [16, 17], o bien, en serie o tándem, uniendo varias copias del mismo péptido [18]. Estas estrategias requieren de una etapa de hidrólisis que permita luego liberar la secuencia peptídica objetivo. Para ello usualmente se utiliza bromuro de cianógeno para cortar en residuos de metionina, o se realiza hidrólisis específica con ácido fórmico en Asp-Pro [17] o bien en Asn-Gly con hidroxilamina [18]. Estos reactivos son altamente tóxicos, por lo que, como alternativa, se puede incluir secuencias de reconocimiento para proteasas comunes como Enteroquinasa, Factor Xa, TEV proteasa o Trombina, y realizar la separación mediante proteólisis enzimática. Éste método tiene la desventaja de tener un costo mayor al de la proteólisis química, aunque entre las proteasas destaca como la alternativa más económica, el uso de Trombina [17].

El sistema comercial pET-31b(+) permite una estrategia de producción recombinante, en la que se fusionan copias en serie de la secuencia del péptido objetivo, a la proteína cetosteroid isomerasa (KSI, del inglés Ketosteroid Isomerase). Cada una de las partes, debe estar separada por un residuo de metionina, el que reacciona en presencia de bromuro de cianógeno, rompiendo el enlace peptídico del lado carboxilo. Esta reacción permite que los péptidos sean liberados de la cadena, con un grupo

homoserina lactona carboxilo terminal. El sistema ha sido utilizado por varios grupos de investigación [19, 20] y ha alcanzando una productividad de 50 mg de péptido por litro de cultivo [21].

En el mercado actual, existen alrededor de 50 péptidos terapéuticos [7], de los cuales al menos tres son producidos en *Escherichia coli*: Natrecor® (Nesiritide, 32 aa), producido por Scios Pharmaceuticals; GATTEX™ (Teduglutide, 33 aa) de NPS Pharmaceuticals y FORTEO® (teriparatide – hPTH[1-34], 34 aa) de Eli Lilly and Company; sin embargo, no se conocen los detalles del sistema de expresión utilizado en ninguno de los casos.

1.2.2 PÉPTIDOS DE PENETRACIÓN CELULAR

Los Péptidos de Penetración Celular (CPPs del inglés Cell-Penetrating Peptides), son péptidos de menos de 30 aminoácidos, con la habilidad de ingresar a las células. Se caracterizan por tener un alto contenido de aminoácidos lisina y arginina, una carga neta positiva y estructura de alfa hélice [22].

El primer CPP identificado fue un polipéptido de 16 aminoácidos, denominado Penetratin (RQIKIWFQNRRMKWKK), correspondiente a la tercera hélice del homeodominio¹ de Antennapedia, un factor de transcripción de *Drosophila melanogaster* [23]. Desde entonces se han identificado varios péptidos de penetración celular, tanto de origen natural como sintético (ver Tabla 1), entre ellos TAT (RKKRRQRRR) [24], Transportan (GWTLSAGYLLGKINKALAALAKKIL) [25] y MAP (model amphipathic peptide) KLALKLALKALKAALKLA [26].

¹ Dominio de unión a DNA

Tabla 1: Péptidos de penetración celular [27]

Nombre	Secuencia
<i>CPPs Naturales</i>	
Tat	RKKRRQRRR
Penetratin	RQIKIWFQNRRMKWKK
Buforin II	TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK
<i>CPPs Sintéticos</i>	
Transportan	GWTLNSAGYLLGKINKALAALAKKIL
MAP (model amphipathic peptide)	KLALKLALKALKAAALKLA
K-FGF	AAVALLPAVLLALLAP
Ku70	VPMLK - PMLKE
Prion	MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKP
pVEC	LLIILRRRIRKQAHASK
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRV
SynB1	RGGRLSYSRRRFSTSTGR

Los CPPs más estudiados son Penetratin y TAT. En particular, se ha visto que péptidos derivados de Penetratin, con modificaciones como reemplazo o delección de aminoácidos [28, 29] e incluso su secuencia inversa, mantienen su capacidad de internalización celular [30].

Se ha demostrado que diversas moléculas unidas en forma covalente a CPPs, son capaces de ingresar a la célula [31, 32]; e incluso, que los CPPs son capaces de transportar péptidos con actividad biológica hasta su blanco intracelular. Existen muchas y variadas publicaciones en las que péptidos con potencial terapéutico son unidos covalentemente a CPPs con resultados positivos *in vitro* [33-38] y en algunos casos incluso *in vivo* [35].

Su mecanismo de internalización no está completamente definido. Se ha demostrado que carecen de especificidad celular y que para ingresar a la célula pueden usar diversos mecanismos, tales como endocitosis y translocación directa a través de la membrana plasmática [39, 40]. La mayoría de los CPPs utiliza dos o más mecanismos, dependiendo de las condiciones experimentales [41]. Se ha determinado que a alta concentración de CPP es más probable la translocación directa a través de la

membrana, mientras que a baja concentración ocurre principalmente endocitosis [41]. El umbral a partir del cual ocurre uno u otro mecanismo es distinto para cada CPP y varía con la línea celular utilizada y la presencia y tipo de molécula a transportar [41].

Tanto el proceso de translocación como el de endocitosis comienzan con la interacción entre el CPP y la superficie de la célula [42]. Este proceso no depende de receptores específicos [42], y se ha propuesto que se inicia con la interacción electrostática entre los residuos arginina y lisina de estos péptidos y los proteoglicanos de carga negativa en la superficie de la célula [42, 43].

Se han descrito distintos mecanismos para el proceso de translocación, como la penetración directa de la membrana, la formación de micelas inversas o la formación de poros, entre otros [41, 42]. La ocurrencia de un mecanismo u otro depende principalmente de la concentración del péptido, la secuencia peptídica y de la composición de la membrana. Además se ha visto una alta dependencia de la presencia o ausencia de una molécula cargo, así como de su tamaño y tipo [41].

En el caso del péptido de penetración celular Penetratin, se plantea que la translocación de la membrana ocurre por medio de la formación de micelas inversas, en un proceso dependiente de los residuos triptófano en la secuencia aminoacídica del péptido [41]. La interacción entre estos residuos hidrofóbicos y las regiones hidrofóbicas de la membrana producen su desestabilización dando lugar a la formación de las micelas inversas, que atraviesan la membrana y eventualmente se abren liberando el péptido al interior de la célula [44].

Por otra parte, cuando el mecanismo de internalización de CPP ocurre por endocitosis, se ha visto que puede ser mediante distintas vías: endocitosis caveolar, endocitosis mediada por clatrina, endocitosis independiente de clatrina y caveolae y macropinocitosis [42, 45]. Se ha observado que para

un mismo CPP, pueden ocurrir distintos mecanismos de internalización por endocitosis, dependiendo de si está o no conjugado a una molécula y del tamaño y naturaleza de ésta, además del tipo celular utilizado [45].

En el caso de Penetratin, se ha demostrado que la principal vía endocítica utilizada es la endocitosis dependiente de clatrina [46]. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la presencia de una molécula cargo puede modificar el mecanismo de internalización a usar [41].

1.2.3 PÉPTIDOS ANTITUMORALES CON BLANCO INTRACELULAR

La proteína p53, es un factor de transcripción que forma parte del mecanismo de control del ciclo celular y actúa como supresor de tumores. Frente a daños en el DNA, p53 induce la detención del ciclo celular al final de la fase G1 para que este sea reparado antes de su replicación en la fase S, o bien, induce la muerte celular por apoptosis [47, 48]. Es bastante atractiva como blanco terapéutico, pues se ha determinado que en la mayoría de los tumores humanos, p53 se encuentra alterado [47, 49]. Esta proteína está constituida por tres dominios funcionales (ver Figura 2): un dominio de transactivación en su extremo amino, un dominio central de unión a DNA y un dominio de tetramerización y regulación alostérica en su extremo carboxilo [50].

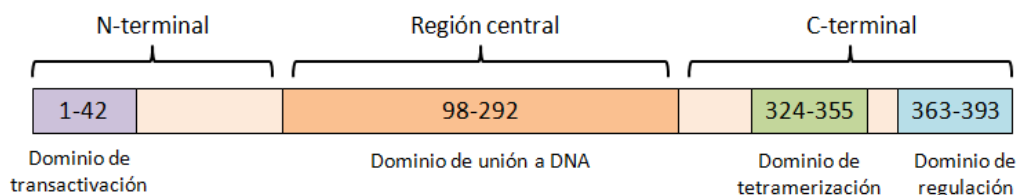


Figura 2: Dominios funcionales de p53 [50]. El extremo N-terminal contiene un dominio de transactivación que interactúa con factores de transcripción, acetiltransferasas y la proteína mdm2. La región central corresponde al dominio de unión a DNA. El extremo C-terminal contiene un dominio tetramerización y otro de de regulación.

Se ha encontrado que péptidos derivados de las regiones N-terminal y C-terminal de p53, unidos a péptidos de penetración celular presentan actividad antitumoral selectiva en células cancerígenas. A continuación se describen dos ejemplos en los que se utiliza Penetratin, específicamente, el derivado de este CPP correspondiente a su secuencia inversa con sustitución de los aminoácidos Isoleucina por Valina (KKWKMRRNQFWVKVQRG).

1.2.3.1 P53PANT

El péptido p53pAnt, es un péptido formado por parte de la región reguladora de la proteína p53, correspondiente a los residuos 361-382, fusionado por su extremo carboxilo al péptido de penetración celular Penetratin (ver Figura 3).

GSRAHSSHLKSKKGQSTSRHKKWKMRRNQFWVKVQRG

Figura 3: Secuencia del péptido p53pAnt. Los aminoácidos en cursiva corresponden a la secuencia del péptido de penetración celular Penetratin.

Este péptido tiene la característica de inducir apoptosis selectiva en células cancerígenas con p53 mutado o sobreexpresado, mediante un proceso dependiente de p53, pues no ocurre en células que no lo producen [51, 52]. Ha sido probado *in vitro* en varios tipos celulares, tales como células cancerígenas de colon [51, 53], mama [52, 53], pulmón [53] y linfoma [51]. Además, se registró que produce necrosis selectiva en células de cáncer de próstata [54] y que es capaz de inducir selectivamente muerte celular por apoptosis *in vivo* en un modelo de tumor cerebral (glioma) en ratas [55].

Sobre el mecanismo de acción, se sabe que es independiente de la síntesis de proteínas [52] y, por lo tanto, ocurriría por la vía extrínseca de señalización. Se ha propuesto que éste sería mediante la

vía de Fas/Apo-1 debido a que produce un aumento en la expresión en superficie del receptor Fas [52, 55], la que ocurriría por redistribución del receptor desde el complejo de Golgi [52]. Además, se ha determinado que la acción de la molécula formada por la interacción del péptido con p53, ocurre a nivel del ligando FADD, ya sea mediante interacción directa o indirecta [53]. Sin embargo, el mecanismo no está completamente definido.

Se ha demostrado que este péptido produce necrosis selectiva en células de cáncer de próstata con p53 mutado [56] y en células con resistencia a la quimioterapia [56]. El mecanismo por el cual p53pAnt induce muerte celular por necrosis no se ha definido completamente, pero se ha visto que las células presentan características de ejecución incompleta de apoptosis y que, además, la inducción de necrosis ocurriría al alcanzarse un peak (inusual en otros tipos celulares) en los niveles de acumulación de superóxido [56]. El proceso ocurriría, entonces, por una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) en este tipo celular, lo cual interrumpiría el proceso de muerte celular por apoptosis, desviándolo hacia necrosis [56].

1.2.3.2 PNC27

El péptido denominado PNC27, es un péptido compuesto por el dominio de unión a mdm-2 de la proteína p53, que corresponde a los residuos 12-26 de la región de transactivación, y por el péptido de penetración celular Penetratin; ambas secuencias aminoacídicas unidas según se muestra en la Figura 4.

PPLSQETFSDLWKLLKKWKMRRNQFWVKVQRG

Figura 4: Secuencia del péptido PNC27. Los aminoácidos en cursiva corresponden a la secuencia del péptido de penetración celular Penetratin.

Este péptido fue diseñado para unirse a mdm-2, inhibiendo la unión de p53 a esta molécula para, de esta forma, disminuir la degradación de p53 y promover la transcripción de proteínas apoptóticas [57]. Sin embargo, el péptido mostró un mecanismo de acción diferente, ya que produce necrosis selectiva *in vitro* en varios tipos celulares cancerígenos (páncreas, mama, sarcoma y melanoma) [58-60].

Se ha determinado que PNC27 posee una estructura anfipática [61, 62] que le permitiría integrarse en la membrana celular formando poros, para finalmente producir muerte celular por la ruptura de la membrana plasmática, en un mecanismo independiente de p53 [58, 61, 63].

La selectividad del péptido sobre las células tumorales se debería a que éstas expresan mdm-2 en su membrana plasmática [64, 65]. Mdm-2 regula la degradación de e-cadherina, una molécula involucrada en la adhesión celular, para lo cual se co-localiza con ella en la membrana [65]. En células no tumorales, el péptido ingresa a la célula, sin embargo, en células cancerígenas éste queda retenido en la membrana debido a su afinidad por mdm-2, formando poros [64].

1.3 DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO Y JUSTIFICACIÓN

La mayoría de los medicamentos actuales tienen como blanco terapéutico receptores en la superficie celular, probablemente debido a que la membrana celular es una barrera que impide el ingreso de la mayoría de las macromoléculas a la célula. Considerando que éstos son sólo una pequeña fracción de los posibles blancos terapéuticos, la posibilidad de explorar blancos intracelulares genera nuevas e interesantes perspectivas para el estudio de nuevos medicamentos.

El disponer de un sistema de expresión bacteriana de péptidos que sea fácilmente adaptable y permita la síntesis en cantidades y pureza suficientes para realizar ensayos biológicos, permitiría

potenciar el descubrimiento y el desarrollo de nuevos péptidos terapéuticos. En particular, en la investigación y desarrollo de nuevos péptidos con potencial terapéutico y blanco intracelular, un sistema de producción recombinante puede llegar a ser una herramienta importante si se utiliza la estrategia de unión a un péptido de penetración celular como transportador, ya que éste aumenta el tamaño del péptido a sintetizar.

A fines de los 90's, un grupo de investigadores diseñó un sistema de expresión bacteriana de proteínas fusionadas al péptido de penetración celular TAT [66]. En dicho sistema, las proteínas son expresadas con un extremo amino terminal de 6 histidinas, seguido de los aminoácidos correspondientes al péptido TAT, 2 residuos de glicina y un epítipo de hemaglutinina (HA). El sistema de expresión y otros sistemas derivados del mismo han sido utilizados exitosamente para la expresión de proteínas de fusión de distintos tamaños (15 a 115 kDa), las cuales mostraron tener la capacidad de ingresar a la célula y ser biológicamente activas [66-71]; sin embargo, la evaluación del potencial terapéutico de péptidos y proteínas producidos por este sistema podría verse afectada por los residuos adicionales incorporados con fines de purificación y detección.

El proyecto de tesis consiste en el diseño de un sistema de expresión bacteriana de péptidos con potencial terapéutico y blanco intracelular, el cual permita la producción de los péptidos sin residuos adicionales y en cantidad y pureza adecuadas para ser usados en investigación avanzada.

El diseño está orientado a obtener un sistema de expresión versátil, que permita la producción de diversos péptidos fusionados por su extremo carboxilo al péptido de penetración celular Penetratin.

Para la evaluación e implementación del sistema de expresión se utiliza los péptidos p53pAnt y PNC27, descritos anteriormente.

1.4 OBJETIVOS

El objetivo general del trabajo de tesis es el diseño, implementación y evaluación de un sistema de expresión recombinante de péptidos en *Escherichia coli*, que permita potenciar el descubrimiento y desarrollo de nuevos péptidos terapéuticos con blanco intracelular.

Con este fin, se fijaron los siguientes objetivos específicos:

- Diseñar un sistema de expresión recombinante de péptidos usando como huésped el microorganismo *Escherichia coli*.
- Clonar las secuencias nucleotídicas de los péptidos p53pAnt y PNC27 en el vector de expresión diseñado y analizar su expresión recombinante.
- Implementar y evaluar las etapas la purificación de los péptidos expresados en *Escherichia coli*, a partir de la estrategia diseñada.
- Evaluar el desempeño del sistema diseñado, respecto a la pureza del producto y a la productividad lograda.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 CÉLULAS HUÉSPED Y VECTORES

Como huésped de clonación se utilizó células de *Escherichia coli* DH5 α , genotipo F⁻ ϕ 80/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK⁻, mK⁺) *phoA supE44* λ ⁻ *thi-1 gyrA96 relA1*. Para la expresión de proteínas recombinantes se utilizó células de *E. coli* BL21(DE3), genotipo B F⁻ *dcm ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *gal* λ (DE3).

El vector de clonamiento pGEM-T Easy (Promega) se utilizó para la amplificación *in vivo* de secuencias nucleotídicas. En el Anexo A.1 se muestra un esquema de este vector.

Como base para la construcción del sistema de expresión diseñado se utilizó el vector de expresión pET-31b(+) (Novagen), cuyo esquema se muestra en el Anexo A.2.

2.2 CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN pET31HT

Para la expresión de péptidos con potencial terapéutico y blanco intracelular se diseñó un vector de expresión que permite expresar el péptido fusionado por su extremo amino a una proteína insoluble denominada cetoesteroide isomerasa (KSI, del inglés ketosteroid isomerase). La fusión a esta proteína permite dirigir la expresión hacia la producción como cuerpos de inclusión, lo que permite proteger a los péptidos de la degradación enzimática. También se incluyó un extremo de polihistidinas para facilitar la purificación del péptido fusionado mediante un proceso compatible con las condiciones desnaturantes necesarias para la solubilización de los cuerpos de inclusión. Finalmente, para separar el péptido del resto de la proteína de fusión, se agregó un sitio de corte para Trombina, una proteasa que corta en el

extremo carboxilo de la secuencia de reconocimiento [72], por lo que no deja residuos adicionales en el péptido.

Para construir el vector con las características deseadas se modificó el vector comercial pET-31b(+) (ver Figura 5). Este vector fue digerido simultáneamente con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* (ambas de New England Biolabs), siguiendo las instrucciones del proveedor. Se generó como producto de la digestión un fragmento de 384 bp que codifica para la proteína KSI, el que se usará como templado en la reacción de PCR para sintetizar KSI' (como se describe a continuación).



Figura 5: Esquema de la región codificante del vector comercial pET-31b(+). En rojo se indica la ubicación de secuencia codificante para la proteína cetosteroides isomerasa (KSI) y en verde la secuencia codificante para el extremo de polihistidinas. En anaranjado se muestra la ubicación de los sitios de restricción para *NdeI* y *XhoI*.

Se diseñó los partidores KSI_{sense} y KSI_{reverse} (ver Tabla 2) para amplificar la secuencia codificante para KSI e incorporar las características requeridas para la construcción de nuevo vector de expresión. Para determinar su temperatura de melting, analizar la formación de estructuras tipo horquilla y la posibilidad de auto-dimerización, se utilizó la herramienta en línea OligoCalc [73].

El partidore KSI_{sense} amplifica la secuencia codificante para KSI incorporando en su extremo 5' seis codones de histidina para permitir la producción de KSI con un extremo de polihistidinas en el extremo amino. Además se adicionó un sitio de restricción para *NdeI* que contiene el codón de inicio de la traducción. El partidore KSI_{reverse} contiene la secuencia codificante para el sitio de corte para *Trombina* y las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción *AvrII* y *Pacl*, que se incluyen para crear el sitio de clonamiento de los péptidos a expresar. Finalmente, se incluyó un sitio de

reconocimiento para *Xho*I en el extremo 3' (ver Figura 6). La secuencia de este producto de amplificación tiene un tamaño de 423 bp y se denominó KSI'.

Tabla 2: Secuencias nucleotídicas de los partidores utilizados para generar KSI'.

Partidor	Secuencia nucleotídica
KSI _{sense}	5'CATATGCACCACCACCACCACCACCATACCCCAGAACACA3'
KSI _{reverse}	5'CTCGAGTTAATTAACCCCTAGGACCCGCTGGCATGCGTGAAT3'

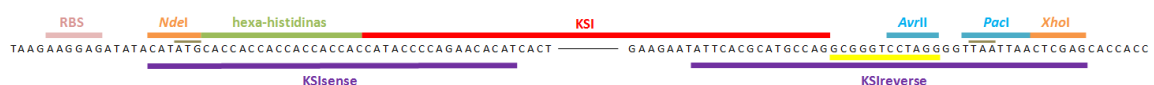


Figura 6: Esquema de la región codificante del vector diseñado pET31HT. En rojo se indica la ubicación de la secuencia codificante para la proteína cetosteroides isomerasa (KSI) y en verde la secuencia que codifica para el extremo de polihistidinas. En anaranjado se muestra la ubicación de los sitios de restricción conservados y en celeste los sitios de restricción que forman el sitio de clonamiento diseñado. En amarillo se destaca la secuencia codificante para el sitio de reconocimiento de la proteasa Trombina. En lila se indica los partidores usados para amplificar KSI e insertar las características deseadas.

La reacción de PCR se realizó usando los partidores KSI_{sense} y KSI_{reverse} con la enzima Elongase (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del proveedor, con una concentración final de Mg⁺² de 1,9 mM. El programa de amplificación utilizado se muestra en la Tabla 3:

Tabla 3: Programa de amplificación de KSI desde pET-31b(+)

Paso	Temperatura [°C]	Tiempo
1	94	1 minuto
2	94	30 segundos
3	38	30 segundos
4	68	30 segundos
5	Repetir 4 veces los pasos 2 al 4	
6	94	30 segundos
7	68	30 segundos
8	Repetir 29 veces los pasos 6 al 7	
9	68	1 minuto

El producto de PCR se analizó en un gel de agarosa 2 % y se purificó desde el gel utilizando el sistema QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen), según las instrucciones del fabricante. El fragmento purificado se ligó al vector pGEM[®]-T Easy (Promega), para luego transformar el producto de ligación por electroporación en células electrocompetentes de *Escherichia coli* DH5 α . Las células transformadas se plaquearon en medio LB agar con carbenicilina [100 μ g/mL], IPTG [0,5 mM] y x-gal [80 ng/mL] y se cultivaron a 37°C durante la noche. Luego se realizó PCR de colonias blancas, usando los partidores KSI_{sense} y KSI_{reverse} y se envió a secuenciar el DNA plasmidial (pGEM-T-KSI') obtenido por minipreparación de dos colonias positivas (Macrogen, Corea), utilizando los partidores universales pUC/M13 forward y pUC/M13 reverse. Este DNA plasmidial fue digerido con las enzimas *Nde*I y *Xho*I en forma simultánea, y se purificó el producto correspondiente a KSI' desde un gel de agarosa 2%. A continuación, se realizó la ligación de KSI' con el vector pET-31b(+) previamente digerido, utilizando la enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen), para generar el vector de expresión pET31HT. La mezcla de ligación se usó para transformar células electrocompetentes de *Escherichia coli* DH5 α . Las células transformadas se sembraron en medio LB agar con carbenicilina [100 μ g/mL] y se incubaron a 37°C durante la noche. Se seleccionó al azar dos de las colonias obtenidas para realizar minipreparación de DNA plasmidial y se secuenció la región de interés del vector obtenido usando los partidores universales T7 promoter y T7 terminator.

2.3 CLONAMIENTO DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE P53PANT Y PNC27 EN pET31HT

Las secuencias nucleotídicas codificantes para los péptidos p53pAnt y PNC27 se sintetizaron como dos pares de oligonucleótidos de hebra simple (Integrated DNA Technologies) según se muestra en la Tabla 4. Para favorecer el proceso de síntesis, las secuencias se diseñaron utilizando los codones de mayor frecuencia en *Escherichia coli*. Se incluye además sitios de restricción para las enzimas *Avr*II y *Pac*I para facilitar en posterior clonamiento en el vector de expresión pET31HT. Cada oligonucleótido se

solubilizó en agua destilada a una concentración final de 100 μ M. Para alinear los oligonucleótidos complementarios p53pAntS/p53pAntR y PNC27S/PNC27R, para cada par se preparó una mezcla con cada oligonucleótido a una concentración final de 10 μ M. Las mezclas se llevaron a 95°C por 5 minutos. Luego fueron puestas en un baño de agua hirviendo, donde se les dejó enfriar lentamente hasta temperatura ambiente.

Tabla 4: Secuencias nucleotídicas de los oligonucleótidos sintetizados.

Péptido	Oligonucleótido	Secuencia nucleotídica
p53pAnt	p53pAntS	5' <u>CCTAGGGG</u> CAGCCGCGCCCATAGCAGTCATCTGAAGAGCAAAAAGGGTC AGAGTACCAGCCGTCACAAGAAATGGAAAATGCGCCGTAACCAGTTCTGGG <u>TGAAAGTTCAACGCGGTTAATTAA</u> 3'
	p53pAntR	5' <u>TTAATTAACCGCGTTGA</u> ACTTTCACCCAGAACTGGTTACGGCGCATTTC TTCTTGACGGCTGGTACTCTGACCCTTTTGTCTTCAGATGACTGCTAT GGGCGCGGCTGCCCTAGG3'
PNC27	PNC27S	5' <u>CCTAGGCCG</u> CCGCTGAGCCAGGAAACCTTCTCTGATCTGTGGAAACTGCT GAAGAAATGGAAAATGCGCCGTAACCAGTTCTGGGTGAAAGTTCAACGCGG <u>TTAATTA</u> 3'
	PNC27R	5' <u>TTAATTAACCGCGTTGA</u> ACTTTCACCCAGAACTGGTTACGGCGCATTTC TTCTTCAGCAGTTCCACAGATCAGAGAAGGTTTCTGGCTCAGCGGCGG <u>CTAGG</u> 3'

Los oligonucleótidos de doble hebra fueron adenilados en los extremos 3' para poder ser ligados al vector de clonamiento pGEM®-T Easy. La reacción de adenilación se llevó a cabo con la enzima Taq DNA Polymerase (Promega) a 70°C por 45 minutos.

Los oligonucleótidos adenilados fueron desalinizados usando el sistema QIAEX II Gel Extraction Kit según protocolo indicado por el fabricante (Qiagen), y luego ligados a pGEM®-T Easy siguiendo las instrucciones del proveedor del vector. Las mezclas de ligación se usaron para transformar células electrocompetentes de *Escherichia coli* DH5 α , las que se crecieron en medio LB agar con carbenicilina [100 μ g/mL], IPTG [0,5 mM] y x-gal [80 ng/mL] a 37°C durante la noche. Se seleccionó al azar dos de las

colonias blancas obtenidas en cada transformación y se realizó minipreparación de DNA plasmidial, el cual se envió a secuenciar utilizando los partidores pUC/M13 forward y pUC/M13 reverse (Macrogen, Corea).

Los vectores de clonamiento con las secuencias nucleotídicas de los péptidos se denominaron pGEM-T-p53pAnt y pGEM-T-PNC27. Estos vectores fueron digeridos simultáneamente con las enzimas de restricción *AvrII* y *PacI* (New England Biolabs) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó lo mismo con el vector pET31HT. Los productos de digestión se cargaron en un gel de agarosa 1% y se purificaron siguiendo el protocolo indicado en el manual del sistema QIAEX II Gel Extraction Kit.

Posteriormente, las secuencias nucleotídicas de los péptidos p53pAnt y PNC27 fueron ligadas al vector de expresión pET31HT usando la enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen) para generar los vectores de pET31HT-p53pAnt y pET31HT-PNC27. Con las mezclas de ligación se transformó células electrocompetentes de *Escherichia coli* BL21(DE3), las que se crecieron en medio LB agar con carbenicilina [100 µg/mL] a 37°C durante la noche. Se seleccionó al azar dos de las colonias obtenidas en cada transformación y se realizó minipreparación de DNA plasmidial. Las muestras de DNA obtenidas fueron enviadas a secuenciar utilizando los partidores T7 promoter y T7 terminator.

2.4 EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE LOS PÉPTIDOS EN *ESCHERICHIA COLI*

Para inducir la producción recombinante de los péptidos fusionados en las colonias transformadas con las construcciones pET31HT-p53pAnt y pET31HT-PNC27, se creció un preinóculo de cada construcción, y otro de una colonia transformada con el vector pET31HT como control, en medio LB con ampicilina [100 µg/mL] a 37°C durante la noche. Con ello se inoculó 100 mL de medio LB con ampicilina [100 µg/mL] de manera de obtener una DO_{600} inicial de 0,05 y se creció a 37°C hasta alcanzar

una $DO_{600}=0,6$. Luego, se agregó el inductor IPTG a una concentración final de 1 mM y se incubó a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una $DO_{600}=2,0$.

Las células se colectaron por centrifugación a 5.000 x g por 10 minutos, se resuspendieron en buffer de unión (Tris-HCl 40 mM pH 7,9, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM) y luego se lisaron por sonicación en 2 ciclos de 5 pulsos de 30 segundos y 20 W en un sonicador Microson Ultrasonic Cell Disruptor. Las células lisadas se centrifugaron por 10 minutos a 12.000 x g. El pellet, que contiene las proteínas citoplasmáticas insolubles, se solubilizó en buffer de unión desnaturalante (Tris-HCl 40 mM pH 7,9, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM, urea 8 M) y se centrifugó nuevamente 10 minutos a 12.000 x g para eliminar cualquier material insoluble restante.

El análisis de la expresión de proteínas en las distintas fracciones celulares se realizó mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida 12,5% T, 3% C, donde T corresponde a la concentración total de monómeros (acrilamida y el agente reticulante o *crosslinker* bisacrilamida) y C a la concentración de bisacrilamida respecto al total de monómeros. Los geles se prepararon según se indica en el Anexo A.3.1. Antes de ser cargadas en el gel, a las muestras de proteína se les agregó buffer de carga 5x (Tris-HCl pH 6,8 60 mM, glicerol 25%, SDS 2%, β -mercaptoetanol 14,4 mM, azul de bromofenol 0,1%) y luego se calentaron a 100°C por 5 minutos. Las muestras de proteína solubilizadas en buffer con urea no se calentaron para evitar la carbamilación de sus aminoácidos. La electroforesis se realizó en buffer de electroforesis Tris-glicina (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 1%) a 200 V durante 45 minutos. Se utilizó como método de detección la tinción con azul de Coomassie.

La cantidad de proteína presente en las muestras se determinó por el método de Bradford, utilizando una curva de calibración con concentraciones de BSA entre 0 mg/mL y 1 mg/mL.

La estimación de la cantidad de proteína recombinante en cada muestra se determinó a partir de la proporción de ésta respecto al total de las proteínas presentes. Este valor se calculó mediante el análisis de las imágenes de los geles de SDS-poliacrilamida con el software ImageJ [74], y se aplicó a los resultados de cuantificación de proteína total en las muestras. Con el fin de confirmar los resultados obtenidos por este método, se elaboró una curva de calibración en gel con concentraciones de BSA en el rango de 0,03125 µg a 16 µg por carril y se comparó visualmente las bandas de la curva con aquellas correspondientes a proteína recombinante en las muestras analizadas.

El peso seco celular se determinó a partir de 5 mL de cultivo colectado en un tubo Eppendorf de 1,5 mL previamente pesado. Se centrifugó 1 mL de cultivo a la vez, 3 minutos a 13.000 rpm, descartando el sobrenadante; se lavó el pellet acumulado con una solución de NaCl 9% y luego se dejó secar en estufa a 80°C. El peso seco se determinó en triplicado.

2.5 PURIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS FUSIONADOS

Los péptidos fusionados fueron purificados por cromatografía de afinidad al extremo de polihistidinas en condiciones desnaturalantes y utilizando la resina Ni-NTA (QIAGEN).

A las proteínas citoplasmáticas insolubles, solubilizadas en buffer de unión desnaturalante (Tris-HCl 40 mM pH 7,9, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM, urea 8 M), se agregó la resina previamente ambientada en y se incubó con agitación suave durante 2 horas. A continuación se cargó la mezcla en una columna de cromatografía y la resina empacada fue lavada con buffer de unión desnaturalante. La elución de la proteína desde la columna se realizó con buffer de elución desnaturalante (Tris-HCl 40 mM pH 7,9, NaCl 500 mM, imidazol 300 mM, urea 8 M).

Las fracciones colectadas fueron analizadas mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida 12,5% T, 3% C, utilizando como método de detección la tinción con azul de Coomassie. La cuantificación de la proteína presente en las distintas fracciones se realizó por el método de Bradford.

2.6 PROTEÓLISIS ENZIMÁTICA Y PURIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS RECOMBINANTES

Una vez que los péptidos unidos a la proteína KSI se purificaron se procedió a su separación. Para esto, el sistema diseñado agrega la secuencia aminoacídica AGPR entre la proteína cetosteroides isomerasa y el péptido. Esta secuencia es reconocida por la proteasa Trombina y corta en el extremo carboxilo del aminoácido arginina [72]; con esto se espera que la proteasa permita liberar los péptidos desde la proteína de fusión sin dejar residuos adicionales.

Las fracciones que contienen los péptidos fusionados fueron sometidas previamente a distintos tratamientos con el fin de ser llevadas a condiciones compatibles con el uso de la proteasa.

Se analizó el desempeño de la enzima Trombina en solución (Thrombin, Restriction Grade, Novagen) y de Trombina inmovilizada (Thrombin CleanCleave™, Sigma), para lo cual se agregó 1 U de Trombina por mg de proteína, y se incubó la reacción a 23°C.

Como el diseño del sistema incorporó un extremo amino de polihistidinas en la proteína KSI, una vez realizada la proteólisis enzimática, los péptidos recombinantes fueron purificados mediante una segunda cromatografía de afinidad. La resina Ni-NTA se ambientó previamente con el buffer de la muestra y se incubó con agitación suave durante 1 hora. Luego la muestra con la resina se cargó en una columna de cromatografía y se colectó el sobrenadante. Se lavó la columna con el mismo buffer con el fin de maximizar la recuperación del péptido en solución.

El péptido purificado fue precipitado agregando 5 volúmenes de acetona fría e incubando a -20°C durante la noche. El precipitado fue colectado por centrifugación a 13.000 x g por 15 min a 0°C y finalmente lavado con 2 volúmenes de acetona fría.

2.7 CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO

Los péptidos fueron analizados por electroforesis en geles SDS-poliacrilamida 10%C, 3%T. Los geles se prepararon según se indica en el Anexo A.3.2. Se utilizó el sistema de buffer de electroforesis Tris-tricina (buffer anódico Tris-HCl 200 mM, pH 8,9 y buffer catódico Tris 100 mM, tricina 100 mM, SDS 100 mM). Los péptidos se visualizaron mediante tinción con azul de Coomasie y con nitrato de plata para caracterización de pureza. Su cuantificación se realizó por el método de Bradford utilizando una curva de calibración elaborada con concentraciones de BSA en el rango de 0 mg/mL a 1 mg/mL .

Se realizó análisis de espectrometría de masas de las muestras para confirmar la presencia del producto (Centro de Estudio para el Desarrollo de la Química, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile). Se utilizó la técnica MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight). Las muestras se llevaron a ácido fórmico 0,1% v/v y metanol 3% v/v. Para la obtención de espectros se utilizó como matriz α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA). El equipo utilizado fue MALDI-TOF Microflex (Bruker Daltonics Inc. MA-USA) en modo ión positivo mediante detección lineal.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 DISEÑO Y LA MANIPULACIÓN GENÉTICA

3.1.1 CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN pET31HT

Se realizó el diseño conceptual de un vector de expresión para péptidos con potencial terapéutico y blanco intracelular en *Escherichia coli*. Con el fin de proteger a los péptidos de la degradación enzimática durante su producción y, de esta forma, poder alcanzar mayores rendimientos, se diseñó un sistema de expresión que permite dirigir la producción del péptido recombinante hacia cuerpos de inclusión mediante la fusión a la proteína insoluble cetoesteroide isomerasa (KSI). Los cuerpos de inclusión son estables frente a la proteólisis [75, 76], además, están enriquecidos en proteína recombinante [75] y tienen la ventaja de ser fácilmente recuperables mediante centrifugación [77], con lo que a partir de ellos se puede obtener proteína bastante pura.

Por otra parte, el sistema diseñado permite la purificación del péptido fusionado a KSI mediante cromatografía de afinidad a metales (IMAC) mediante la inclusión de un extremo de polihistidinas. En la proteína se incorporó también un sitio de reconocimiento para la proteasa Trombina, que permite separar el péptido de la proteína KSI sin dejar residuos adicionales en él.

El vector incluye sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *AvrII* y *PacI*, que permiten clonar los péptidos deseados manteniendo las características de diseño. *AvrII* permite el clonamiento de la secuencia codificante para el péptido inmediatamente después la secuencia que da origen al sitio de corte de la enzima Trombina, mientras que *PacI* incluye el codón de término de traducción.

Un esquema de la proteína de fusión producida por el vector diseñado se muestra en la Figura 7. Las secuencias teóricas de los péptidos unidos a KSI fueron analizadas con el software PeptideCutter disponible en el servidor ExPASy del Swiss Institute of Bioinformatics [78], confirmando la presencia de un único sitio de reconocimiento para la proteasa Trombina.



Figura 7: Esquema de la proteína recombinante producida por el vector de expresión diseñado. En rojo se indica la ubicación de la proteína cetoesteroide isomerasa (KSI) y en verde el extremo de polihistidinas. En amarillo se muestra el sitio de reconocimiento de la proteasa Trombina y la flecha amarilla indica el sitio de corte. En celeste se muestra la ubicación del péptido recombinante.

Para construir el vector con las características deseadas se modificó el vector comercial pET-31b(+). La modificación consistió en cortar dicho vector con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* para separar la secuencia codificante para la proteína KSI, y luego, en su lugar, clonar una secuencia que se denominó KSI'. Esta secuencia, a diferencia de la original, incluye en su extremo 5' una secuencia codificante para hexahistidinas y en su extremo 3' una secuencia que codifica para el sitio de corte para Trombina. Además, contiene las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción *AvrII* y *PacI*, que conforman el sitio de clonamiento para la secuencia de los péptidos.

La Figura 8 muestra un esquema del proceso de construcción del vector diseñado denominado pET31HT. El detalle de los resultados de cada etapa se presenta a continuación.

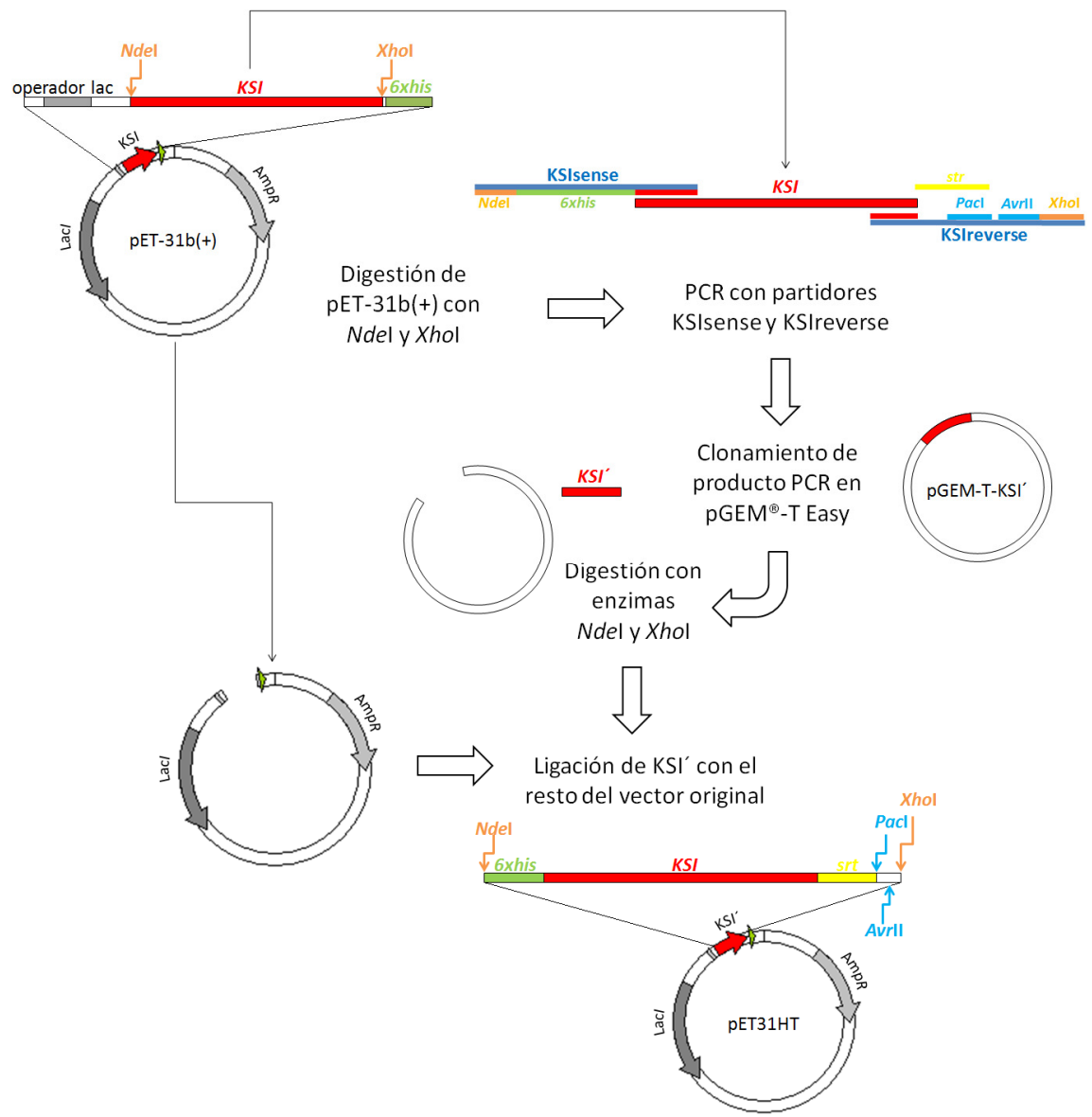


Figura 8: Esquema del proceso de construcción del vector pET31HT.

El producto de digestión del vector pET-31b(+) con las enzimas *NdeI* y *XhoI* se puede ver en la Figura 9. La banda inferior, que se visualiza levemente, corresponde a *KSI* cuyo tamaño es de 384 bp. La banda superior que corresponde al resto del vector tiene un tamaño de 5358 bp. Ambas bandas fueron purificadas desde el gel mediante el sistema QIAEX II Gel Extraction Kit.

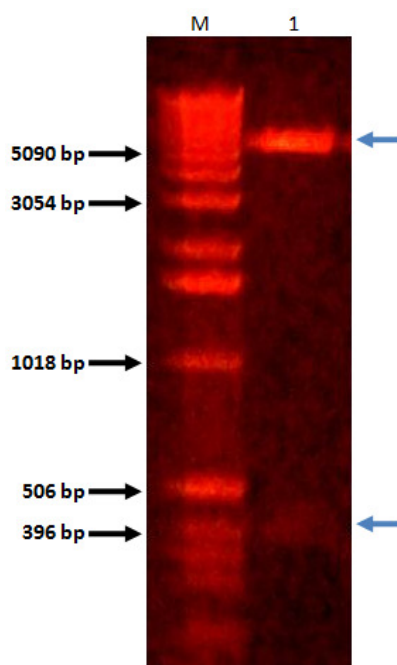


Figura 9: Análisis electroforético de la digestión de pET-31b(+) con *NdeI* y *XhoI*. Gel de agarosa 1 %. M: Marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen). 1: Producto de digestión de pET-31b(+). Las bandas correspondientes a KSI y al remanente del vector se indican con flecha azul.

El DNA de la banda correspondiente a KSI fue usado como templado para la reacción de PCR que, usando los partidores KSI_{sense} y KSI_{reverse}, sintetizó KSI', de 423 bp. El producto de la reacción se cargó en un gel de agarosa 2%, cuya foto se muestra en la Figura 10. Se puede ver claramente la banda con el tamaño esperado correspondiente al producto de amplificación.

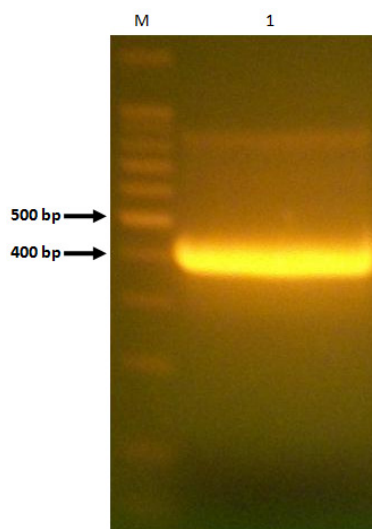


Figura 10: Análisis electroforético del producto de amplificación KSI'. Gel de agarosa 2 %. M: Marcador de peso molecular de 100 bp (Promega). 1: Producto de PCR de KSI.

El DNA purificado desde la banda de amplificación se ligó al vector de clonamiento pGEM[®]-T Easy y se transformó células de *Escherichia coli* DH5 α con la mezcla de ligación. Las células transformadas fueron crecidas en placas con medio LB durante la noche. Luego se realizó PCR de colonias blancas, se seleccionó un par de colonias positivas para extraer DNA plasmidial y se envió a secuenciar. Una vez confirmada la correcta secuencia del producto de amplificación clonado en pGEM[®]-T Easy, se recuperó KSI' y se ligó al vector pET-31b(+) para generar el nuevo vector de expresión pET31HT. La correcta construcción del vector se confirmó por secuenciación.

3.1.2 CLONAMIENTO DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE P53PANT Y PNC27 EN pET31HT

Las secuencias nucleotídicas que codifican para los péptidos p53pAnt y PNC27 fueron sintetizadas como dos pares de oligonucleótidos de hebra simple complementarios. Ambas secuencias se

sintetizaron con los sitios de restricción para las enzimas *AvrII* y *PacI*, los que son necesarios para su clonamiento en el vector de expresión pET31HT.

Los oligonucleótidos complementarios fueron alineados y se obtuvo las secuencias codificantes para los péptidos p53pAnt y PNC27 como DNA de doble hebra.

Posteriormente, para poder ligar estas secuencias al vector de clonamiento pGEM[®]-T Easy, éstas fueron adeniladas en los extremos 3'. Luego las secuencias fueron desalinizadas y clonadas en el vector pGEM[®]-T Easy. Los vectores resultantes se denominaron pGEM-T-p53pAnt y pGEM-T-PNC27.

Se realizó minipreparación de DNA plasmidial desde dos colonias blancas transformadas con cada gen. El DNA plasmidial se analizó con la enzima de restricción *EcoRI* para confirmar el éxito del clonamiento. Las construcciones fueron analizadas por secuenciación.

Una vez confirmada la secuencia clonada, éstos vectores fueron doblemente digeridos con las enzimas de restricción *AvrII* y *PacI*. Paralelamente se digirió el vector pET31HT con las mismas enzimas. Los productos de digestión se purificaron antes de proceder al clonamiento.

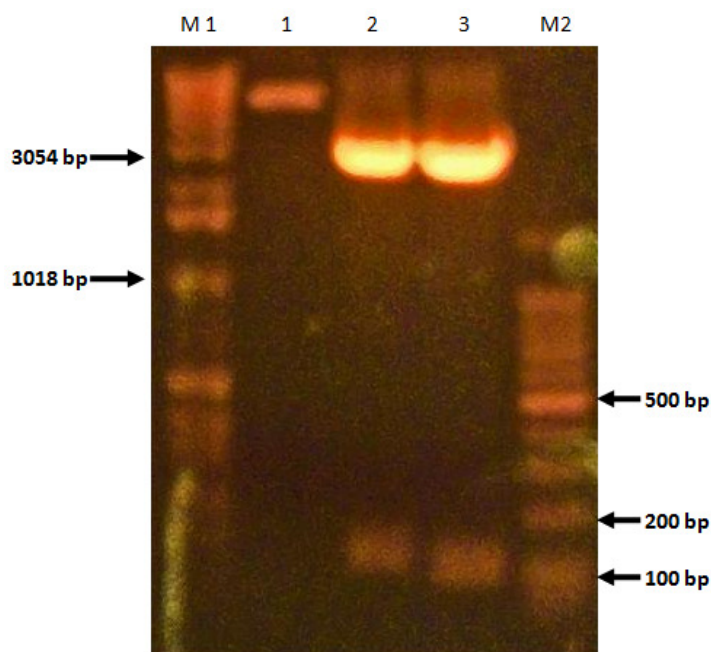


Figura 11: Análisis electroforético de los productos de digestión de pET31HT, pGEM-T-p53pAnt y pGEM-T-PNC27 con *AvrII* y *PacI*. Gel de agarosa 1%. M1: Marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen). M2: Marcador de peso molecular de 100bp (Promega). 1: pET31HT. 2: pGEM-T-p53pAnt. 3: pGEM-T-PNC27.

En la Figura 11 se puede ver el producto de la digestión del vector pET31HT, de tamaño cercano a los 6000 bp, y de los vectores pGEM-T- p53pAnt y pGEM-T-PNC27. Se aprecia las bandas correspondientes a las secuencias codificantes para p53pAnt y PNC27 de 124 bp y 109 bp, respectivamente, y una banda superior de aproximadamente 3000 bp, correspondiente al vector pGEM®-T Easy.

Posteriormente las secuencias purificadas se ligaron al vector de expresión pET31HT, generando las construcciones pET31HT-p53pAnt y pET31HT-PNC27. Con ellas se transformó células de *Escherichia coli* BL21(DE3). De las células transformadas con las mezclas de ligación se seleccionó dos colonias de las cuales se obtuvo muestras de DNA plasmidial que luego fueron secuenciadas.

La secuenciación confirmó la correcta construcción de los vectores con sus respectivos insertos, indicando que la estrategia de clonación diseñada permitió que las secuencias nucleotídicas de los péptidos p53pAnt y PNC27 fuesen insertadas en el vector pET31HT en el sitio de clonamiento correspondiente y logrando mantener el marco de lectura con la proteína KSI. En forma paralela, se transformó células de *Escherichia coli* BL21(DE3) con el vector de expresión pET31HT para ser usado como control negativo de expresión.

3.2 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS FUSIONADOS

3.2.1 EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE LOS PÉPTIDOS EN *ESCHERICHIA COLI*

Con el fin de estudiar la producción de los péptidos recombinantes en el sistema diseñado, se indujo la expresión de proteína recombinante en cultivos de *Escherichia coli* BL21(DE3) transformados con pET31HT-p53pAnt, pET31HT-PNC27 y pET31HT, este último como control de expresión de la proteína KSI.

La inducción se realizó según se indica en Materiales y Métodos. Las células fueron colectadas por centrifugación, resuspendidas en buffer de unión y lisadas por sonicación. Se tomó una muestra de las células lisadas y se rotuló como “Proteína Total”. Las células lisadas fueron centrifugadas para separar las proteínas solubles de las insolubles. Se tomó una muestra de sobrenadante y se rotuló como “Proteína Soluble”. El pellet, que contiene a las proteínas citoplasmáticas insolubles y los cuerpos de inclusión, fue solubilizado en buffer de unión desnaturante y centrifugado nuevamente para eliminar los contaminantes. El sobrenadante corresponde a la proteína insoluble. Para cada muestra, se realizó cuantificación de proteína mediante el método de Bradford.

Las muestras colectadas fueron analizadas mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida y visualizadas por tinción con azul de Coomassie.

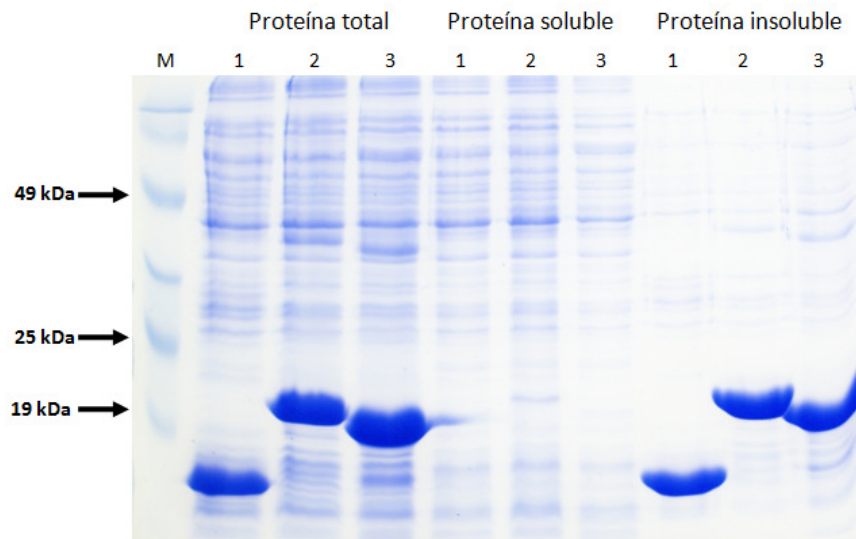


Figura 12: Análisis electroforético de proteína intracelular. SDS-PAGE 12.5% T, 3% C; buffer Tris-glicina. M: Marcador de peso molecular (Fermentas). 1: KSI; 2: KSI-p53pAnt; 3: KSI-PNC27.

En la Figura 12 se puede ver que se logró expresar ambos péptidos unidos a la proteína KSI, cuyo peso molecular es de 14,73 kDa. El peso molecular de los péptidos fusionados KSI-p53pAnt y KSI-PNC27 es de 19,09 kDa y 18,69 kDa, respectivamente. Se puede ver que la expresión, en todos los casos, se logró en forma de cuerpos de inclusión.

Se utilizó el software de análisis de imagen ImageJ [74] para estimar la proporción de proteína recombinante respecto al total de proteína presente en las muestras. Con esto, se estimó la cantidad de proteína recombinante a partir de los resultados de cuantificación.

Los valores obtenidos se confirmaron mediante una segunda cuantificación realizada a partir de la curva de calibración en gel SDS-poliacrilamida presentada en la Figura 13, comparando visualmente las bandas de la curva con las bandas correspondientes a proteína recombinante.

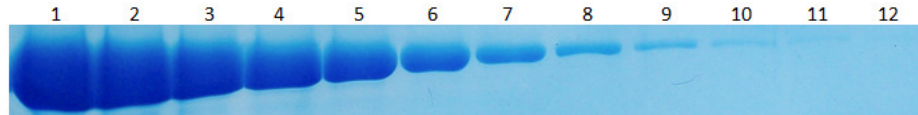


Figura 13: Curva de calibración en gel elaborada con distintas concentraciones de BSA. 1: 16 μg ; 2: 12 μg ; 3: 8 μg ; 4: 6 μg ; 5: 4 μg ; 6: 2 μg ; 7: 1 μg ; 8: 0,5 μg ; 9: 0,25 μg ; 10: 0,125 μg ; 11: 0,0625 μg ; 12: 0,03125 μg .

Se determinó que la proteína recombinante alcanza alrededor del 40% de la proteína celular total y cerca del 20% de la masa celular seca.

Los resultados son consistentes con los antecedentes bibliográficos, donde se indica que el producir proteínas recombinantes en forma de cuerpos de inclusión permite alcanzar altos niveles de producción, llegando a más de un 30% de la proteína celular total [77].

Se estudió el efecto de las condiciones de inducción en la producción de proteína recombinante KSI-p53pAnt. Los cultivos fueron hechos de la forma indicada en Materiales y Métodos pero variando el tiempo de inducción. Con el fin de alcanzar una mayor densidad celular, se realizó un segundo experimento en el que al momento de la inducción se reemplazó el medio de cultivo por medio LB fresco.

Se cuantificó proteína mediante el método de Bradford. Los resultados fueron visualizados en geles SDS-poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie. Se estimó la cantidad de proteína recombinante

a partir de los resultados de cuantificación y del análisis de las imágenes de los geles, estimando la proporción de proteína recombinante respecto al total de proteína en la fracción insoluble.

Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 5. Se observa que los cultivos en los que al momento de la inducción se reemplazó el medio por LB fresco (medio LB+LB), efectivamente alcanzaron una mayor densidad celular que su contraparte en cada uno de los tiempos medidos. Sin embargo, las razones proteína recombinante/proteína total y proteína recombinante/peso seco se mantuvieron en alrededor de 0,4 y 0,2, respectivamente, para todos los casos. Una excepción fueron aquellos casos en que el cultivo perdió viabilidad, donde se observó que ambos parámetros decrecieron.

Siendo estos valores estables, y considerando la proporción correspondiente al péptido en la composición de la proteína recombinante, se estima una productividad potencial de péptido por gramo de peso seco celular de 46,4 mg para p53pAnt y 43,1 mg para PNC27.

Tabla 5: Resultados del estudio del efecto de las condiciones de inducción en la producción de proteína recombinante

Medio	Tiempo [h]	DO ₆₀₀ final	PT [mg]*	PI [mg]*	PR/PI**	PR [mg]	PR/PT	PR/Biomasa seca
LB	3	3,026	552	431	0,51	218	0,40	0,22
	6	4,260	542	428	0,57	245	0,45	0,24
	20	3,300	654	532	0,44	233	0,36	0,23
LB+LB	3	5,286	502	400	0,50	201	0,40	0,20
	6	7,540	533	432	0,53	228	0,43	0,23
	20	7,506	568	489	0,25	122	0,22	0,12

Datos por gramo de peso seco celular. PT: Proteína Total; PI: Proteína Insoluble; PR: Proteína Recombinante

* Determinado por método de Bradford

**Determinado por análisis de densitometría de geles SDS-PAGE

3.2.2 PURIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS FUSIONADOS

Los péptidos fusionados presentes en las muestras de proteína insoluble fueron purificados por cromatografía de afinidad a polihistidinas. Para esto, las muestras fueron incubadas con resina Ni-NTA (QIAGEN) con agitación suave durante 2 horas, luego de lo cual fueron cargadas en columnas de cromatografía para empaquetar la resina. Se realizó un análisis preliminar de lavado y elución con las soluciones descritas en Materiales y Métodos, demostrándose que los péptidos fusionados efectivamente pueden ser purificados con esta estrategia. Este resultado se muestra en la Figura 14.

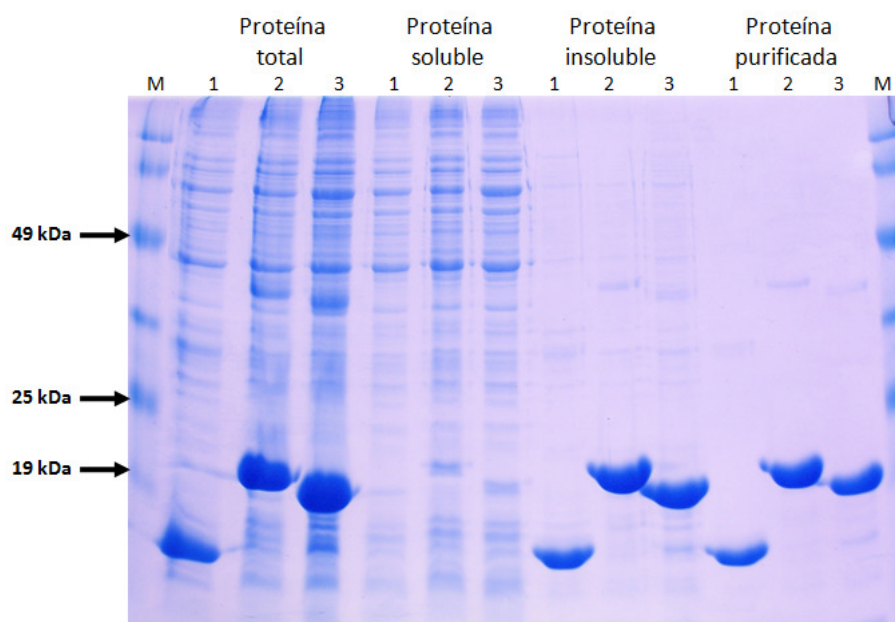


Figura 14: Análisis electroforético del caso base para el proceso de purificación de proteína recombinante. SDS-PAGE 12.5% T, 3% C; buffer Tris-glicina. M: Marcador de peso molecular (Fermentas). 1: KSI; 2: KSI-p53pAnt; 3: KSI-PNC27.

A partir de este caso base, se evaluó el desempeño de distintos patrones de lavado de la resina y de elución de los péptidos en el proceso de purificación. Se realizó un lavado de los cuerpos de inclusión con buffer de unión 2 M urea previo a la incubación con la resina. Además, una vez cargada la muestra y empaquetada la resina, se realizó un lavado con buffer de unión desnaturalante para eliminar restos de

proteína no unida a la resina; luego se lavó con buffer Tris-HCl 40 mM pH 7,9, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM, urea 8 M con el fin de eliminar proteínas contaminantes que estén unidas débilmente a la columna. Finalmente se eluyó la proteína recombinante con buffer de elución desnaturalante en dos fracciones, la primera fue colectada y usada para volver a eluir la columna 3 veces, y la segunda fracción correspondió al lavado final. En la Figura 15 se muestra el resultado de éste análisis para las muestras KSI y KSI-p53pAnt.

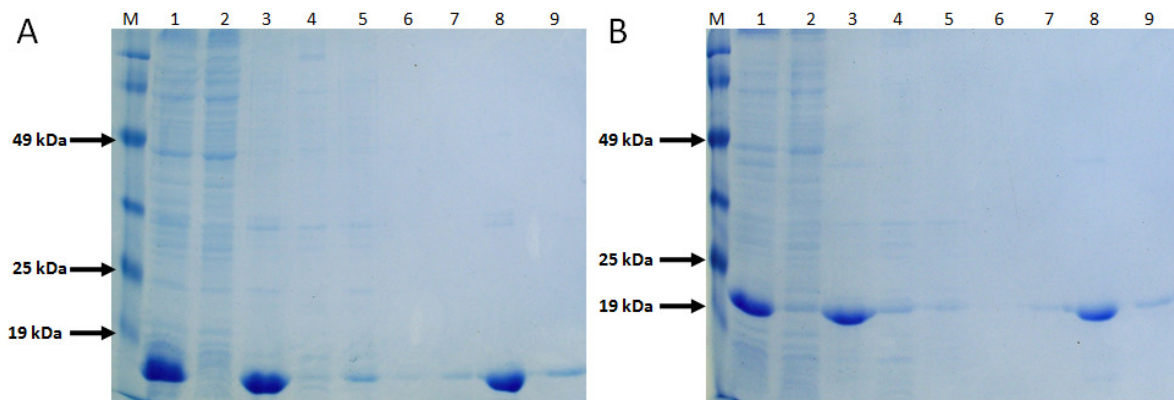


Figura 15: Análisis electroforético del proceso de purificación por cromatografía de afinidad. SDS-PAGE 12.5% T, 3% C; buffer Tris-glicina. M: Marcador de peso molecular (Fermentas). A: KSI. B: KSI-p53pAnt. 1: Proteína total; 2: Proteína soluble; 3: Proteína insoluble; 4: Lavado cuerpos de inclusión; 5: Proteína no unida a la resina; 6: Lavado con buffer de unión desnaturalante; 7: Lavado con buffer imidazol 20 mM; 8: Elución con buffer imidazol 300 mM; 9: Lavado final.

Se puede apreciar que el lavado de los cuerpos de inclusión previo a la incubación con la resina genera pérdida de una fracción de la proteína recombinante, al igual que el lavado con la solución imidazol 20 mM. Por otra parte, ninguno de estos lavados produjo mejoras en la pureza de la proteína recombinante obtenida en la fracción de elución, respecto al caso base, razón por la cual dichos tratamientos fueron descartados. Una pequeña parte de la proteína recombinante no se unió a la columna indicando que la cantidad de resina utilizada no fue suficiente. Se determinó además que este patrón de elución permite la recuperación de la mayor parte de la proteína recombinante en la primera fracción, y que la proteína restante puede ser recuperada en fracciones de elución posteriores.

Como resultado de varios análisis realizados, se determinó que el mejor desempeño respecto a recuperación y pureza de la proteína recombinante se obtiene incubando la fracción insoluble con resina a razón de 1 mL cada 5 mg de proteína y lavando con al menos el mismo volumen de buffer de unión desnaturalante que el de la muestra cargada. Se determinó que es posible recuperar cerca del 95% de la proteína recombinante en una única elución de volumen igual al de la muestra cargada. Se observó además que mediante lavados finales con buffer de elución, es posible recuperar toda la proteína recombinante que pudiese quedar unida a la resina, usando eluciones de menor volumen que posteriormente se pueden combinar con la elución principal. La Figura 16 muestra las proteínas presentes en las fracciones de elución del proceso de purificación para la construcción KSI-p53pAnt.

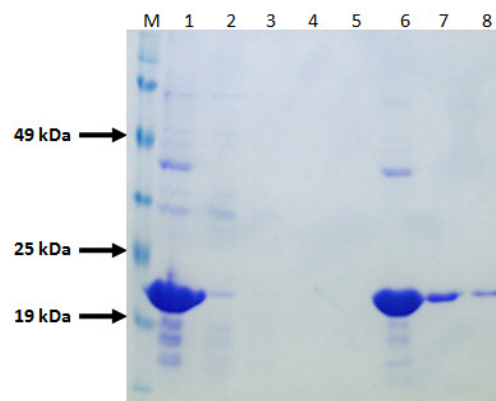


Figura 16: Análisis electroforético del proceso de purificación por cromatografía de afinidad para KSI-p53pAnt. SDS-PAGE 12.5% T, 3% C; buffer Tris-glicina. M: Marcador de peso molecular (Fermentas). 1: Proteína insoluble; 2: Proteína no unida a la resina; 3-5: Lavados sucesivos con buffer de unión desnaturalante; 6: Fracción de elución; 7-8: Lavados finales sucesivos con buffer de elución.

El proceso logra recuperar prácticamente la totalidad de la proteína recombinante en una forma relativamente pura. Observando las figuras anteriores, se puede apreciar que en la fracción de elución, la banda contaminante más intensa posee el doble del peso molecular para cada proteína recombinante, por lo que podría corresponder al dímero de la misma proteína. Para estudiar esta proposición, las

muestras de proteína insoluble de cada construcción fueron analizadas en un gel SDS-poliacrilamida en condiciones no desnaturalantes, el que se muestra en la Figura 17. Se puede ver que las bandas correspondientes a cada proteína recombinante se acompañan de bandas que tienen el doble de su peso molecular.

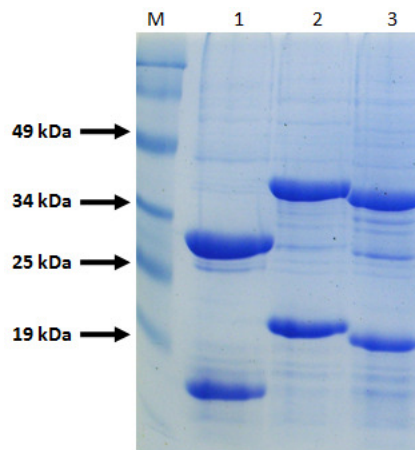


Figura 17: Análisis electroforético de proteínas insolubles en gel SDS-acrilamida no desnaturalante. SDS-PAGE 12.5% T, 3% C; buffer Tris-glicina. M: Marcador de peso molecular (Fermentas). 1: KSI (14,73 kDa); 2: KSI-p53pAnt (19,09 kDa); 3: KSI-PNC27 (18,69 kDa).

Este resultado indica que una fracción de las proteínas recombinantes se encontraría formando dímeros. Con el fin de estudiar la naturaleza de estos dímeros se realizó un análisis de las muestras en un gel SDS-poliacrilamida utilizando distintos buffer de carga: no desnaturalante (Tris-HCl pH 6,8 60 mM, glicerol 25%, azul de bromofenol 0,1%), no desnaturalante con SDS (Tris-HCl pH 6,8 60 mM, glicerol 25%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%), no desnaturalante con β -mercaptoetanol (Tris-HCl pH 6,8 60 mM, glicerol 25%, β -mercaptoetanol 14,4 mM, azul de bromofenol 0,1%) y no desnaturalante con SDS y β -mercaptoetanol (desnaturalante).

Se observó que al utilizar buffer de carga no desnaturalante con SDS la proteína recombinante se mantiene formando dímeros en igual proporción que al usar buffer de carga no desnaturalante. Por otra parte, al añadir β -mercaptoetanol al buffer de carga no desnaturalante la mayor parte de las proteínas se presentó en su forma monomérica sin presentar diferencias respecto al uso de buffer desnaturalante.

Este resultado sugiere que los dímeros de proteína recombinante estarían unidos por puentes disulfuro ya que son separados en presencia de agentes reductores. La proteína KSI utilizada para la construcción del sistema, a diferencia de la proteína nativa (GeneBank: AAA25872.1), posee un residuo de cisteína cercano a su extremo carboxilo, que podría formar un puente disulfuro intermolecular y formar el dímero detectado. Su presencia en los geles desnaturalantes puede deberse a que el agente reductor presente en el buffer de carga no logre reducir todas estas uniones.

Con esto, se determinó que la pureza de las proteínas recombinantes purificadas por cromatografía de afinidad supera el 90%. La cuantificación de la proteína presente en las distintas fracciones eluidas indica que, efectivamente, la cantidad de proteína recombinante es alrededor del 40% de la proteína celular total y cerca del 20% de la masa celular seca.

3.3 PROTEÓLISIS DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS

3.3.1 DISMINUCIÓN DEL AGENTE DESNATURANTE

Los péptidos fusionados purificados deben ser separados desde la proteína de fusión, para lo cual la construcción incluye un sitio de reconocimiento para proteólisis con Trombina. Dado que el buffer

en el que se encuentran los péptidos fusionados contiene una alta concentración de urea, no es posible separar los péptidos de la proteína KSI directamente, pues la proteasa se desnaturaría en estas condiciones perdiendo su actividad. El proveedor de la enzima indica que ésta es activa en concentraciones de hasta 1M de urea.

Para llevar los péptidos purificados a una concentración menor del agente desnaturante se probaron distintas estrategias.

Se intentó la disminución de la concentración de urea con la proteína inmovilizada en la columna de cromatografía. Para esto, se disminuyó en un escalón la concentración de urea desde 8M a 1M en el buffer de lavado; sin embargo, al lavar la columna con buffer de elución 1M de urea no se recuperó la proteína recombinante. Es posible que la disminución brusca de la concentración de desnaturalante, junto con la alta concentración de proteína en la columna, haya provocado su agregación aún estando unida a la resina. De ocurrir esto, las proteínas quedarían unidas a la columna por más de un extremo de polihistidinas y puede que para eluir las se requiera una concentración mayor de imidazol en el buffer de elución [79]. Una segunda posibilidad es que, en esas condiciones, la proteína se una en forma inespecífica con la matriz mediante interacciones hidrofóbicas y no a través del metal. Si este fuese el caso, para recuperar la proteína se requerirían altas concentraciones de agente desnaturante [79].

La proteína KSI se encuentra como dímero en su estado nativo en concentraciones entre 0,05 mg/mL y 2 mg/mL y a concentraciones menores se disocia a su forma monomérica [80]. Por otra parte, antecedentes bibliográficos indican que esta proteína puede ser renaturada desde soluciones con alta concentración de urea disminuyendo la concentración del agente desnaturante mediante dilución, hasta concentraciones de proteína de alrededor de 0,2 mg/mL [79, 81, 82]. El mecanismo de renaturación por dilución para KSI se ha definido como un mecanismo de dos estados, que comienza con la formación del

monómero parcialmente plegado, seguido por su dimerización, la cual contribuye parcialmente a completar su estructura secundaria mediante eventos intramoleculares, y no presentaría intermediarios termodinámicamente estables [82, 83]. Se ha determinado además que en concentraciones de 0 M a 3 M de urea conserva su estructura dimérica y en presencia de concentraciones mayores a 5 M de urea ésta es casi exclusivamente monomérica [82].

Se intentó entonces la disminución de las condiciones desnaturalantes de la muestra de proteína purificada mediante dilución, analizando la presencia o ausencia de precipitado luego de 20 minutos, tiempo considerado suficiente para alcanzar el equilibrio [82]. Se utilizó como buffer de dilución una solución de Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 8.0. La muestra en solución se diluyó 10 veces para alcanzar una concentración de urea menor a 1 M y concentraciones de proteína alrededor de 0,1 mg/mL. Con este procedimiento se observó la aparición de material particulado en las muestras, indicando que, contrario a lo esperado, las proteínas perdieron solubilidad, agregándose y precipitando.

La disminución de la concentración del agente desnaturalante permite que las distintas regiones de las proteínas comiencen a interactuar posibilitando el proceso de renaturación, sin embargo, esta reacción compite con la formación de interacciones no nativas y con procesos de agregación [76, 84, 85]. Favorecer una u otra reacción depende no sólo de la forma de la remoción del agente desnaturalante, sino también de parámetros como temperatura, pH y fuerza iónica [76]. Por esta razón, de acuerdo con los antecedentes bibliográficos disponibles, variaciones en las condiciones iniciales de las muestras con las proteínas, así como en el buffer de dilución, pueden explicar que en las condiciones estudiadas no se haya obtenido el resultado esperado.

La reproducción exacta de las condiciones experimentales descritas en literatura para la renaturación de la proteína KSI por medio de dilución [79, 81, 82], no es factible de aplicar al proceso de

producción diseñado, ya que deben ser compatibles con el proceso de purificación y con la actividad de la proteasa Trombina. Sin embargo, se puede buscar alguna condición que cumpla con estos requisitos y que permita alcanzar conformaciones solubles que expongan el sitio de reconocimiento de la proteasa.

En el proceso de dilución, al llevar las proteínas en forma brusca desde una solución desnaturalante a un solvente acuoso, la cadena polipeptídica colapsa en una estructura compacta buscando minimizar la exposición de aminoácidos hidrofóbicos al solvente [85], lo que puede dar lugar a estructuras mal plegadas y agregación proteica [85].

La agregación proteica es un proceso que requiere de la interacción de dos o más moléculas, por lo que para evitar la agregación, se debe disminuir las interacciones proteína-proteína durante el proceso de eliminación del agente desnaturalante [86]. Incluir en el solvente concentraciones bajas de sal, puede mejorar la solubilidad de las proteínas al disminuir la interacción electrostática entre ellas [87], por lo que se decidió estudiar si la presencia de sal en el buffer de dilución previene la agregación proteica.

Como resultado, se determinó que la disminución del agente desnaturalante mediante dilución a urea 0,8 M con buffer Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8.0 logra mantener en solución la proteína KSI a una concentración de aproximadamente 1 mg/mL. Sin embargo, los péptidos fusionados a esta misma proteína presentaron precipitación luego de la dilución. Esto sugiere que la presencia de los péptidos en el extremo carboxilo de la cadena polipeptídica de la proteína KSI tiene algún efecto durante el proceso de renaturación de la proteína de fusión.

Por otra parte, se encontró que parte de las proteínas recombinantes se encontraba formando dímeros mediante un enlace disulfuro (ver Figura 17). La proteína KSI utilizada para la construcción del

sistema posee un único residuo de cisteína que no está presente en la proteína nativa. Este residuo se encuentra cercano al extremo amino de la proteína de fusión y podría formar un enlace covalente con su análogo en otra cadena polipéptica.

Dada la presencia de este enlace, aunque la estructura alcanzada por la proteína KSI mediante dilución con buffer Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8.0, es soluble en las condiciones utilizadas, es probable que su conformación no sea la nativa. Esto, ya que antecedentes estructurales indican que el dímero de la proteína KSI se genera mediante la interacción hidrofóbica y electrostática de dos monómeros que se disponen en sentidos opuestos [83]. El enlace disulfuro, no permitiría dicha disposición, ya que los residuos de cisteína participantes están ubicados en forma simétrica en la estructura primaria de cada uno de los monómeros, imponiendo una restricción estructural que impediría la formación de las interacciones intermoleculares de la proteína nativa.

Para las muestras de péptidos fusionados a KSI, la presencia de este enlace intermolecular impone una restricción que podría impedir que se alcancen estados conformacionales solubles, favoreciendo la agregación proteica durante el proceso de dilución. Por esta razón, se estudió el efecto de agentes reductores como β -mercaptoetanol y DTT en el buffer de dilución, pero no se observó diferencia en los resultados respecto al proceso de dilución en ausencia de estos compuestos. Este resultado da cuenta que, en las condiciones estudiadas, las limitaciones estructurales causadas por la presencia de estas uniones covalentes, no son las responsables de que las muestras KSI-p53pAnt y KSI-PNC27 no alcancen conformaciones solubles al disminuir la concentración del agente desnaturante mediante dilución.

Dado que la agregación proteica se ve desfavorecida cuando los procesos de renaturación de proteínas se realizan a concentraciones bajas (10 $\mu\text{g/mL}$ – 100 $\mu\text{g/mL}$) [76], se estudió la dilución de las

muestras con el mismo buffer a concentraciones proteicas de aproximadamente 50 µg/mL, sin embargo, los resultados no fueron distintos.

Los procesos de agregación proteica ocurren entre moléculas que exponen al solvente regiones hidrofóbicas que en su conformación nativa se ubican al interior de la estructura [84]. Una vez agregadas, las proteínas no tienen la flexibilidad para desagregarse y plegarse en su estructura nativa o en alguna otra conformación soluble [85]. El uso de concentraciones intermedias de desnaturalante podría ayudar a mantener la solubilidad y flexibilidad de las proteínas con estructuras no nativas, evitando que estas se agreguen durante el proceso [85], razón por la cual se estudió el efecto de la adición de urea 1 M en el buffer de dilución.

Se determinó que mediante dilución de la muestra con buffer Tris 20 mM, NaCl 150 mM, urea 1M, pH 8.0 a concentraciones de proteína de alrededor de 50 µg/mL, la proteína recombinante se mantiene soluble en todas las muestras y en condiciones compatibles con la actividad de la enzima Trombina.

3.3.2 PROTEÓLISIS ENZIMÁTICA

Se estudió la digestión de las proteínas recombinantes con Trombina en solución. Para esto, se disminuyó la concentración de agente desnaturalante en las muestras mediante dilución con buffer Tris 20 mM, NaCl 150 mM, urea 1 M, pH 8.0, hasta una concentración proteica de aproximadamente 50 µg/mL. Adicionalmente, se realizó una dilución hasta aproximadamente 20 µg/mL de proteína, con el fin de disminuir la interacción entre las moléculas y estudiar su efecto sobre la exposición del sitio de corte de la proteína recombinante. Ambas soluciones fueron incubadas con Trombina a 23°C.

Se logró digestión parcial de la proteína KSI-p53pAnt, no así de KSI-PNC27, que no mostró indicios de proteólisis. No se detectó diferencia en la eficiencia de corte entre las distintas concentraciones de proteína estudiadas.

Como se indicó anteriormente, parte de las proteínas recombinantes KSI, KSI-p53pAnt y KSI-PNC27 se encontrarían unidas por un enlace disulfuro formando dímeros, razón por la cual se analizó la eficiencia de proteólisis en presencia de un agente reductor. Se realizó la disminución del agente desnaturalante de las muestras mediante dilución con buffer Tris 20 mM, NaCl 150 mM, urea 1 M, DTT 1 mM, pH 8.0 hasta una concentración de proteína de aproximadamente 20 µg/mL. Si este enlace tuviese algún efecto negativo sobre la exposición del sitio de corte, su ruptura reflejaría una mejora en la eficiencia del proceso de proteólisis. Sin embargo, se determinó que la presencia del agente reductor no mejoró la eficiencia del proceso de digestión.

Con el fin de mejorar la exposición de los sitios de reconocimiento para la proteasa, se buscó interferir específicamente las interacciones hidrofóbicas, mediante la inducción de condiciones desnaturalantes suaves. Para esto, se incluyó en el buffer de dilución el detergente aniónico sarkosyl, el que es compatible con la actividad de la Trombina a una concentración de 0,5% [88].

Se disminuyó entonces la concentración de agente desnaturalante de las muestras de proteína recombinante purificada, mediante dilución con buffer Tris 20 mM, NaCl 150 mM, urea 1M, pH 8.0, suplementado con sarkosyl. Se llevó las muestras a una concentración final de proteína de 20 µg/mL y 50 µg/mL y se incubaron con Trombina a 23°C. Los productos de la digestión fueron visualizados mediante tinción con nitrato de plata en geles SDS-poliacrilamida y se muestran en la Figura 18. Se incluyó en el análisis un control de digestión, con muestras diluidas con buffer Tris 20 mM, NaCl 150 mM, urea 1 M, pH 8.0 (sin sarkosyl) y controles negativos en los que no se agregó proteasa.

En la Figura 18, en los carriles 2, se puede apreciar la aparición de una banda correspondiente a la proteína KSI, cuyo peso molecular es de 14,73 kDa, que no está presente en el control negativo de digestión correspondiente (carriles 5). Esta banda corresponde a uno de los productos de digestión de KSI-p53pAnt (19,09 kDa). Las condiciones de corte no permiten visualizar el péptido p53pAnt liberado (4,43 kDa) en el gel debido a su baja concentración.

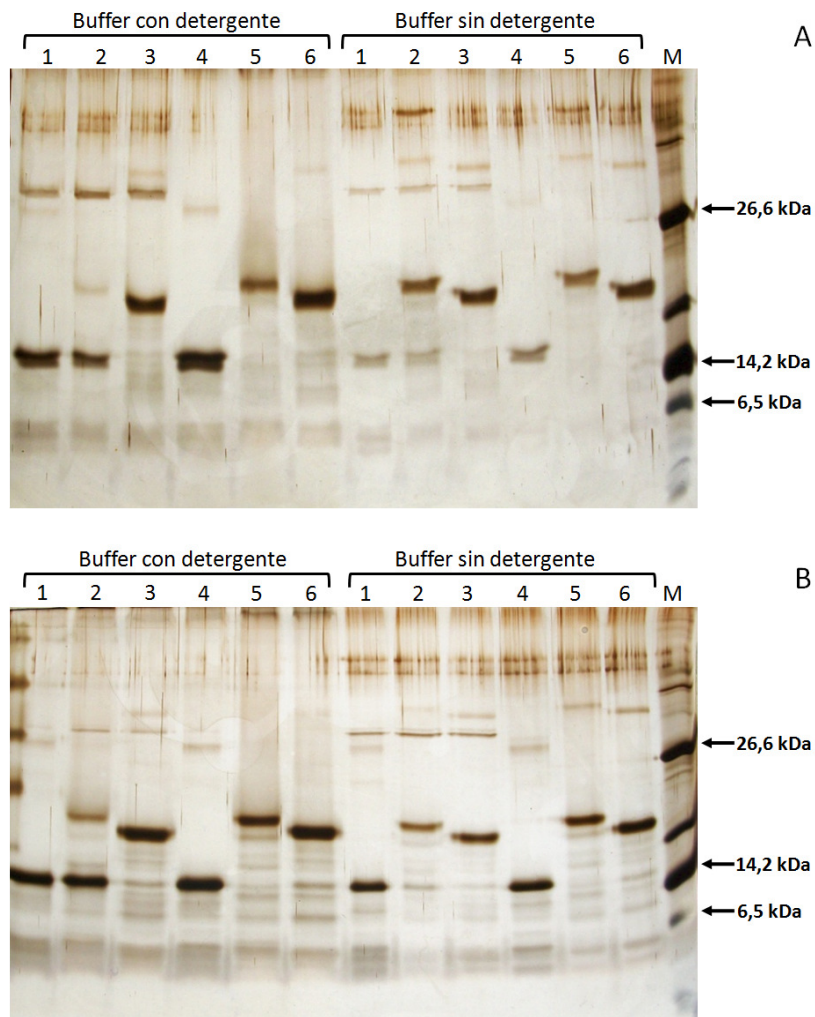


Figura 18: Análisis del efecto de sarkosyl en la proteólisis con Trombina. SDS-PAGE 12,5% T, 3% C; buffer Tris-glicina. A: 20 µg/mL de proteína. B: 50 µg/mL de proteína. M: Marcador de peso molecular (Sigma). 1-3: Muestras incubadas con Trombina: 1: KSI, 2: KSI-p53pAnt, 3: KSI-PNC27; 4-6: Muestras incubadas sin Trombina (control negativo): 4: KSI, 5: KSI-p53pAnt, 6: KSI-PNC27.

Para ambas concentraciones de proteína, se observa que la digestión es parcial en ausencia de sarkosyl, mientras que en presencia del detergente, se logra la proteólisis de gran parte de la proteína en solución, indicando que el proceso de digestión es más eficiente cuando se añade sarkosyl al buffer de dilución.

Se confirma además que la construcción KSI-PNC27 (18,69 kDa) no es digerida por la enzima Trombina (carriles 3).

El péptido PNC27 se inicia con dos aminoácidos de prolina. Aunque no está descrita la restricción de la presencia de prolina sobre los primeros aminoácidos a continuación del sitio de corte para Trombina [72], es probable que otorguen rigidez a la región y no permitan el adecuado acoplamiento de la proteasa en su sitio de reconocimiento. Una estrategia utilizada en el laboratorio para mejorar la eficiencia de separación de PNC27 desde otra proteína de fusión, en una reacción mediada por Inteína, fue la adición de un aminoácido de glicina en el extremo amino del péptido [89]. Esta modificación permitió la interacción entre la enzima y el sitio de corte, lográndose la proteólisis enzimática. En vista de esto, se decidió realizar esta mutación sitio específica en la secuencia de PNC27. Los partidores PNC27G-s (5'CCTAGGGGTCCGCCGCTGAGC3') y CPP-r (5'TTAATTAACCGCGTTGAACTTTCACCCAGAACTGG3') fueron utilizados para la reacción de mutagénesis. El producto de PCR fue purificado y clonado en el vector pGEM®-T Easy. La secuenciación de la construcción resultante confirmó que se logró generar la mutación en el péptido PNC27 y que posee los sitios de restricción *AvrII* y *PacI*, necesarios para la clonación de la secuencia en el vector de expresión pET31HT. Esta última etapa de clonación no se llevó a cabo y se continuó trabajando en la implementación del sistema sólo con el péptido p53pAnt.

El proceso de proteólisis presentado se ve restringido al uso de bajas concentraciones de proteína debido a que la reducción del agente desnaturalante se realiza mediante dilución de las muestras.

Como se mostró anteriormente, dependiendo de la solución de dilución utilizada, este proceso puede producir agregación proteica. Si fuese posible solubilizar estos agregados proteicos directamente en un buffer compatible con la actividad proteolítica, sería posible realizar el proceso de digestión enzimática a concentraciones mayores de proteína. El proceso de transferencia de la proteína agregada a una solución homogénea consiste en romper las interacciones que mantienen el agregado. Se observó que ésta agregación proteica es reversible en presencia de alta concentración de urea, ya que los agentes caotrópicos tienen la capacidad de interrumpir todas las interacciones intra e inter moleculares no covalentes[87].

Información publicada indica que el detergente aniónico sarkosyl solubiliza cuerpos de inclusión a concentraciones de 0,3 -0,4 % [90]. Por consiguiente, se decidió estudiar si sarkosyl, en las condiciones de trabajo, podía solubilizar estos agregados proteicos, y de esta forma, posibilitar la reacción de proteólisis a mayor concentración de proteína.

Para esto, las proteínas en solución desnaturalante fueron precipitadas mediante dilución con buffer Tris 40 mM, pH 8.0 hasta una concentración de 1,6 M de urea. Una vez formado el precipitado, este fue recuperado mediante centrifugación a 5.000 x g por 10 minutos.

Luego, se analizó la solubilización del pellet recuperado en un buffer suplementado con sarkosyl. Se determinó que los agregados proteicos pueden ser solubilizados en buffer Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8.0, 0,3 % sarkosyl, mostrando que al interferir las interacciones hidrofóbicas intermoleculares con este detergente, se logra revertir la agregación proteica, posibilitando que las proteínas se mantengan

en solución. Esto permite que las proteínas se encuentren en condiciones compatibles con la proteólisis con Trombina a una concentración de proteína mayor que la alcanzada mediante la dilución de la muestra.

Las fracciones producto de la precipitación y de la posterior solubilización, fueron analizadas en SDS-PAGE y no se detectó pérdida de proteína en el sobrenadante, indicando que el proceso de precipitación por dilución permite la recuperación de prácticamente toda la proteína recombinante desde la solución desnaturalante.

A continuación se procedió a la proteólisis de la proteína KSI-p53pAnt solubilizada (19,09 kDa), con Trombina en solución. Para esto, se agregó 1 U de Trombina por cada mg de proteína, siguiendo las instrucciones del proveedor, y se incubó a 23°C con agitación durante 68 horas. Como se muestra en la Figura 19, se logró la separación del péptido p53pAnt (4,43 kDa) de la proteína KSI (14,73 kDa) mediante proteólisis enzimática con Trombina.

La adición de sarkosyl al buffer permite mantener las proteínas en solución sin necesidad de trabajar a baja concentración, mediante la inducción de condiciones desnaturalantes suaves compatibles con la actividad de la Trombina. En estas condiciones, las especies presentes exponen el sitio de reconocimiento para la proteasa permitiendo la proteólisis de casi la totalidad de la proteína.

Se realizó una comparación cualitativa de la eficiencia de digestión de la proteína recombinante utilizando tres estrategias diferentes:

- Estrategia 1: Consiste en la digestión enzimática de la proteína KSI-p53pAnt con Trombina encontrándose ambas en solución.

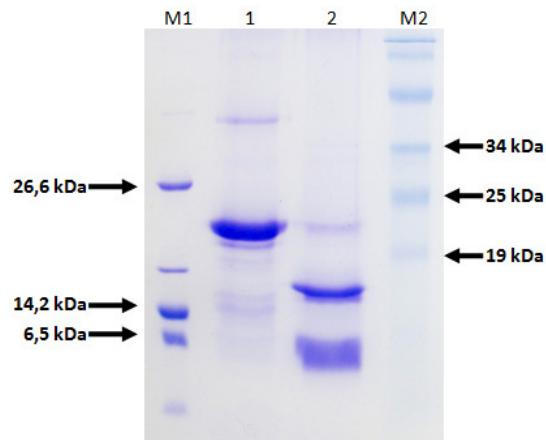


Figura 19: Análisis electroforético del producto de digestión de KSI-p53pAnt con Trombina en solución. SDS-PAGE 10%T, 3%C; buffer Tris-tricina. M1: Marcador de peso molecular (Sigma); 1: KSI-p53pAnt sin digerir; 2: KSI-p53pAnt digerido con Trombina; M2: Marcador de peso molecular (Fermentas).

- Estrategia 2: Consiste en la proteólisis de KSI-p53pAnt, mientras está inmovilizada en una columna de afinidad al extremo de polihistidina, mediante incubación en batch con Trombina en solución. En este caso, como el extremo de polihistidina se encuentra en el extremo amino de la construcción y el péptido a liberar en el extremo carboxilo, se espera que el péptido producto de la proteólisis, sea liberado al sobrenadante y la proteína KSI se mantenga adherida a la resina.

- Estrategia 3: Corresponde a la digestión de KSI-p53pAnt en solución con Trombina inmovilizada en una resina. Este método permite remover luego la proteasa por centrifugación desde la mezcla de digestión.

En todos los casos la reacción fue incubada a 23°C con agitación durante 71 h, utilizando 1 U de enzima por miligramo de proteína.

Los resultados de esta comparación se muestran en la Figura 20. Se puede apreciar que mediante las estrategias 1 y 3 se alcanza una eficiencia de corte similar (carriles E1 y E3, respectivamente). Sin embargo, para la estrategia 2 se observa que la intensidad de la banda correspondiente a la proteína KSI (14,73 kDa) es bastante menor en relación a la de la proteína sin digerir, KSI-p53pAnt (19,09 kDa), indicando que la proteólisis fue poco eficiente (carril E2/R). El carril E2/S, correspondiente al sobrenadante de esta reacción, contiene al péptido liberado, el que se encuentra en baja concentración por lo que no se visualiza mediante la tinción con azul de Coomassie, no obstante si pudo ser visualizado al teñir el mismo gel con nitrato de plata (Figura 20.B).

La baja eficiencia de corte obtenida mediante la estrategia 2 puede deberse a que la proteína, al encontrarse inmovilizada, se encuentra a una concentración mayor en la superficie de la resina que si se encontrase en solución, por lo que existe mayor interacción entre las moléculas, dando lugar a conformaciones diferentes que podrían no exponer el sitio de reconocimiento de la proteasa o bien verse limitado estéricamente.

De lo anterior se concluye que para que el proceso de proteólisis sea eficiente la proteína recombinante debe encontrarse en solución y puede utilizarse tanto Trombina en solución como Trombina inmovilizada.

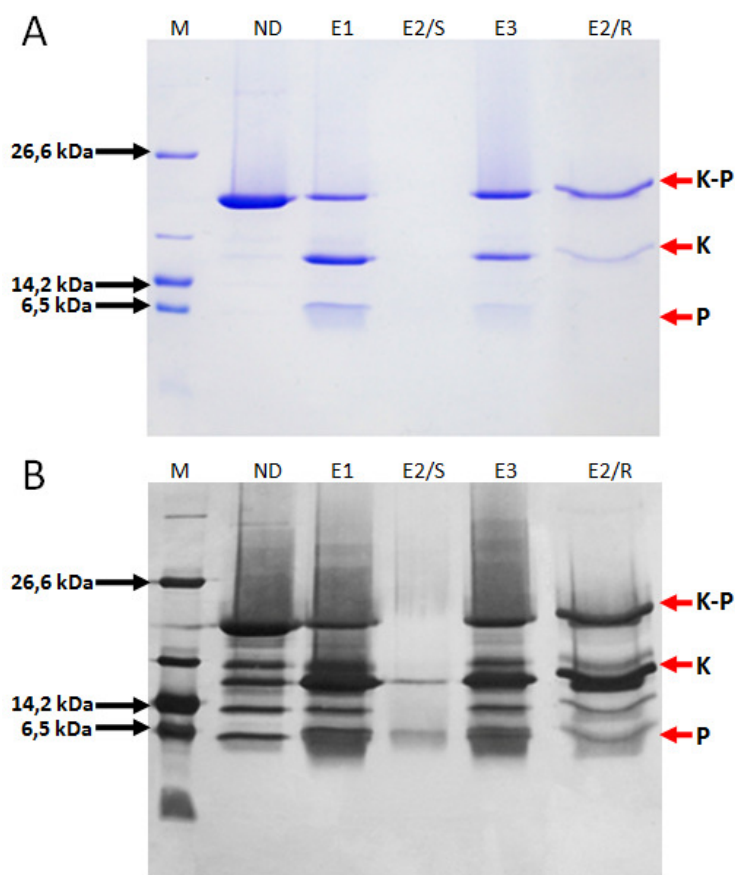


Figura 20: Comparación de los productos de digestión de KSI-p53pAnt obtenidos mediante distintas estrategias de proteólisis. SDS-PAGE 10%T, 3%C; buffer Tris-tricina. A: Tinción con azul de Coomassie; B: Tinción con nitrato de plata. Las distintas especies se indican como K-P: Péptido fusionado KSI-p53pAnt; K: Proteína KSI; P: Péptido p53pAnt. M: Marcador de peso molecular (Sigma); ND: KSI-p53pAnt no digerida; E1: Estrategia 1; E2/S: Estrategia 2/Sobrenadante; E2/R: Estrategia 2/proteína adherida a la Resina; E3: Estrategia 3.

Se estudió la cinética de la reacción de proteólisis con Trombina en solución a 23 °C. Se determinó que mediante el uso de 0,35 U de enzima por mg de proteína en las condiciones definidas, la digestión enzimática de péptido fusionado alcanza aproximadamente el 60% en 8 horas y cerca del 80% de digestión cuando la reacción se extiende a 48 horas (ver Figura 21).

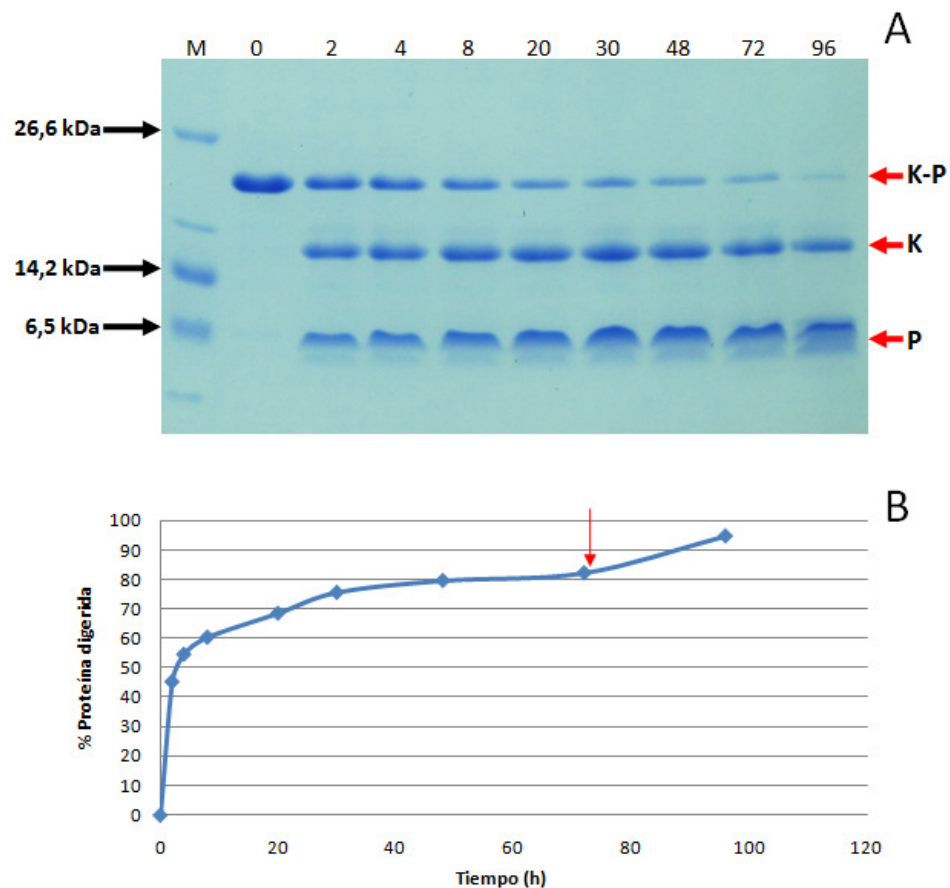


Figura 21: Progreso de la reacción de proteólisis enzimática para 0,35 U de Trombina por mg de proteína. A: SDS-PAGE 10%T, 3%C; buffer Tris-tricina. Las distintas especies se indican como K-P: Péptido fusionado KSI-p53pAnt; K: Proteína KSI; P: Péptido p53pAnt. M: Marcador de peso molecular (Sigma). Sobre cada carril se indica el tiempo de reacción de la muestra en horas. B: Curva de reacción. La flecha indica el momento en que se agregó más Trombina a la reacción.

Quando la velocidad de reacción disminuye y la curva alcanza un plateau, la adición de una cantidad igual de Trombina (indicado con una flecha en la Figura 21.B) aumenta la digestión del péptido fusionado al 95%, indicando que el resto de la proteína recombinante KSI-p53pAnt es potencialmente digerible y que la Trombina pierde su actividad durante el proceso, probablemente por desnaturación o autólisis.

El procedimiento de digestión de KSI-p53pAnt con Trombina en solución es altamente eficiente, logrando la escisión de 2 mg de péptido fusionado por unidad de Trombina en 16 horas, tiempo en el cual más del 65% de la proteína ha sido digerida.

Aún así, es posible que la eficiencia de esta etapa de proteólisis pueda ser mejorada mediante la inclusión de una secuencia de poliglicinas en el extremo amino del sitio de reconocimiento de la proteasa. Esta secuencia ha mostrado mejorar la eficiencia de corte con Trombina [91], al entregar flexibilidad alrededor del sitio de corte y disminuyendo impedimentos estéricos. Por consiguiente, se realizó una nueva reacción de PCR sobre la secuencia codificante para la proteína KSI presente en el vector pET-31b(+), con el propósito de incorporar esta secuencia de poliglicinas en el extremo amino del sitio de reconocimiento para Trombina de la construcción ya diseñada.

Los partidores KSIsense (5'CATATGCACCACCACCACCACCATACCCAGAACACA3') y KSIreverse2 (5'CCTAGGAACTAATCTACCTCCACCGCCACCAAGTGCGTGAATATTCTTCTC3'), fueron utilizados para incluir las modificaciones requeridas. KSIsense, al igual que en la reacción descrita para construcción del vector pET31HT, incorpora seis codones de histidina en el extremo 5', mientras que KSIreverse2, incorpora cinco codones de glicina (en cursiva), junto con la secuencia codificante para el sitio de reconocimiento para Trombina. El producto de amplificación se denominó KSI'2 y se ligó al vector pGEM-T® Easy. La construcción resultante, pGEM-T-KSI'2, fue secuenciada y se confirmó su correcta construcción. Esta secuencia se encuentra flanqueada por los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI*, a partir de los cuales KSI'2 puede sustituir a la secuencia KSI del vector comercial pET-31b(+), y así, construir el nuevo vector de expresión pET31HGT. Este vector es idéntico al diseñado pET31HT, pero con la adición de la secuencia flexible. Este trabajo no fue realizado, y queda pendiente el estudio del efecto de la secuencia de poliglicinas en la eficiencia de corte.

3.3.3 PURIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS

Luego de la separación del péptido desde la proteína de fusión mediante proteólisis enzimática con Trombina, éste debe ser purificado desde el producto de digestión. La estrategia diseñada consiste en la purificación por retención de la proteína KSI y del péptido fusionado no digerido, en una columna Ni-NTA.

El producto de digestión se incubó con la resina durante 1 hora y luego se cargó en una columna de cromatografía, colectando el sobrenadante que contiene el péptido recombinante. Con el fin de recuperar la mayor parte del péptido en solución, la columna se lavó con buffer de corte (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8.0, 0,3 % sarkosyl). Luego, la resina cargada fue lavada con buffer de elución desnaturalante para recuperar la proteína retenida en la columna.

El resultado de este proceso se muestra en la Figura 22. De acuerdo a lo esperado, el péptido p53pAnt fue recuperado en el sobrenadante (carril 2) y la proteína KSI junto con la proteína no digerida KSI-p53pAnt fueron retenidos por la columna (carril 4), ya que ambos tienen un extremo de polihistidina.

El lavado de la columna con el buffer de corte permitió mejorar la recuperación del péptido (carril 3), sin embargo, aproximadamente el 15% de éste permanece unido a la resina y no pudo ser recuperado (carril 4). Se determinó que este péptido no eluye al aumentar la concentración de NaCl ni con alta concentración de urea, si no que eluye sólo a alta concentración de imidazol, por lo que se cree que probablemente se mantiene unido mediante los tres residuos de histidina que posee la secuencia de péptido bioactivo.

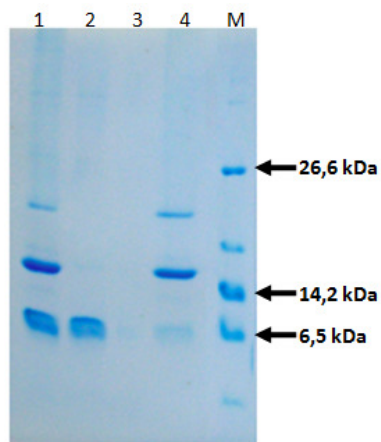


Figura 22: Análisis electroforético del proceso de purificación del péptido. SDS-PAGE 10%T, 3%C; buffer Tris-tricina. 1: Producto de digestión; 2: Sobrenadante; 3: Lavado con buffer de corte; 4: proteína unida a la resina. M: Marcador de peso molecular (Sigma).

Se observó que el proceso de purificación del péptido requiere de una concentración de proteína menor a 1 mg/mL antes de incubar la muestra con la resina Ni-NTA, ya que al trabajar a mayor concentración, disminuye la cantidad de proteína retenida en la columna.

Dado que esta etapa se lleva a cabo en condiciones semi-desnaturantes, no todos los residuos de la proteína están expuestos. Esto podría dar lugar a diferentes conformaciones dependientes de la concentración. A concentraciones mayores el extremo de polihistidinas podría no estar expuesto en todas las especies del equilibrio dinámico, o bien, generar interacciones proteína-proteína o resina-proteína que den lugar a impedimentos estéricos, dificultando la unión de las proteínas a la resina Ni-NTA.

El péptido purificado fue cuantificado por el método de Bradford. Se determinó que la cantidad de péptido recuperado fue de 34 mg por gramo de peso seco celular.

3.4 CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO

Se analizó una muestra de péptido purificado mediante electroforesis en un gel SDS-poliacrilamida y se visualizó mediante tinción con azul de Coomassie (Figura 23.A) y nitrato de plata (Figura 23.B).

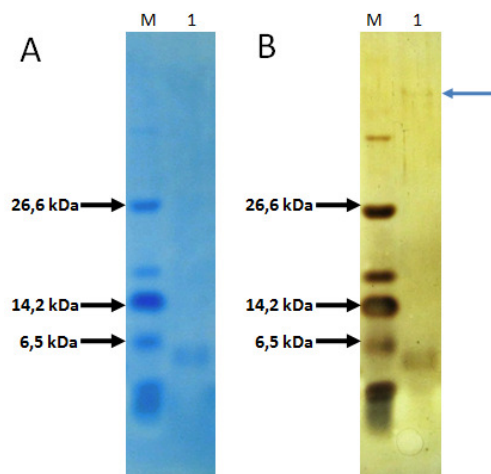


Figura 23: Análisis electroforético del péptido p53pAnt purificado. A y B: SDS-PAGE 10%T, 3%C; buffer Tris-tricina. A: Tinción con azul de Coomassie; B: Tinción con nitrato de plata. M: Marcador de peso molecular (Sigma); 1: péptido p53pAnt.

En la Figura 23.B, la flecha azul da cuenta de una banda de proteína contaminante de alto peso molecular, que no fue detectada mediante la tinción del mismo gel con el colorante azul de Coomassie (Figura 23.A). Esto se debe a que el límite de detección de este último método de tinción es mayor, y corresponde a 0,1 μg de proteína para una única banda [92].

Para determinar la pureza del péptido respecto a esta proteína contaminante, distintas cantidades de proteína fueron cargadas en un gel SDS-poliacrilamida y visualizadas mediante tinción con azul de Coomassie (Figura 24). Cada carril posee el doble de proteína que el carril anterior.

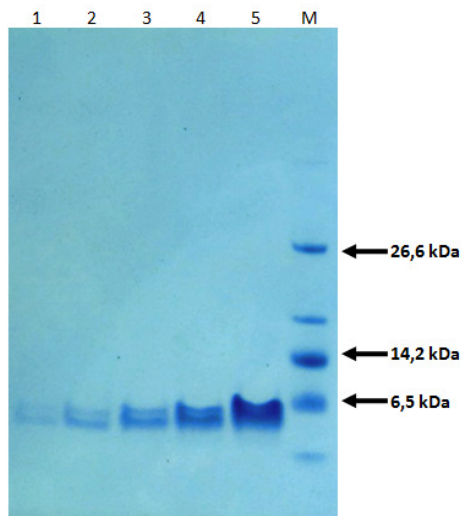


Figura 24: Análisis de pureza para el péptido p53pAnt purificado. SDS-PAGE 10%T, 3%C; buffer Tris-tricina. Cantidades crecientes de péptido p53pAnt. 1: 0,125 µg; 2: 0,25 µg; 3: 0,5 µg; 4: 1 µg; 5: 2 µg M: Marcador de peso molecular (Sigma).

Se observa que aun cargando 2 µg de péptido en un único carril, la banda contaminante no se visualiza mediante este método de tinción.

Si se asume que la proteína contaminante de la Figura 23.B está presente en la muestra cargada en el carril 5 de la Figura 24, pero que se encuentra justo en el límite de detección del método de tinción con azul de Coomassie, entonces habría 0,1 µg de proteína contaminante por cada 2 µg de péptido. Con esto, se puede estimar que la pureza del péptido recombinante p53pAnt es al menos de un 95%.

Con el fin de confirmar que este péptido corresponde efectivamente al péptido p53pAnt, una muestra del producto purificado fue precipitada con acetona fría y posteriormente solubilizada en ácido fórmico 0,1% v/v y metanol 3% v/v, para ser analizada por espectrometría de masas mediante la técnica MALDI-TOF. El espectro obtenido se muestra en la Figura 30 en el ANEXO A.6.

La razón m/z teórica promedio del péptido en su forma protonada es de 4.435,086. Se detecta la señal esperada pero con una intensidad bastante baja. No se detectó ninguna señal atribuible a la proteína contaminante visualizada en la Figura 23; es probable que en las condiciones del análisis, su capacidad de ionización sea muy baja, imposibilitando su detección.

Las principales señales detectadas se identificaron como formas incompletas del péptido, indicando posible degradación, de la cual se observan indicios en la Figura 24. A partir de las secuencias correspondientes a las señales detectadas en este análisis (ver Tabla 10, en ANEXO A.6), se infieren los sitios de corte mostrados en la Figura 25.



Figura 25: Sitios de ruptura del péptido p53pAnt inferidos a partir del análisis de espectrometría de masas. Los sitios de corte están indicados con una flecha. En cursiva, se destaca la secuencia del péptido de penetración celular Penetratin.

La secuencia del péptido fue analizada con el software PeptideCutter disponible en el servidor ExPASy del Swiss Institute of Bioinformatics [78], para predecir posibles sitios de corte de proteasas y químicos. Se determinó que las especies detectadas no coinciden con productos de proteólisis por Trombina ni por otras proteasas comunes.

Se puede ver en la Figura 25 que los sitios de corte corresponden mayoritariamente a proteólisis en residuos de serina. Este aminoácido es un sitio conocido de hidrólisis de enlaces peptídicos en solución [93]. Se debe mencionar que la muestra analizada, luego de ser purificada, se mantuvo durante varias semanas almacenada en su buffer a 4°C antes de ser precipitada con acetona para su análisis, en consecuencia, la hidrólisis mediante este mecanismo es bastante probable.

Considerando que el péptido recombinante se encuentra la mayor parte del tiempo unido a la proteína de fusión, se debe determinar si la hidrólisis ocurre, ya sea en forma simultánea a la liberación del péptido, durante su posterior purificación, o bien, sólo durante su almacenamiento.

Se realiza un análisis de espectrometría de masas por MALDI-TOF de productos de digestión de 8 horas y de 96 horas con Trombina, con el fin de estudiar el estado del péptido durante la etapa de proteólisis enzimática. Previo a la obtención de los espectros, las muestras fueron diluidas en ácido fórmico 0,1% v/v y metanol 3% v/v. Los espectros resultantes completos se adjuntan en la Figura 31 y en la Figura 32, del ANEXO A.6, respectivamente.

La Figura 26 muestra la superposición de los espectros de los productos de digestión y de la muestra p53pAnt purificada. Para los productos de digestión, se observa que la señal más intensa se encuentra a una razón m/z de aproximadamente 4.435, la que se identifica como el péptido p53pAnt (espectros rojo y verde). Entre las señales que acompañan a la señal esperada, destaca una de m/z de 3.376. Esta señal coincide con la razón masa promedio/carga del principal producto de la degradación de p53pAnt, identificado en el análisis previo (ver Figura 30), mostrado en el espectro en color azul. Lo anterior indica que ocurre degradación del péptido durante la etapa de proteólisis, dando cuenta de la inestabilidad del péptido p53pAnt en la solución de trabajo.

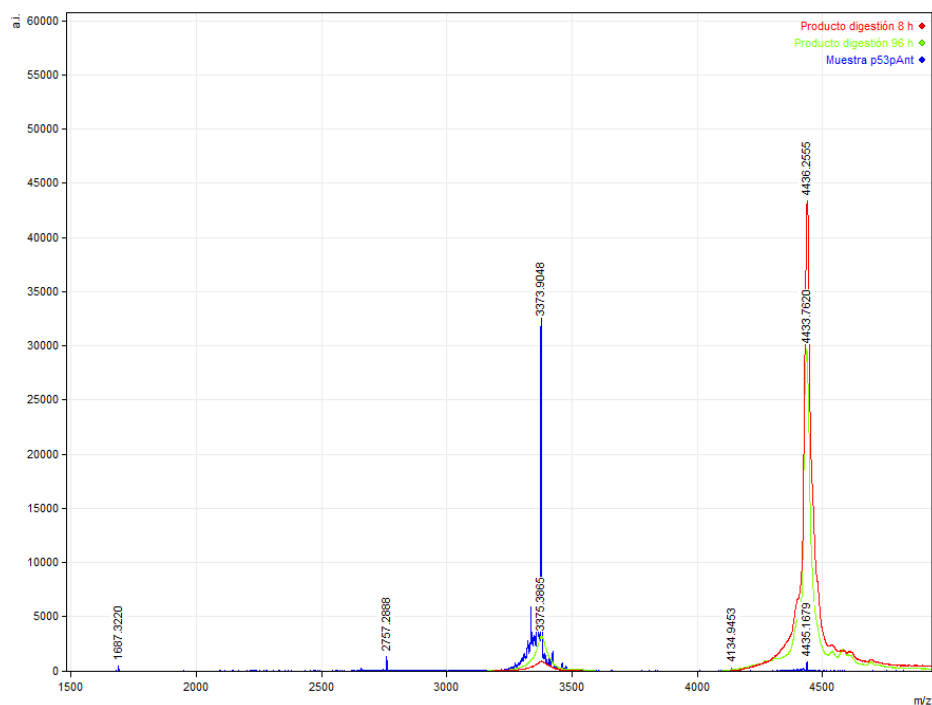


Figura 26: Espectro de señales m/z detectadas por análisis MALDI-TOF. En rojo: Producto de digestión de 8 horas; verde: Producto de digestión de 96 horas; azul: Muestra p53pAnt.

Para los productos de digestión, junto con la señal correspondiente al péptido, se esperaba obtener las señales correspondientes a las proteínas KSI y KSI-p53pAnt presentes en la mezcla del producto de proteólisis. En sus formas protonadas, éstas tienen una razón m/z teórica de 14.677,552 y 19.093,656 respectivamente, sin embargo dichas señales no fueron detectadas (ver Figura 31 y en la Figura 32, del ANEXO A.6). Probablemente esto se debe a que en la preparación para su análisis por espectrometría de masas, estas muestras no fueron precipitadas con acetona y fueron preparadas por dilución de la solución inicial que contiene sarkosyl. Este detergente se adhiere fuertemente a las regiones hidrofóbicas de las proteínas aun en baja concentración [94], lo que, junto con la hidrofobicidad de la proteína KSI, puede haber disminuido la capacidad de ionización de estas proteínas interfiriendo en su detección [95].

Aunque las intensidades observadas en los espectros de un análisis de espectrometría de masas por MALDI-TOF no reflejan necesariamente la abundancia de cada especie, sino más bien su capacidad de ionización, en este caso es posible interpretar, para cada espectro, la intensidad de las señales del péptido p53pAnt completo y de los productos de su hidrólisis, como abundancia relativa, ya que, siendo formas incompletas de la misma secuencia aminoacídica, no debiesen tener capacidad de ionización muy diferente.

En la Figura 26 se observa que en el espectro de la muestra con menor tiempo de digestión (rojo) la relación entre la intensidad de la señal identificada como p53pAnt y la del producto de proteólisis de m/z 3.374, es mayor que en el espectro correspondiente al producto de digestión de 96 horas (verde). Al relacionar la intensidad de la señal con abundancia relativa de las moléculas correspondientes, se infiere entonces que, en esta última muestra, la hidrólisis del péptido es mayor. Por otra parte, se observa que luego de varias semanas en solución, el péptido se encuentra altamente hidrolizado (en azul). De esto se desprende que existe mayor degradación del péptido p53pAnt cuando éste ha estado mayor tiempo en solución.

Por otra parte, la muestra utilizada para la estimación de la pureza del péptido p53pAnt purificado, en el análisis presentado en la Figura 24, estuvo almacenada en solución durante varios días y se observa que el péptido se presenta como una banda doble bien definida, correspondiente probablemente al péptido p53pAnt y a uno de los productos de su hidrólisis. Sin embargo, en la Figura 21, donde se muestra el progreso de la reacción de proteólisis enzimática, a pesar de que el péptido no se observa como una única banda definida, se aprecia más bien un efecto “sombra”, el cual probablemente corresponde a un artefacto de los sistemas de análisis SDS-PAGE con buffer Tris-tricina [96] y no a la visualización de productos de degradación del péptido.

Todo lo anterior, confirma que la alta degradación observada en la muestra de péptido purificado ocurrió principalmente durante su almacenamiento.

Asimismo, se puede suponer que el estado del péptido al término de la etapa de proteólisis enzimática (de 96 horas) es muy similar al que presentaría al término del proceso de producción completo. Esto, ya que la etapa de purificación del péptido desde el producto de digestión tiene una duración de 1,5 horas y, por lo tanto, el tiempo que el péptido está en solución se extiende en forma marginal. El proceso completo, entonces, resulta en la producción del péptido p53pAnt en forma altamente pura y nivel de hidrólisis relativamente bajo.

Una vez purificado el péptido, la precipitación inmediata con acetona fría evitaría su hidrólisis en solución y permitiría su almacenaje a largo plazo. El proceso de precipitación con acetona, permite además eliminar del producto el detergente utilizado [97], junto con cualquier otro tipo de compuesto presente que sea soluble en acetona.

4 DISCUSIÓN GENERAL

El sistema de expresión recombinante de péptidos presentado fue desarrollado como una herramienta alternativa para ser utilizada en la investigación y desarrollo de nuevos fármacos peptídicos, especialmente para aquellos con blanco terapéutico intracelular. Este sistema permite la producción de péptidos con bioactividad intracelular a partir del conocimiento de su secuencia aminoacídica.

Un esquema del proceso general de producción de péptidos, diseñado en este trabajo de tesis, se muestra en la Figura 27.

El sistema requiere la unión de la secuencia del péptido bioactivo a la secuencia del péptido de penetración celular, Penetratin, el que facilita la entrada a la célula y la entrega a su blanco intracelular. Para esto, la secuencia codificante para el péptido conjunto debe ser clonada en el vector diseñado. Por otra parte, para favorecer el proceso de síntesis de proteína en el huésped, se recomienda diseñar las secuencias nucleotídicas utilizando los codones de mayor frecuencia en *Escherichia coli*.

El sistema de producción dirige la expresión del péptido clonado a la producción de cuerpos de inclusión mediante su fusión a la proteína insoluble cetoesteroide isomerasa (KSI). Los cuerpos de inclusión generalmente tienen alta concentración de proteína recombinante y baja cantidad relativa de contaminantes [75]. Con esto, el sistema diseñado permite recuperar el péptido recombinante fusionado con una alta pureza en una etapa temprana del proceso (ver Figura 12).

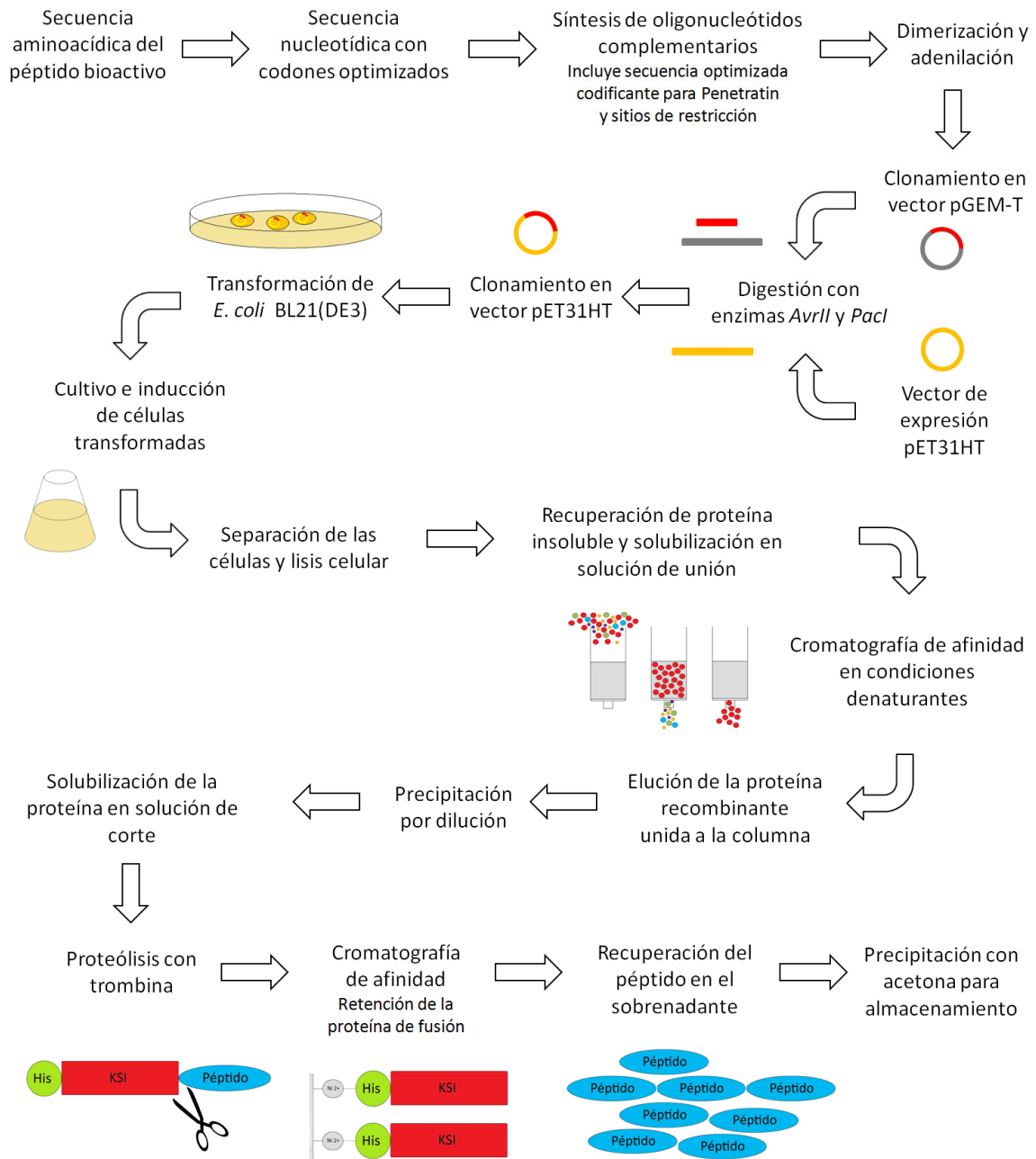


Figura 27: Diagrama del proceso de producción de péptidos generado en este trabajo de tesis.

A diferencia de otros sistemas de producción recombinante de péptidos que utilizan KSI en la proteína de fusión [21], el sistema diseñado permite la separación del péptido de la proteína cetosteroides isomerasa sin necesidad de condiciones ácidas ni el uso de reactivos tóxicos, como bromuro de cianógeno. Esto se logra mediante la incorporación de un sitio de reconocimiento de

Trombina estratégicamente situado, de modo que el péptido se separa de la proteína KSI sin dejar residuos adicionales. Esta proteasa es la alternativa más económica para proteólisis enzimática de proteínas de fusión [17], y no restringe la presencia de ningún aminoácido específico en la secuencia del péptido a producir, aunque impone algunas restricciones sobre el primer y segundo aminoácido de la secuencia bioactiva. Se ha descrito en la literatura [72] que éstos no pueden ser aminoácidos ácidos. Además, los resultados experimentales mostraron que prolina es también un aminoácido restringido en estas posiciones. Con estas excepciones, el sistema diseñado permite la producción de péptidos de casi cualquier secuencia.

La inclusión de residuos de polihistidina en el extremo amino de la proteína KSI permite la purificación del péptido mediante dos etapas de cromatografía de afinidad, utilizando resina Ni-NTA. El proceso de purificación diseñado incluye una primera etapa de cromatografía para la purificación del péptido fusionado a KSI desde la fracción insoluble. La proteína purificada es digerida enzimáticamente permitiendo la separación del péptido de la proteína KSI. A continuación, el producto de digestión es llevado a una segunda etapa de purificación por cromatografía de afinidad con Ni-NTA, donde la proteína KSI que fue separada de péptido y la proteína no digerida son retenidas en la columna, y el péptido se recupera en el sobrenadante.

El hecho de que en la primera cromatografía se recuperan las proteínas que son retenidas en la columna, mientras que en la segunda éstas son descartadas, permite obtener un péptido de alta pureza, ya que de existir impurezas que hayan sido co-purificadas en la primera etapa de cromatografía, es bastante probable que éstas sean retenidas en la segunda columna y eliminadas de la solución con el péptido.

El procedimiento de digestión enzimática diseñado es altamente eficiente. Se utiliza sarkosyl para inducir efectos desnaturantes suaves en las estructuras de las proteínas, lo que permite mantenerlas en solución en condiciones compatibles con la actividad de la Trombina, y con la flexibilidad suficiente para alcanzar estructuras que expongan los sitios de reconocimiento de la enzima. Estas condiciones de reacción permitieron reducir en un 50% la cantidad de Trombina usada para escindir un mg de péptido fusionado, en comparación con la recomendación del proveedor, y una disminución de al menos 20 veces en la cantidad de enzima usada en sistemas de expresión similares [98, 99].

Los resultados indican que es posible utilizar Trombina inmovilizada con una eficiencia similar a la obtenida con la enzima en solución (Figura 20), sin embargo, aunque no se estudió la cinética de esta reacción, es probable que, al igual que la Trombina en solución, la proteasa inmovilizada pierda actividad durante el proceso de proteólisis. La pérdida de actividad no permitiría la reutilización de la proteasa inmovilizada, aumentando el costo de producción², no obstante, es una opción viable en caso que se requiera su uso.

En el sistema diseñado, la producción de proteína recombinante se mantiene en alrededor del 20% de la masa celular seca. Se estimó la productividad potencial de los péptidos considerando la fracción de éstos en la proteína recombinante completa, valor que se calculó mediante el cociente entre el tamaño del péptido y el de la proteína recombinante.

Para el péptido p53pAnt, la relación entre los pesos moleculares del péptido y la proteína KSI-p53pAnt es 0,23. Con esto, la productividad potencial del péptido es de 46 mg por g de peso seco celular. A partir de los valores de eficiencia determinados para cada etapa y resumidos en la Tabla 9, en el

² En Chile, el precio de 1 mL de trombina inmovilizada (Thrombin CleanCleave™, Sigma), que se estima posee 5 U de enzima, es más de un 50% mayor al precio de 50 U de la trombina usada en solución (Thrombin, restriction grade, Novagen).

ANEXO A.5, se puede estimar que la productividad del péptido p53pAnt corresponde a 37 mg por g de peso seco, dado que la etapa de proteólisis posee una eficiencia de un 95% y que en la etapa de purificación se pierde el 15% del péptido por adsorción a la resina. El resultado experimental indica que la productividad final de este péptido es de 34 mg por g de peso seco celular, dando cuenta que el valor estimado de esta forma sería bastante cercano.

Se propone que es posible realizar una estimación preliminar de la productividad final del proceso para cualquier péptido, en forma teórica, a partir del factor correspondiente al tamaño relativo del péptido respecto al de la proteína recombinante KSI-péptido y de los datos de eficiencia determinados para las distintas etapas del proceso.

De esta forma, para un péptido genérico, la producción de 200 mg de proteína recombinante (KSI-péptido) por g de peso seco celular, se traduce en un potencial de productividad de péptido mayor a 40 mg por g de peso seco, y se puede estimar una productividad final de más de 30 mg por g de peso seco celular, equivalente a 60 mg/L en un cultivo de 2 g por litro de células.

Esta productividad es bastante alta comparada con lo reportado en información recopilada de otros sistemas de producción recombinante de péptidos [16-21, 100], siendo la mayor productividad de 50 mg por litro de cultivo [21].

No obstante, se debe tener en cuenta que para mantener dichos niveles de productividad, la relación entre los pesos moleculares del péptido y la proteína recombinante KSI-péptido no debe ser menor a 0,2. Esto implica que la secuencia bioactiva no debiese tener un tamaño menor a 15 aminoácidos. Por otra parte, se debe considerar que la productividad final siempre dependerá de las características particulares de la secuencia a producir, especialmente de los aminoácidos en su extremo

amino, que influyen en la eficiencia de la proteólisis enzimática, y del número de residuos de histidina presentes en la secuencia bioactiva, ya que podrían ser importantes para la eficiencia de purificación del péptido.

Además, dado que el nivel de expresión de proteína recombinante se mantiene relativamente constante para distintas condiciones de inducción, se plantea que es posible que mediante el uso de medios complejos que permitan obtener cultivos de alta densidad, se pueda alcanzar mayores niveles de productividad volumétrica. En el laboratorio, se ha logrado llegar a una densidad celular de 11 g/L utilizando el medio auto-inducible de Studier [101]; con esto, se podría alcanzar una productividad de más de 2 g de proteína recombinante por L de cultivo, lo que permitiría producir más de 300 mg de péptido en un único batch. Asimismo, el uso de cultivos fed-batch permite obtener alrededor de 100 g de células por litro de cultivo [102], con lo que se podría llegar a producir más de 3 g/L de péptido.

La digestión enzimática es la etapa limitante del proceso de producción diseñado. El comportamiento de esta reacción, presentado en la Figura 21, indica que para acelerar el proceso, se podría añadir una segunda dosis de la enzima a las 8 horas de reacción. Por otro lado, si vale la pena sacrificar la productividad general a cambio de un proceso más rápido, la reacción puede ser detenida en ese momento, donde el 60% de la proteína ha sido digerida y en este caso, la productividad final del proceso no sería inferior a 20 mg de péptido por gramo de masa celular seca.

Se detectó que el péptido p53pAnt presenta hidrólisis en solución. La degradación de este péptido ocurre en la región correspondiente a la secuencia bioactiva (ver Figura 25), y probablemente no depende del sistema de producción diseñado, si no que es inherente a la secuencia aminoacídica escogida para la implementación de éste.

Para minimizar el tiempo que el péptido se encuentra en solución, y de esta forma disminuir su degradación, se puede realizar una etapa de digestión más breve, como la descrita anteriormente, y precipitar el péptido con acetona para su almacenamiento, inmediatamente después de su purificación desde el producto de digestión. Posteriormente, el péptido puede ser solubilizado en una pequeña cantidad de ácido acético 10% y diluido con agua desionizada hasta la concentración de trabajo.

El sistema diseñado permite la producción del péptido p53pAnt en una pureza de al menos 95%, lo que hace posible su uso en ensayos biológicos *in vitro* e *in vivo*. Además, la escala de producción alcanzada, es adecuada para su uso en investigación científica, lo que genera buenas expectativas para la aplicación del sistema en experimentos orientados a la investigación y desarrollo de nuevos péptidos terapéuticos.

Aunque el péptido p53pAnt producido por el sistema diseñado se caracterizó por espectrometría de masas y la actividad antitumoral de la secuencia aminoacídica ha sido demostrada por otros investigadores [51-55], idealmente se debe confirmar que el péptido sintetizado mediante este proceso mantiene la actividad biológica esperada. Esto puede realizarse por medio de ensayos en cultivo de alguna de las líneas celulares donde el péptido ha mostrado tener actividad antitumoral selectiva, sin embargo, al no disponer de éstas, estos experimentos no se realizaron, dejando pendiente la confirmación de su actividad biológica.

5 CONCLUSIONES

En el trabajo de tesis presentado se diseñó un sistema de expresión recombinante orientado a la producción de péptidos con potencial terapéutico en *Escherichia coli*. El sistema diseñado considera la fusión de los péptidos a la proteína insoluble KSI, con el fin de dirigir la expresión hacia la formación de cuerpos de inclusión; se incluye además un extremo de polihistidinas, para facilitar su purificación, y un sitio de corte para Trombina, con el propósito de separar luego el péptido desde la proteína de fusión.

Mediante la utilización de distintas técnicas de ingeniería genética fue posible la modificación del vector comercial pET-31b(+) para la construcción del vector diseñado, denominado pET31HT.

La estrategia de clonación diseñada permite que las secuencias nucleotídicas de los péptidos p53pAnt y PNC27 sean insertadas en el vector pET31HT, manteniendo el marco de lectura con la proteína KSI.

La expresión de los péptidos fusionados se obtiene en forma de cuerpos de inclusión, lográndose una productividad del 20% del peso seco celular.

Los péptidos fusionados pueden ser purificados desde la fracción insoluble por cromatografía de afinidad en condiciones desnaturantes, en un proceso que alcanza un alto factor de recuperación y que permite obtener la proteína recombinante con una pureza superior al 90%.

Es posible llevar los péptidos fusionados purificados desde el buffer desnaturante a condiciones compatibles con la proteólisis con Trombina mediante un proceso que permite la recuperación de

prácticamente la totalidad de la proteína recombinante, a través de su precipitación por dilución y su posterior solubilización en un buffer específico de condiciones desnaturalantes suaves.

El proceso de digestión con Trombina, permite separar al péptido p53pAnt desde la proteína de fusión, sin embargo, la proteólisis de la proteína KSI-PNC27 no fue posible, probablemente por la rigidez que producen los primeros aminoácidos del péptido PNC27 en la región reconocida por la enzima.

El proceso de proteólisis de la proteína KSI-p53pAnt en las condiciones definidas en el trabajo de tesis es altamente eficiente, ya que permite alcanzar la digestión de hasta un 95 % de la proteína recombinante, utilizando menos de una unidad enzimática de Trombina por miligramo de proteína.

El péptido p53pAnt puede ser purificado desde el producto de digestión mediante cromatografía de afinidad, siendo recuperado en el sobrenadante con una pureza de al menos un 95 %.

Se observó que el péptido p53pAnt es inestable en la solución de trabajo, presentando hidrólisis en la región correspondiente a su secuencia bioactiva. Aunque probablemente esta dificultad no dependa del sistema de producción diseñado, se proponen estrategias para minimizar esta degradación, las que consisten principalmente en disminuir el tiempo que el péptido libre se encuentra en solución.

El sistema de producción recombinante de péptidos aquí presentado, posee una productividad de más de 30 mg de péptido puro por gramo de peso seco celular y es apropiado para la producción de péptidos para investigación científica que incluya ensayos biológicos *in vitro* o *in vivo*.

6 BIBLIOGRAFÍA

1. Latham PW: **Therapeutic peptides revisited.** *Nature Biotechnology* 1999, **17**:755-757.
2. Müller-Esterl W: *Bioquímica. Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida* Barcelona: Revertè S.A.; 2008.
3. Pichereau C, Allary C: **Therapeutic Peptides under the Spotlight.** *European Biopharmaceutical Review* 2005.
4. Sehgal A: **Peptides 2006: New Applications in Discovery, Manufacturing, and Therapeutics.** Drug and Market Development; 2006.
5. Vlieghe P, Lisowski V, Khrestchatskiy M, Martinez J: **Synthetic therapeutic peptides: science and market.** *Drug discovery today* 2010, **15**:40-56.
6. Morrow KJ: **New Practices Simplify Peptide Synthesis.** *Genetic Engineering and Biotechnology News* 2010, **30**.
7. Reichert J: **Development trends for peptide therapeutics.** Center for the Study of Drug Development and Ferring Research Institute; 2010.
8. Kaspar AA, Reichert JM: **Future directions for peptide therapeutics development.** *Drug Discov Today* 2013, **18**:807-817.
9. Guzman F, Barberis S, Illanes A: **Peptide synthesis: chemical or enzymatic.** In *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 10. Valparaiso: Pontificia Universidad Católica de Valparaíso; 2007.
10. Andersson L, Blomberg L, Flegel M, Lepsa L, Nilsson B, Verlander M: **Large-scale synthesis of peptides.** *Biopolymers* 2000, **55**:227-250.
11. Bray BL: **Large-scale manufacture of peptide therapeutics by chemical synthesis.** *Nat Rev Drug Discov* 2003, **2**:587-593.
12. Andersson L, Blomberg L, Flegel M, Lepsa L, Nilsson B, Verlander M: **Large-scale synthesis of peptides.** *Peptide Science* 2000, **55**:227-250.
13. Lee EJ, Kim HS, Lee EY: **Recombinant Biocatalytic and Cell-free Synthesis of HIV Fusion Inhibitor.** *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 2005, **11**:515-521.
14. Li Y: **Recombinant production of antimicrobial peptides in Escherichia coli: a review.** *Protein Expr Purif* 2011, **80**:260-267.
15. Levy W: **Focusing on Task of Reinventing Peptide Drugs.** *Genetic Engineering & Biotechnology News* 2008, **28**.
16. Lv GS, Huo GC, Fu XY: **Expression of milk-derived antihypertensive peptide in Escherichia coli.** *J Dairy Sci* 2003, **86**:1927-1931.
17. Li Y, Li X, Wang G: **Cloning, expression, isotope labeling, and purification of human antimicrobial peptide LL-37 in Escherichia coli for NMR studies.** *Protein Expr Purif* 2006, **47**:498-505.
18. Rao X, Hu J, Li S, Jin X, Zhang C, Cong Y, Hu X, Tan Y, Huang J, Chen Z, et al: **Design and expression of peptide antibiotic hPAB-beta as tandem multimers in Escherichia coli.** *Peptides* 2005, **26**:721-729.
19. Cipáková I, Gasperík J, Hostinová E: **Expression and purification of human antimicrobial peptide, dermcidin, in Escherichia coli.** *Protein Expr Purif* 2006, **45**:269-274.
20. Sharpe S, Yau WM, Tycko R: **Expression and purification of a recombinant peptide from the Alzheimer's beta-amyloid protein for solid-state NMR.** *Protein Expr Purif* 2005, **42**:200-210.
21. Kuliopulos A, Walsh CT: **Production, Purification, and Cleavage of Tandem Repeats of Recombinant Peptides.** *Journal of the American Chemical Society* 1994, **116**:4599-4607.
22. Lundberg P, Langel U: **A brief introduction to cell-penetrating peptides.** *J Mol Recognit* 2003, **16**:227-233.

23. Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, Prochiantz A: **The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes.** *J Biol Chem* 1994, **269**:10444-10450.
24. Vives E, Brodin P, Lebleu B: **A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus.** *J Biol Chem* 1997, **272**:16010-16017.
25. Pooga M, Hallbrink M, Zorko M, Langel U: **Cell penetration by transportan.** *FASEB J* 1998, **12**:67-77.
26. Oehlke J, Scheller A, Wiesner B, Krause E, Beyermann M, Klauschenz E, Melzig M, Bienert M: **Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically.** *Biochim Biophys Acta* 1998, **1414**:127-139.
27. Joliot A, Prochiantz A: **Transduction peptides: from technology to physiology.** *Nat Cell Biol* 2004, **6**:189-196.
28. Brugidou J, Legrand C, Mery J, Rabie A: **The retro-inverso form of a homeobox-derived short peptide is rapidly internalised by cultured neurones: a new basis for an efficient intracellular delivery system.** *Biochem Biophys Res Commun* 1995, **214**:685-693.
29. Letoha T, Gaal S, Somlai C, Czajlik A, Perczel A, Penke B: **Membrane translocation of penetratin and its derivatives in different cell lines.** *J Mol Recognit* 2003, **16**:272-279.
30. Derossi D, Calvet S, Trembleau A, Brunissen A, Chassaing G, Prochiantz A: **Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent.** *J Biol Chem* 1996, **271**:18188-18193.
31. Noguchi H, Matsumoto S: **Protein transduction technology: a novel therapeutic perspective.** *Acta Med Okayama* 2006, **60**:1-11.
32. Wadia JS, Dowdy SF: **Protein transduction technology.** *Curr Opin Biotechnol* 2002, **13**:52-56.
33. Kashiwagi H, McDunn JE, Goedegebuure PS, Gaffney MC, Chang K, Trinkaus K, Piwnica-Worms D, Hotchkiss RS, Hawkins WG: **TAT-Bim induces extensive apoptosis in cancer cells.** *Ann Surg Oncol* 2007, **14**:1763-1771.
34. Michod D, Yang JY, Chen J, Bonny C, Widmann C: **A RasGAP-derived cell permeable peptide potently enhances genotoxin-induced cytotoxicity in tumor cells.** *Oncogene* 2004, **23**:8971-8978.
35. Jalota-Badhwar A, Kaul-Ghanekar R, Mogare D, Boppana R, Paknikar KM, Chattopadhyay S: **SMAR1-derived P44 peptide retains its tumor suppressor function through modulation of p53.** *J Biol Chem* 2007, **282**:9902-9913.
36. Hosotani R, Miyamoto Y, Fujimoto K, Doi R, Otaka A, Fujii N, Imamura M: **Trojan p16 peptide suppresses pancreatic cancer growth and prolongs survival in mice.** *Clin Cancer Res* 2002, **8**:1271-1276.
37. Minko T, Dharap SS, Fabbriatore AT: **Enhancing the efficacy of chemotherapeutic drugs by the suppression of antiapoptotic cellular defense.** *Cancer Detect Prev* 2003, **27**:193-202.
38. Yang L, Mashima T, Sato S, Mochizuki M, Sakamoto H, Yamori T, Oh-Hara T, Tsuruo T: **Predominant suppression of apoptosome by inhibitor of apoptosis protein in non-small cell lung cancer H460 cells: therapeutic effect of a novel polyarginine-conjugated Smac peptide.** *Cancer Res* 2003, **63**:831-837.
39. Kabouridis PS: **Biological applications of protein transduction technology.** *Trends Biotechnol* 2003, **21**:498-503.
40. Stewart KM, Horton KL, Kelley SO: **Cell-penetrating peptides as delivery vehicles for biology and medicine.** *Org Biomol Chem* 2008, **6**:2242-2255.
41. Madani F, Lindberg S, Langel U, Futaki S, Gräslund A: **Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides.** *J Biophys* 2011, **2011**:414729.

42. Patel LN, Zaro JL, Shen WC: **Cell penetrating peptides: intracellular pathways and pharmaceutical perspectives.** *Pharm Res* 2007, **24**:1977-1992.
43. Letoha T, Gaál S, Somlai C, Venkei Z, Glavinás H, Kusz E, Duda E, Czajlik A, Peták F, Penke B: **Investigation of penetratin peptides. Part 2. In vitro uptake of penetratin and two of its derivatives.** *J Pept Sci* 2005, **11**:805-811.
44. Derossi D, Chassaing G, Prochiantz A: **Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery.** *Trends Cell Biol* 1998, **8**:84-87.
45. Trabulo S, Cardoso AL, Mano M, Pedroso de Lima MC: **Cell Penetrating Peptides - Mechanism of cellular uptake and generation of delivery systems.** *Pharmaceuticals* 2010, **3**:961-993.
46. Duchardt F, Fotin-Mleczek M, Schwarz H, Fischer R, Brock R: **A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides.** *Traffic* 2007, **8**:848-866.
47. Ko LJ, Prives C: **p53: puzzle and paradigm.** *Genes Dev* 1996, **10**:1054-1072.
48. Burns TF, El-Deiry WS: **The p53 pathway and apoptosis.** *J Cell Physiol* 1999, **181**:231-239.
49. Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP: **Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations.** *Science* 1994, **265**:346-355.
50. Bode AM, Dong Z: **Post-translational modification of p53 in tumorigenesis.** *Nat Rev Cancer* 2004, **4**:793-805.
51. Selivanova G, Iotsova V, Okan I, Fritsche M, Strom M, Groner B, Grafstrom RC, Wiman KG: **Restoration of the growth suppression function of mutant p53 by a synthetic peptide derived from the p53 C-terminal domain.** *Nat Med* 1997, **3**:632-638.
52. Kim AL, Raffo AJ, Brandt-Rauf PW, Pincus MR, Monaco R, Abarzua P, Fine RL: **Conformational and molecular basis for induction of apoptosis by a p53 C-terminal peptide in human cancer cells.** *J Biol Chem* 1999, **274**:34924-34931.
53. Li Y, Mao Y, Rosal RV, Dinnen RD, Williams AC, Brandt-Rauf PW, Fine RL: **Selective induction of apoptosis through the FADD/caspase-8 pathway by a p53 c-terminal peptide in human pre-malignant and malignant cells.** *Int J Cancer* 2005, **115**:55-64.
54. Dinnen RD, Drew L, Petrylak DP, Mao Y, Cassai N, Szmulewicz J, Brandt-Rauf P, Fine RL: **Activation of targeted necrosis by a p53 peptide: a novel death pathway that circumvents apoptotic resistance.** *J Biol Chem* 2007, **282**:26675-26686.
55. Senatus PB, Li Y, Mandigo C, Nichols G, Moise G, Mao Y, Brown MD, Anderson RC, Parsa AT, Brandt-Rauf PW, et al: **Restoration of p53 function for selective Fas-mediated apoptosis in human and rat glioma cells in vitro and in vivo by a p53 COOH-terminal peptide.** *Mol Cancer Ther* 2006, **5**:20-28.
56. Dinnen RD, Petrylak DP, Fine RL: **Strategies to Circumvent Resistance to Apoptosis in Prostate Cancer Cells by Targeted Necrosis.** In *Apoptosis in Carcinogenesis and Chemotherapy* 2009.
57. Kanovsky M, Raffo A, Drew L, Rosal R, Do T, Friedman FK, Rubinstein P, Visser J, Robinson R, Brandt-Rauf PW, et al: **Peptides from the amino terminal mdm-2-binding domain of p53, designed from conformational analysis, are selectively cytotoxic to transformed cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:12438-12443.
58. Do TN, Rosal RV, Drew L, Raffo AJ, Michl J, Pincus MR, Friedman FK, Petrylak DP, Cassai N, Szmulewicz J, et al: **Preferential induction of necrosis in human breast cancer cells by a p53 peptide derived from the MDM2 binding site.** *Oncogene* 2003, **22**:1431-1444.
59. Sookraj KA, Adler V, Yazdi ES, Zenilman ME, Michl J, Pincus MR, Bowne WB: **Novel p53-derived peptide induces necrosis by membrane-pore formation in pancreatic cancer cells.** *Journal of the American College of Surgeons* 2008, **207**:S97-S98.
60. Kelley AS, Victor A, Ehsan S-Y, Martin B, Michael EZ, Josef M, Matthew RP, Wilbur BB: **W1961 Novel p53-Derived Peptide Induces Extensive Necrosis in Cancer Cells.** *Gastroenterology* 2008, **134**:A-743.
61. Brandt-Rauf PW, Rosal RV, Fine RL, Pincus MR: **Computational protein chemistry of p53 and p53 peptides.** *Front Biosci* 2004, **9**:2778-2787.

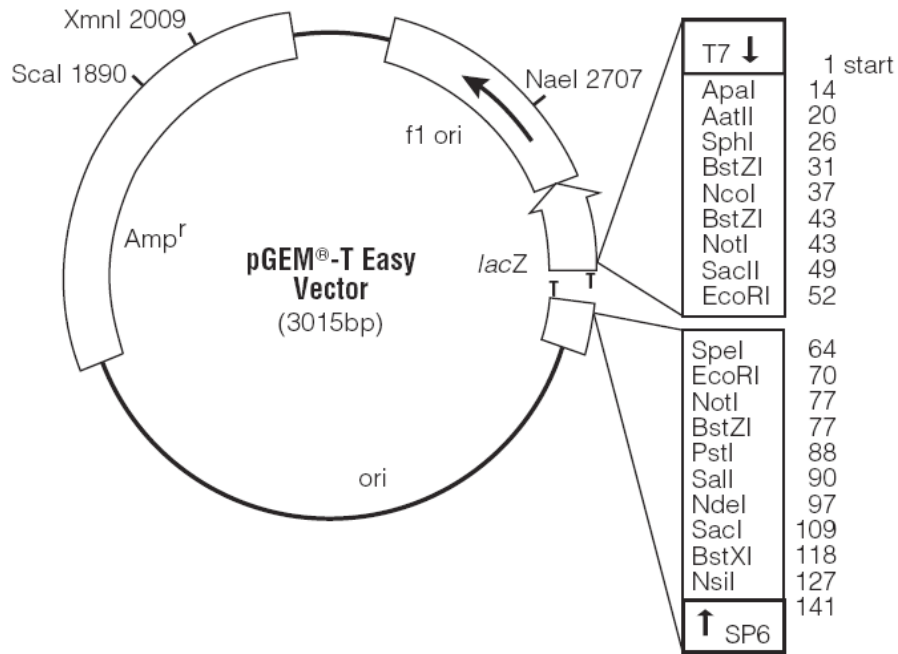
62. Rosal R, Pincus MR, Brandt-Rauf PW, Fine RL, Michl J, Wang H: **NMR solution structure of a peptide from the mdm-2 binding domain of the p53 protein that is selectively cytotoxic to cancer cells.** *Biochemistry* 2004, **43**:1854-1861.
63. Sookraj KA, Bowne WB, Adler V, Sarafraz-Yazdi E, Michl J, Pincus MR: **The anti-cancer peptide, PNC-27, induces tumor cell lysis as the intact peptide.** *Cancer Chemother Pharmacol* 2010, **66**:325-331.
64. Sarafraz-Yazdi E, Bowne WB, Adler V, Sookraj KA, Wu V, Shteyler V, Patel H, Oxbury W, Brandt-Rauf P, Zenilman ME, et al: **Anticancer peptide PNC-27 adopts an HDM-2-binding conformation and kills cancer cells by binding to HDM-2 in their membranes.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**:1918-1923.
65. Yang JY, Zong CS, Xia W, Wei Y, Ali-Seyed M, Li Z, Broglio K, Berry DA, Hung MC: **MDM2 promotes cell motility and invasiveness by regulating E-cadherin degradation.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**:7269-7282.
66. Nagahara H, Vocero-Akbani AM, Snyder EL, Ho A, Latham DG, Lissy NA, Becker-Hapak M, Ezhevsky SA, Dowdy SF: **Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration.** *Nat Med* 1998, **4**:1449-1452.
67. Ezhevsky SA, Nagahara H, Vocero-Akbani AM, Gius DR, Wei MC, Dowdy SF: **Hypo-phosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb) by cyclin D:Cdk4/6 complexes results in active pRb.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**:10699-10704.
68. Vocero-Akbani A, Lissy NA, Dowdy SF: **Transduction of full-length Tat fusion proteins directly into mammalian cells: analysis of T cell receptor activation-induced cell death.** *Methods Enzymol* 2000, **322**:508-521.
69. Cai C, Lin P, Cheung KH, Li N, Levchook C, Pan Z, Ferrante C, Boulianne GL, Foskett JK, Danielpour D, Ma J: **The presenilin-2 loop peptide perturbs intracellular Ca²⁺ homeostasis and accelerates apoptosis.** *J Biol Chem* 2006, **281**:16649-16655.
70. Song YJ, Lee JY, Joo HK, Kim HS, Lee SK, Lee KH, Cho CH, Park JB, Jeon BH: **Tat-APE1/ref-1 protein inhibits TNF-alpha-induced endothelial cell activation.** *Biochem Biophys Res Commun* 2008, **368**:68-73.
71. Li N, Lin P, Cai C, Pan Z, Weisleder N, Ma J: **The amino-terminal peptide of Bax perturbs intracellular Ca²⁺ homeostasis to enhance apoptosis in prostate cancer cells.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2009, **296**:C267-272.
72. Chang JY: **Thrombin specificity. Requirement for apolar amino acids adjacent to the thrombin cleavage site of polypeptide substrate.** *Eur J Biochem* 1985, **151**:217-224.
73. Kibbe WA: **OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator.** *Nucleic Acids Res* 2007, **35**:W43-46.
74. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW: **NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis.** *Nat Methods* 2012, **9**:671-675.
75. De Bernardez-Clark E, Georgiou G: **Inclusion Bodies and Recovery of Proteins from the Aggregated State.** In *Protein Refolding. Volume 470.* Edited by Georgiou G, De Bernardez-Clark E 1991: 1-20.
76. Lilie H, Schwarz E, Rudolph R: **Advances in refolding of proteins produced in E. coli.** *Curr Opin Biotechnol* 1998, **9**:497-501.
77. Singh SM, Panda AK: **Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins.** *J Biosci Bioeng* 2005, **99**:303-310.
78. **ExPASy PeptideCutter tool** [<http://www.expasy.org/tools/peptidecutter/>]
79. Hutchinson MH, Chase HA: **Refolding strategies for ketosteroid isomerase following insoluble expression in Escherichia coli.** *Biotechnol Bioeng* 2006, **94**:1089-1098.
80. Benson AM, Suruda AJ, Talalay P: **Concentration-dependent association of delta5-3-ketosteroid isomerase of Pseudomonas testosteroni.** *J Biol Chem* 1975, **250**:276-280.

81. Hutchinson MH, Morreale G, Middelberg AP, Chase HA: **Production of enzymatically active ketosteroid isomerase following insoluble expression in Escherichia coli.** *Biotechnol Bioeng* 2006, **95**:724-733.
82. Kim DH, Jang DS, Nam GH, Yun S, Cho JH, Choi G, Lee HC, Choi KY: **Equilibrium and kinetic analysis of folding of ketosteroid isomerase from Comamonas testosteroni.** *Biochemistry* 2000, **39**:13084-13092.
83. Kim DH, Jang DS, Nam GH, Choi KY: **Folding mechanism of ketosteroid isomerase from Comamonas testosteroni.** *Biochemistry* 2001, **40**:5011-5017.
84. Vallejo LF, Rinas U: **Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins.** *Microb Cell Fact* 2004, **3**:11.
85. Tsumoto K, Ejima D, Kumagai I, Arakawa T: **Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies.** *Protein Expr Purif* 2003, **28**:1-8.
86. Panda AK: **Bioprocessing of therapeutic proteins from the inclusion bodies of Escherichia coli.** *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2003, **85**:43-93.
87. Hamada H, Arakawa T, Shiraki K: **Effect of Additives on Protein Aggregation.** *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2009, **10**:400-407.
88. Kiefer H, Krieger J, Olszewski JD, Von Heijne G, Prestwich GD, Breer H: **Expression of an olfactory receptor in Escherichia coli: purification, reconstitution, and ligand binding.** *Biochemistry* 1996, **35**:16077-16084.
89. Lascani J: **Producción recombinante de péptidos con potencial terapéutico en Escherichia coli.** Universidad de Chile, Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología; 2014.
90. Burgess R: **Purification of overproduced Escherichia coli RNA polymerase sigma factors by solubilizing inclusion bodies and refolding from sarkosyl.** In *Methods in Enzymology. Volume 273* 1996: 145-149.
91. Hakes DJ, Dixon JE: **New vectors for high level expression of recombinant proteins in bacteria.** *Analytical Biochemistry* 1992, **202**:293-298.
92. Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ: *Protein methods.* Second edn 1996.
93. Testa B, Mayer JM: **Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism: Chemistry, Biochemistry, and Enzymology.** 2003.
94. Burgess RR: **Refolding solubilized inclusion body proteins.** In *Methods in Enzymology. Volume 463* 2009: 259-282.
95. Bensalem N, Masscheleyn S, Mozo J, Vallée B, Brouillard F, Trudel S, Ricquier D, Edelman A, Guerrero IC, Miroux B: **High sensitivity identification of membrane proteins by MALDI TOF-MASS spectrometry using polystyrene beads.** *J Proteome Res* 2007, **6**:1595-1602.
96. Schagger H, von Jagow G: **Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.** *Anal Biochem* 1987, **166**:368-379.
97. Duan X, Young R, Straubinger RM, Page BJ, Cao J, Wang H, Yu H, Canty JMJ, Qu J: **A Straightforward and Highly Efficient Precipitation/On-pellet Digestion Procedure Coupled to a Long Gradient Nano-LC Separation and Orbitrap Mass Spectrometry for Label-free Expression Profiling of the Swine Heart Mitochondrial Proteome.** *Journal of proteome research* 2009, **8**:2838-2850.
98. Li Q, Chen AS, Gayen S, Kang C: **Expression and purification of the p75 neurotrophin receptor transmembrane domain using a ketosteroid isomerase tag.** *Microb Cell Fact* 2012, **11**:45.
99. Britton ZT, Hanle EI, Robinson AS: **An expression and purification system for the biosynthesis of adenosine receptor peptides for biophysical and structural characterization.** *Protein Expr Purif* 2012, **84**:224-235.
100. Yin X, Wei D, Yi L, Tao X, Ma Y: **Expression and purification of exendin-4, a GLP-1 receptor agonist, in Escherichia coli.** *Protein Expr Purif* 2005, **41**:259-265.
101. Studier FW: **Protein production by auto-induction in high density shaking cultures.** *Protein Expr Purif* 2005, **41**:207-234.

102. Lee SY, Chang HN: **Characteristics of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesis by recombinant Escherichia coli.** *Ann N Y Acad Sci* 1996, **782**:133-142.

A ANEXOS

A.1 ESQUEMA DEL VECTOR pGEM-T EASY

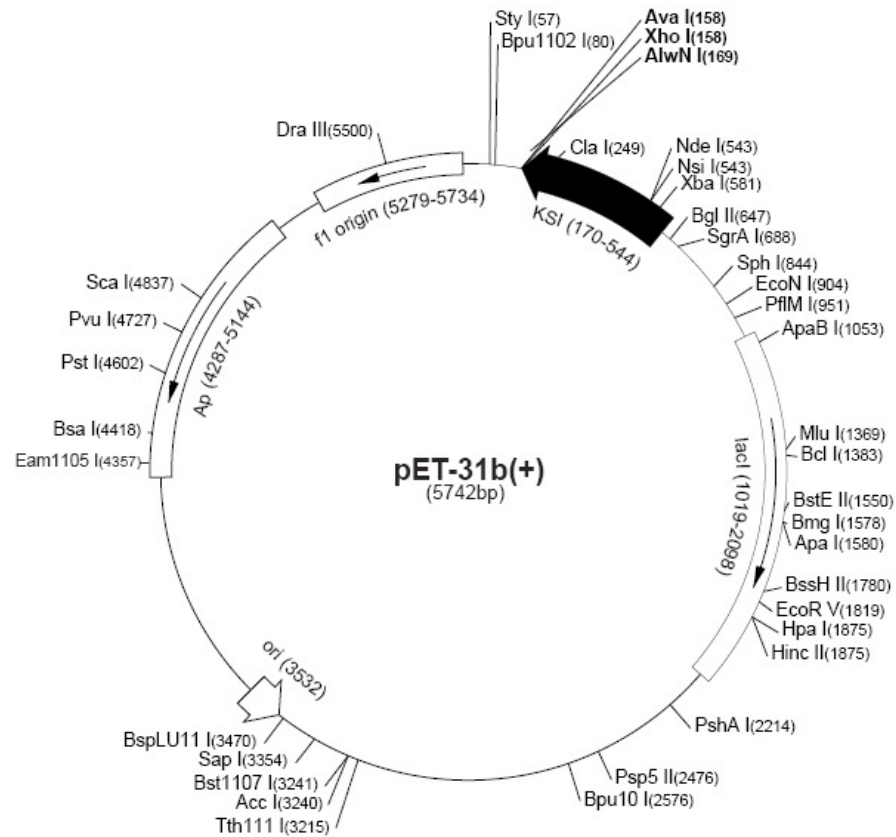


pGEM[®]-T Vector sequence reference points:

T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10-113
SP6 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	124-143
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	126
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	161-177
<i>lacZ</i> start codon	165
<i>lac</i> operator	185-201
β -lactamase coding region	1322-2182
phage f1 region	2365-2820
<i>lac</i> operon sequences	2821-2981, 151-380
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2941-2957
T7 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	2984-3

Figura 28: Mapa del vector pGEM-T Easy

A.2 ESQUEMA DEL VECTOR pET-31b(+)



pET-31b(+) sequence landmarks

T7 promoter	616-632
T7 transcription start	615
KSI coding sequence	170-544
<i>AlwN</i> I site	169
His ⁺ Tag [®] coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	1019-2098
pBR322 origin	3532
<i>bla</i> coding sequence	4287-5144
f1 origin	5276-5731

Figura 29: Mapa del vector pET-31b(+)

A.3 PREPARACIÓN DE GELES SDS-POLIACRILAMIDA

A.3.1 Geles SDS-poliacrilamida 12,5% T, 3% C

Gel de Resolución:

Acrilamida-Bisacrilamida 29:1	1,58 mL
Tris 1,5 M pH 8,8 + 0,4% SDS	0,95 mL
H ₂ O destilada	1,27 mL
TEMED	2 µL
PSA 10%	20 µL

Gel Concentrador:

Acrilamida-Bisacrilamida 29:1	0,1675 mL
Tris 0,5 M pH 6,8 + 0,4% SDS	0,25 mL
H ₂ O destilada	0,575 mL
TEMED	1,25 µL
PSA 10%	7,5 µL

A.3.2 Geles SDS-poliacrilamida 10% T, 3% C

Gel de Resolución:

Acrilamida-Bisacrilamida 29:1	1,24 mL
Tris 3 M pH 8,5 + 0,3% SDS	0,95 mL
Glicerol 40%	1 mL
H ₂ O destilada	0,29 mL
TEMED	1,9 µL
PSA 10%	19 µL

Gel Concentrador:

Acrilamida-Bisacrilamida 29:1	0,13 mL
Tris 3 M pH 8,5 + 0,3% SDS	0,25 mL
H ₂ O destilada	0,62 mL
TEMED	0,75 µL
PSA 10%	7,5 µL

A.4 EJEMPLO DE DATOS

- Ejemplo de datos de cuantificación de proteína obtenida a partir de biomasa equivalente a 77 mg de peso seco celular

Tabla 6: Cuantificación de proteína en las fracciones del extracto crudo

Muestra	Concentración [mg/mL]	Volumen [mL]	Proteína [mg]
Proteína total	3,59	10	35,87
Proteína soluble	1,87	10	18,74
Proteína insoluble	1,94	10	19,41

Tabla 7: Cuantificación de proteína en las fracciones de purificación de KSI-p53pAnt

Muestra	Concentración [mg/mL]	Volumen [mL]	Proteína [mg]
Proteína no unida	0,41	10	4,07
Proteína lavado buffer de unión	0,12	10	1,24
Proteína buffer de elución (EB)	1,13	10	11,30
Proteína lavado 1 buffer de unión	0,36	5	1,80
Proteína lavado 2 buffer de unión	0,19	5	0,96
Total proteína recombinante			14,05

Tabla 8: Cuantificación de proteína en las fracciones de purificación del péptido p53pAnt desde el producto de la digestión de la proteína KSI-p53pAnt en la fracción EB

Muestra	Concentración [mg/mL]	Volumen [mL]	Proteína [mg]
Péptido en sobrenadante	0,126	12	1,51
Péptido lavado buffer de corte	0,106	6	0,64
Total péptido purificado desde EB			2,15

A.5 TABLA RESUMEN DEL PROCESO DE PURIFICACIÓN

Tabla 9: Resumen del proceso de purificación de la proteína recombinante KSI-p53pAnt y del péptido p53pAnt

Etapa de purificación	Proteína recombinante KSI-p53pAnt [mg]	Péptido p53pAnt [mg]	Pureza [%]	Rendimiento [%]
Proteína total	n.d	n.d	43*	100
Cuerpos de inclusión	n.d	n.d	79*	-
1 ^a cromatografía de afinidad	184**	43	n.d.	-
Recuperación por precipitación	184	43	n.d.	-
Proteólisis con Trombina	-	-	-	95*
2 ^{da} cromatografía de afinidad	-	34**	95	85*

Datos por gramo de peso seco celular

Experimentos n.d., no determinados

* Determinado por análisis de densitometría de geles SDS-PAGE

** Determinado por método de Bradford

A.6 RESULTADOS DE ANÁLISIS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

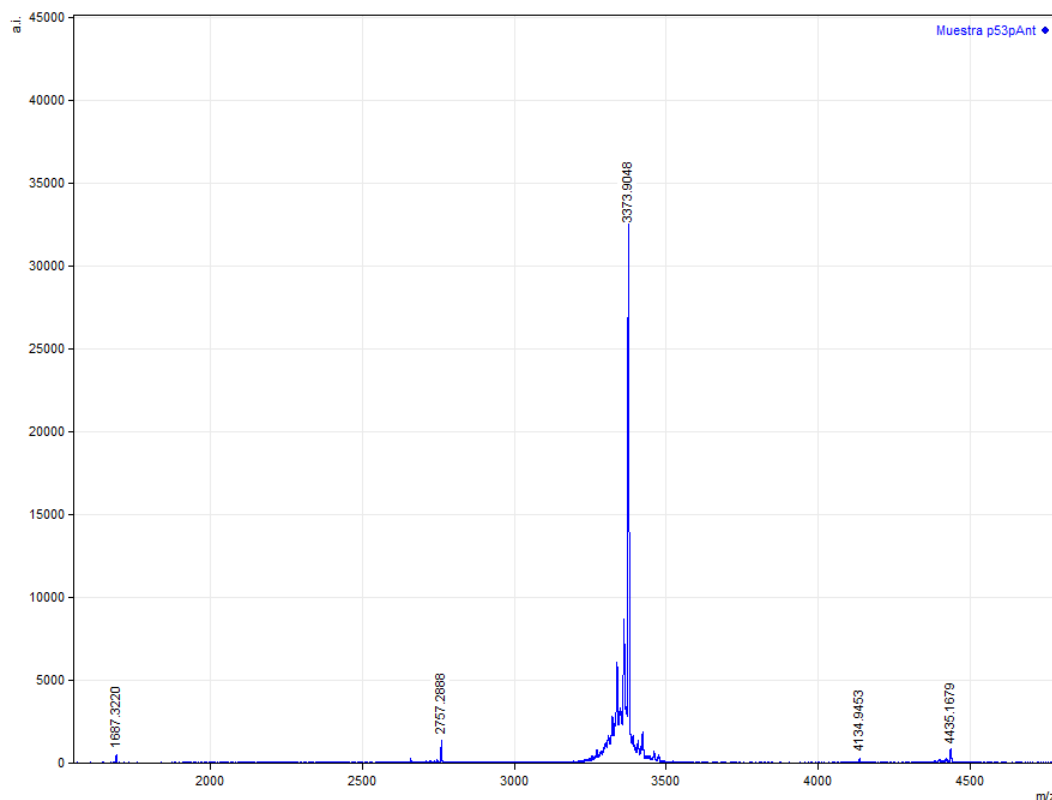


Figura 30: Espectro de señales m/z detectadas por análisis MALDI-TOF para el péptido p53pAnt purificado.

Tabla 10: Identificación de señales correspondientes a formas incompletas de p53pAnt

m/z experimental	Identificación	z	m/z teórico
4.435,168	<i>GSRAHSSLKSKKGQSTSRHKKWKMRRNQFWVKVQRG</i>	1	4.435,086
4.134,945	<i>AHSSLKSKKGQSTSRHKKWKMRRNQFWVKVQRG</i>	1	4.134,771
3.373,905	<i>SKKGQSTSRHKKWKMRRNQFWVKVQRG</i>	1	3.373,929
2.757,289	<i>TSRHKKWKMRRNQFWVKVQRG</i>	1	2.758,247
1.687,322	<i>SKKGQSTSRHKKWKMRRNQFWVKVQRG</i>	2	1.687,469

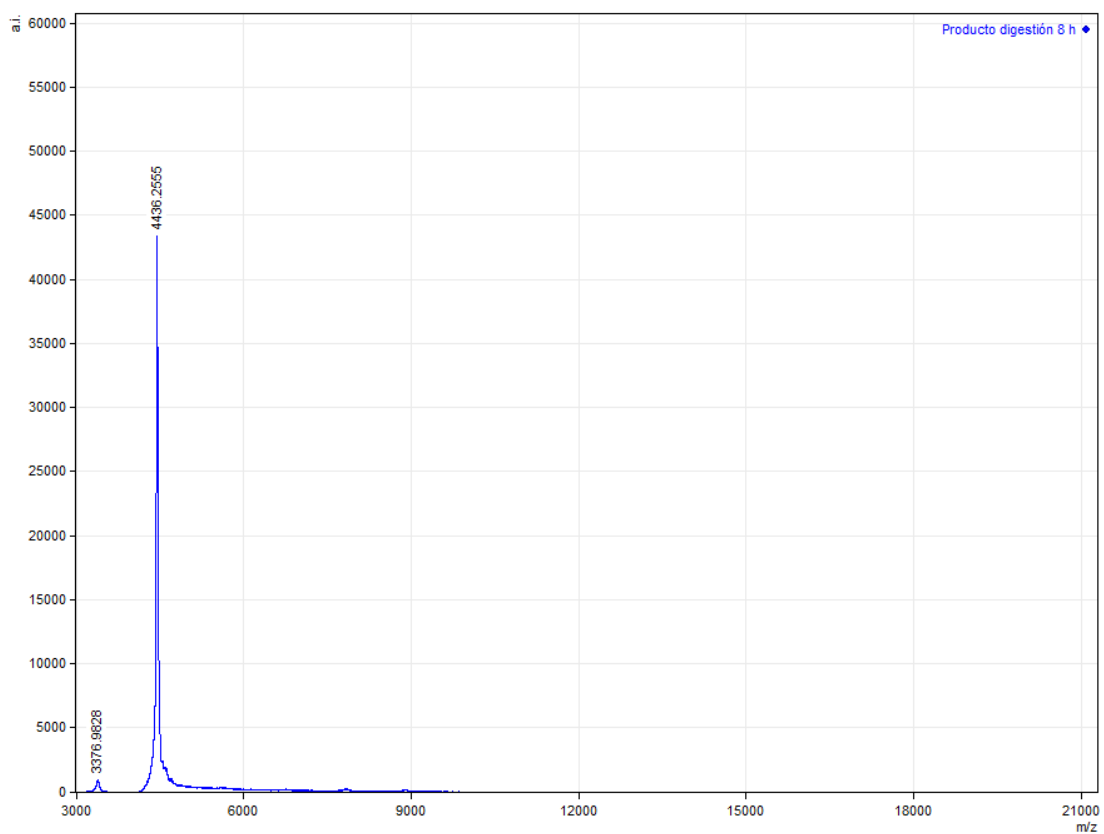


Figura 31: Espectro de señales m/z detectadas por análisis MALDI-TOF para el producto de digestión de 8 horas con Trombina.

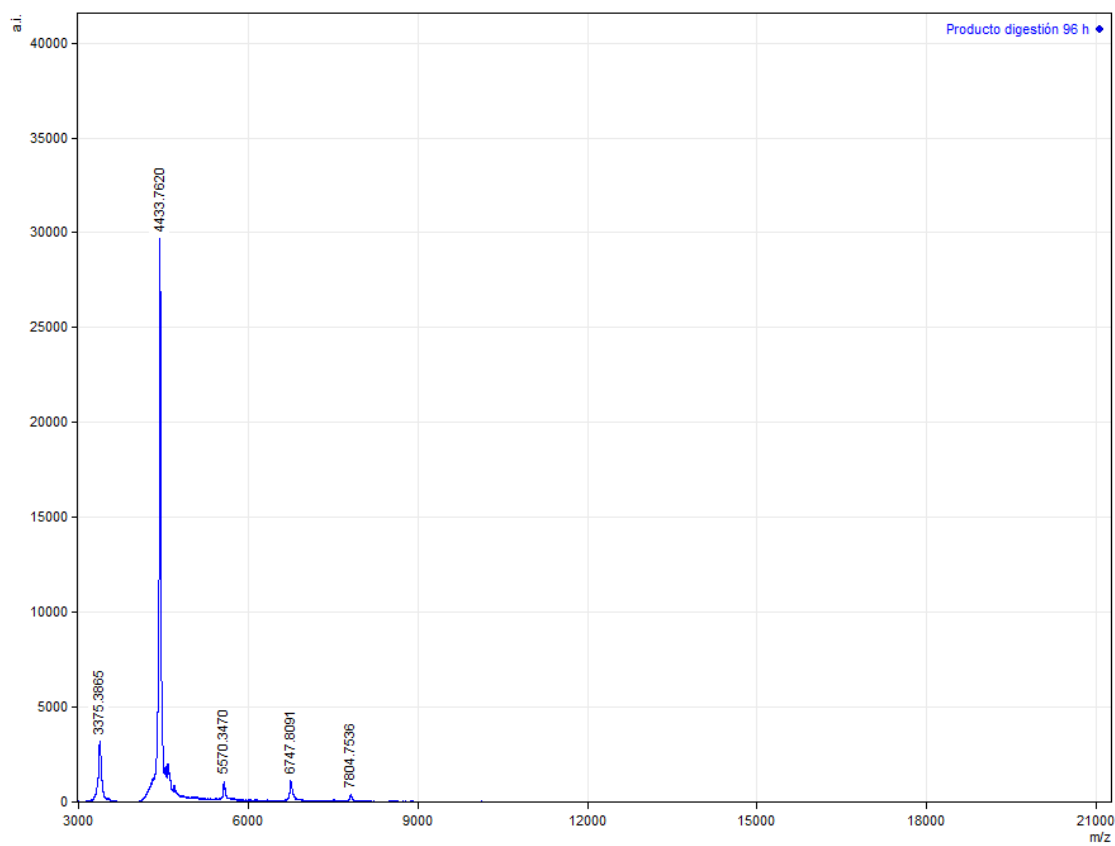


Figura 32: Espectro de señales m/z detectadas por análisis MALDI-TOF para el producto de digestión de 96 horas con Trombina.