



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

PRODUCCIÓN RECOMBINANTE DE PÉPTIDOS CON POTENCIAL TERAPÉUTICO EN  
*ESCHERICHIA COLI*

JORGE ANDRÉS LASCANI MONSALVE

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA MENCIÓN  
QUÍMICA

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGIA

PROFESORA GUÍA:  
BARBARA A. ANDREWS FARROW

PROFESOR CO-GUÍA:  
JUAN ASENJO DE LEUZE

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:  
ORIANA SALAZAR AGUIRRE  
PABLO CAVIEDES FERNÁNDEZ

SANTIAGO DE CHILE

2014

RESUMEN DE LA TESIS PARA OPTAR AL  
TÍTULO DE: Ingeniero Civil en Biotecnología y grado de  
Magíster en Ciencias de la Ingeniería, mención Química  
POR: Jorge Andrés Lascani Monsalve  
FECHA: Octubre 2014  
PROFESORA GUÍA: Barbara A. Andrews

## PRODUCCIÓN RECOMBINANTE DE PÉPTIDOS CON POTENCIAL TERAPÉUTICO EN *ESCHERICHIA COLI*

Durante las últimas décadas, una rama de la investigación biotecnológica se ha enfocado en desarrollar y optimizar procesos de producción de proteínas recombinantes orientadas a aplicaciones terapéuticas. En particular, los péptidos terapéuticos ofrecen actualmente un nuevo potencial comercial para la industria farmacéutica y biotecnológica al generar estrategias efectivas en el tratamiento de diversas patologías como cáncer y alteraciones metabólicas entre otras.

Estudios previos han demostrado la capacidad supresora de tumores de péptidos con blanco intracelular como p53p-Ant y PNC-27. Estos corresponden a regiones derivadas de la proteína p53, factor de regulación transcripcional que inhibe la progresión del ciclo celular e induce reparación celular o apoptosis, en caso de estrés genotóxico. Ambos péptidos contienen en su secuencia, un péptido de penetración celular, el cual les entrega la capacidad de atravesar la membrana plasmática. Así, bajo distintos mecanismos, con p53p-Ant y PNC-27 se ha reportado apoptosis o bien necrosis de manera selectiva en ciertos tipos de células tumorales.

El presente trabajo tuvo por objetivo expresar en *E. coli* los péptidos p53p-Ant y PNC-27, y purificarlos mediante el sistema IMPACT. Éste es un mecanismo de expresión y purificación mediado por inteínas que permite purificar a través de una columna de afinidad, proteínas recombinantes con su secuencia nativa sin el uso de proteasas y minimizando pasos cromatográficos.

Se logró producir ambos péptidos en forma soluble. La expresión soluble del péptido PNC-27 se consiguió a partir de los dos vectores de expresión proporcionados por el sistema IMPACT (pTXB1 y pTYB11), esta expresión resultó ser fuertemente dependiente de las condiciones de cultivo ya que se requiere de una inducción a baja temperatura (12 °C). Por su parte, la expresión soluble de p53p-Ant depende tanto del sistema de expresión como de las condiciones de cultivo.

El diseño de las construcciones genéticas, en particular las que incluyen el vector de expresión pTYB11, permitió una efectiva purificación de los péptidos utilizando un único paso cromatográfico. Más aún, los niveles de rendimiento (0,4 – 1,2 mg L<sup>-1</sup>) superan los reportados para péptidos con el mismo sistema y los niveles de pureza obtenidos permitirían desarrollar investigación avanzada con ensayos biológicos *in vivo* o *in vitro*.

*“Dentro de la jaula hay comida.  
No mucha, pero un poco. Fuera  
solo hay vastas extensiones de  
libertad”*

*Nicanor Parra*

## Agradecimientos

Quiero comenzar dándoles infinitas gracias a mis padres, por su incondicional apoyo en el desarrollo de mi carrera académica y en la vida.

Mis agradecimientos al Dr. Juan Asenjo por haber confiado en mí y en mi compromiso, y a la Dra. Barbara Andrews por su apoyo en la realización de mi trabajo de investigación. Agradezco también a la Dra. Oriana Salazar por su infinita disposición a resolver dudas y brindar un análisis constructivo.

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

A mis compañeros Daniela S., Ana María, Natalia, Camila, Alicia, Werner y Sergio por hacer del laboratorio un lugar agradable para trabajar y compartir. En particular a Vida Rodríguez, quien me ayudó y orientó siempre por el mejor camino. A Nancy por tener siempre la mejor voluntad para ayudar en el trabajo de laboratorio.

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

## Tabla de Contenido

1.	Introducción y antecedentes generales .....	1
1.1.	Péptidos terapéuticos y el mercado.....	1
1.2.	Cáncer.....	2
1.3.	Proteína p53 .....	3
1.4.	Péptidos derivados de p53: p53p-Ant y PNC-27 .....	5
1.5.	Producción y purificación de péptidos .....	8
1.6.	Sistema IMPACT.....	9
2.	Objetivos .....	12
2.1.	Objetivo General.....	12
2.2.	Objetivos Específicos.....	12
3.	Materiales y métodos .....	13
3.1.	Materiales.....	13
3.1.1.	Cepas bacterianas electrocompetentes.....	13
3.1.2.	Vectores de clonamiento y expresión.....	13
3.1.3.	Enzimas de restricción .....	14
3.1.4.	Oligonucleótidos .....	14
3.1.5.	Medios de cultivo líquidos y sólidos.....	15
3.1.6.	Soluciones y <i>Buffers</i> .....	15
3.1.7.	Herramientas Computacionales.....	16
3.2.	Métodos .....	17
3.2.1.	Diseño de oligonucleótidos .....	17
3.2.2.	Clonamiento de secuencias en pGEM-T Easy.....	18
3.2.2.1.	Secuencias originales .....	18
3.2.2.2.	Mutagénesis sitio dirigida.....	18
3.2.2.3.	Purificación de fragmentos desde gel de agarosa .....	19
3.2.2.4.	Adición de sitios de restricción.....	19
3.2.2.5.	Ligación a pGEM-T Easy y transformación de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	20

3.2.3.	Clonamiento de secuencias en vectores de expresión .....	21
3.2.3.1.	Digestión de ADN plasmidial.....	21
3.2.3.2.	Ligación a vectores de expresión y transformación de <i>E. coli</i> BL21(DE3) .....	21
3.2.4.	Inducción de la expresión de proteínas recombinantes .....	22
3.2.5.	Purificación de proteínas recombinantes.....	23
3.2.5.1.	Recuperación de proteínas recombinantes .....	23
3.2.5.2.	Ambientación de la columna de quitina .....	24
3.2.5.3.	Carga de la fracción de proteína soluble .....	24
3.2.5.4.	Lavado de la columna.....	24
3.2.5.5.	Inducción de actividad de auto-proteólisis.....	24
3.2.5.6.	Elución de péptidos de interés.....	24
3.2.5.7.	Diálisis.....	25
3.2.6.	Detección de proteínas recombinantes.....	25
3.2.6.1.	Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) .....	25
3.2.6.2.	Tinción de geles con nitrato de plata .....	26
3.2.7.	Determinación de la concentración de proteína .....	27
3.2.8.	Espectrometría de masas .....	27
4.	Resultados y discusión.....	28
4.1.	Clonamiento de secuencias en pGEM-T Easy.....	28
4.1.1.	Adición de sitios de restricción.....	28
4.1.2.	Transformación de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	29
4.1.3.	Secuenciación y análisis de constructos en pGEM-T Easy .....	31
4.2.	Clonamiento de secuencias en vectores de expresión.....	31
4.2.1.	Digestión de vectores pGEM-T Easy recombinantes .....	31
4.2.2.	Ligación y transformación de <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	33
4.2.3.	Secuenciación y análisis de vectores de expresión recombinantes .....	35
4.3.	Expresión de proteínas recombinantes.....	36
4.4.	Expresión y purificación de proteínas recombinantes .....	36
4.4.1.	Expresión de <i>p53pTX</i> .....	37
4.4.2.	Expresión y purificación de <i>PNCpTX</i> , <i>PNCpTY</i> y <i>p53pTY</i> .....	39

4.4.3.	Determinación de la producción de proteínas recombinantes.....	40
4.4.4.	Inducción de auto-proteólisis y recuperación de péptidos recombinantes .....	41
5.	Conclusiones.....	46
6.	Bibliografía .....	47
7.	Anexos.....	51

## Índice de Figuras

Figura 1.	Mercado global de péptidos terapéuticos.....	1
Figura 2.	Péptidos terapéuticos que ingresaron a ensayos clínicos en las últimas 7 décadas .....	2
Figura 3.	Activación de p53 y respuesta celular.....	4
Figura 4.	Dominios funcionales de p53.....	4
Figura 5.	Modelo del mecanismo de acción de p53p-Ant .....	6
Figura 6.	Modelo del mecanismo de acción del péptido PNC-27 en la formación de poros membranales.....	7
Figura 7.	Representación esquemática del funcionamiento de IMPACT .....	11
Figura 8.	Análisis electroforético de la digestión de ADN plasmidial. ....	28
Figura 9.	Análisis electroforético de producto de PCR.....	29
Figura 10.	Análisis electroforético del producto de PCR de colonias transformadas.....	30
Figura 11.	Análisis electroforético de la digestión de ADN plasmidial .....	32
Figura 12.	Análisis electroforético del producto de PCR de colonias transformadas.....	34
Figura 13.	Esquema de la determinación de la secuencia de cada variante. ....	35
Figura 14.	Análisis electroforético de la expresión y purificación de los sistemas control.....	37
Figura 15.	Inducción de la expresión de la proteína derivada de la construcción pTXB1/ <i>p53pTX</i> .....	38
Figura 16.	Expresión del péptido p53p-Ant unido a su proteína de fusión derivada de <i>p53pTX</i> .....	38
Figura 17.	Análisis electroforético de la expresión y purificación de proteínas recombinantes derivadas de las construcciones pTXB1/ <i>PNCpTX</i> , pTYB11/ <i>PNCpTY</i> y pTYB11/ <i>p53pTY</i> .....	39
Figura 18.	Análisis electroforético de la purificación de los péptidos p53p-Ant y PNC-27.....	42
Figura 19.	Espectro de ionización por detección lineal de la muestra <i>PNCpTY</i> .....	45
Figura 20.	Espectro de ionización por detección lineal de la muestra <i>p53pTY</i> .....	45
Figura 21.	Vector pGEM-T Easy.....	51
Figura 22.	Vector pTXB1 .....	52
Figura 23.	Vector pTYB11.....	53
Figura 24.	Potenciales <i>hairpins</i> y alineamientos en sí mismo del partidor pTXp53pS.....	57
Figura 25.	Potenciales <i>hairpins</i> y alineamientos en sí mismo del partidor pTXPNCS .....	58
Figura 26.	Potenciales <i>hairpins</i> y alineamientos en sí mismo del partidor pTXReverse.....	59
Figura 27.	Potenciales <i>hairpins</i> y alineamientos en sí mismo del partidor pTYp53S.....	60

Figura 28. Potenciales <i>hairpins</i> y alineamientos en sí mismo del partidor pTYPNCS .....	62
Figura 29. Potenciales <i>hairpins</i> y alineamientos en sí mismo del partidor pTYReverseI .....	63
Figura 30. Potenciales <i>hairpins</i> y alineamientos en sí mismo del partidor pTYReverseII.....	65
Figura 31. Curva de calibración de Bradford usando BSA como estándar.....	75

## Índice de Tablas

Tabla 1. Sitios de restricción de endonucleasas utilizadas .....	14
Tabla 2. $T_m$ y secuencias de los nueve partidores diseñados.....	15
Tabla 3. Herramientas bioinformáticas recurridas .....	16
Tabla 4. Secuencia aminoacídica de péptidos.....	18
Tabla 5. Enzimas de restricción requeridas para la doble digestión .....	21
Tabla 6. Mezclas de ligación para las distintas construcciones.....	22
Tabla 7. Composición de geles de resolución y concentrador para electroforesis en tampón Tris-Tricina .....	26
Tabla 8. Nivel de producción y pureza de los péptidos en el proceso de producción.....	40
Tabla 9. Determinación de los factores EC y EE para cada producto.....	41
Tabla 10. Denominación de partidores diseñados.....	56
Tabla 11. Reactivos utilizados en el desarrollo experimental .....	67
Tabla 12. Equipos utilizados en laboratorio .....	68
Tabla 13. Cuantificación de proteínas obtenidas de los distintos sistemas de expresión y porcentaje de proteína recombinante presente en la fracción soluble.....	75



## Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
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 - $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
kDa	kiloDalton
LB	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'-tetrametiletilendiamina
T <sub>m</sub>	Temperatura de <i>Melting</i>
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
V	Voltio
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

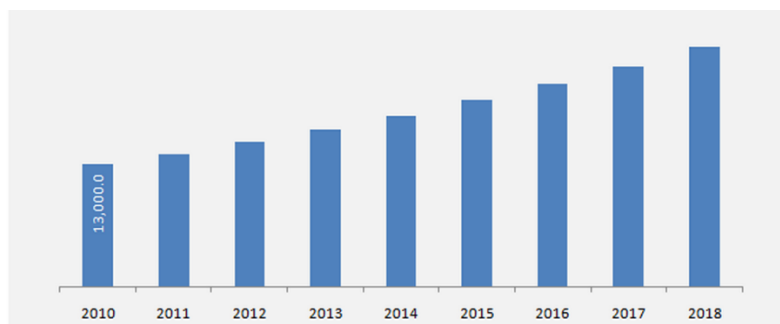
# 1. Introducción y antecedentes generales

## 1.1. Péptidos terapéuticos y el mercado

Un péptido es una cadena de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos como en las proteínas, pero con un número de aminoácidos menor a 50 aminoácidos.

El uso de péptidos como potenciales agentes terapéuticos tiene como ventaja su alta especificidad [1]. Esto implica que en general presentan baja toxicidad y escasos efectos secundarios, y debido a que poseen una vida media relativamente corta no se acumulan en el organismo. Adicionalmente, los péptidos se administran en dosis pequeñas, reduciendo así las cantidades de producto a sintetizar a escala industrial [2].

Los péptidos terapéuticos ofrecen actualmente un nuevo potencial comercial para la industria farmacéutica y biotecnológica. Para explotar este nuevo mercado, las grandes empresas farmacéuticas y biotecnológicas están invirtiendo activamente en el desarrollo de nuevos péptidos para diversas aplicaciones y también están optando por tecnologías como la producción recombinante para la síntesis de estos péptidos [3]. De acuerdo al último informe de mercado publicado por *Transparency Market Research*, el mercado global de péptidos terapéuticos estaba avaluado en 14,1 mil millones de dólares en 2011 y se estima que alcanzará un valor de mercado de USD 25,4 mil millones en 2018 [4], (ver Figura 1).



**Figura 1.** Mercado global de péptidos terapéuticos, por ingresos desde 2010 hasta 2018 (USD Millones). *Fuente: American Peptides Association, Peptides Magazine, Primary Interviews* [4]

Los péptidos presentan un amplio espectro de potenciales beneficios clínicos. Actualmente, en el mercado global existen alrededor de 50 péptidos terapéuticos, incluso existe un creciente ingreso de nuevos péptidos a ensayos clínicos (Figura 2) como lo resalta el estudio de tendencias de desarrollo de péptidos terapéuticos en 2010 [5].

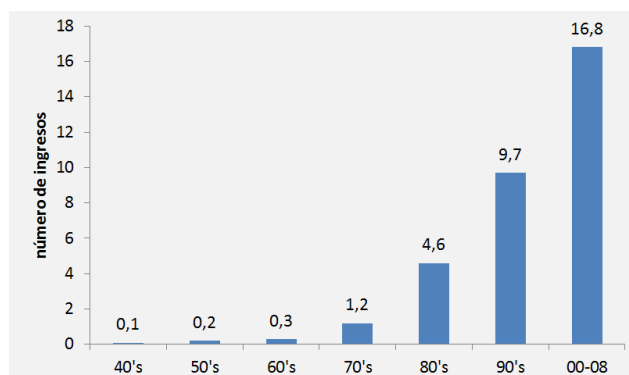


Figura 2. Péptidos terapéuticos que ingresaron a ensayos clínicos en las últimas 7 décadas [5]

No obstante, de los péptidos que ingresan a ensayos clínicos, menos del 10% se une a un blanco intracelular [5]. La principal ventaja de un blanco terapéutico intracelular es la modulación de interacciones proteína-proteína que sean responsables de alguna enfermedad. De este modo el interés por el desarrollo de péptidos que puedan ingresar a la célula es también creciente. Los Péptidos de Penetración Celular o CPPs (*Cell-Penetrating Peptides*) son péptidos que tienen la capacidad de llegar a compartimientos citoplasmáticos y/o nucleares en células vivas después de su internalización a través de la membrana plasmática. Se caracterizan por tener un alto contenido de residuos de Lisina y Arginina, carga neta positiva a pH fisiológico y estructura de  $\alpha$ -hélice. Desde 2004 existen antecedentes de CPPs fusionados a péptidos con potencial terapéutico, que han actuado como transportadores de los péptidos terapéuticos con resultados favorables *in vitro* e incluso *in vivo* en algunos casos [6].

En general, los péptidos como fármacos se pueden definir de acuerdo a su blanco terapéutico: cáncer, enfermedades cardiovasculares, dermatología, dolor, alteraciones metabólicas, desórdenes inmunológicos, neuronales, gastrointestinales, renales, respiratorios entre otros. De estas enfermedades, el cáncer es la principal causa de muerte en el mundo, según la OMS (Organización Mundial de la Salud), alrededor de 12,7 millones de casos nuevos ocurrieron en el año 2008. Cerca de 7 millones de personas mueren de cáncer cada año y se estima que habrá más de 16 millones de casos nuevos por año en 2020 [4].

Con el aumento en los pacientes con cáncer y también con enfermedades metabólicas como la diabetes, ha habido un gran auge en el crecimiento de péptidos terapéuticos frente a la quimioterapia, principal tratamiento actual para el cáncer, la cual presenta grandes desventajas debido a su incapacidad para proporcionar la cantidad correcta de medicamento y afectar a las células normales en el cuerpo [7].

## 1.2. Cáncer

De acuerdo con la OMS, el concepto de cáncer es un término genérico que envuelve a más de un centenar de enfermedades distintas que pueden afectar a cualquier parte del organismo, cada una de estas

enfermedades con características particulares, que a nivel celular, tienen en común el desorden en su crecimiento y diferenciación, y el daño progresivo del organismo donde ocurren [8].

En Chile, el cáncer ocupa el segundo lugar entre las principales causas de muerte, luego de las enfermedades cardiovasculares. Los tumores malignos o neoplasias representaban en 2010 un 23% del total de defunciones masculinas y un 24% de las muertes femeninas del país [9]. Al 2014 el escenario no debiese ser muy distinto dada la tendencia estacionaria que se ha presentado en la tasa de mortalidad por esta causa entre los años 2006 y 2010 [10-13]. Conforme al informe de datos de la salud de la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos), Chile tiene una tasa de mortalidad por cáncer inferior a la del promedio de los países que conforman este grupo [14], sin embargo continúa siendo una problemática tanto social como económica pues el impacto que tiene el cáncer en la sociedad representa un aspecto central de las consideraciones previas a la toma de decisión política respecto de invertir en un área específica de la salud.

Las células de un organismo sano viven en una compleja asociación de interdependencia estructural y funcional, autorregulando su ritmo de proliferación. Así, las células normales se reproducen sólo cuando reciben la instrucción de hacerlo, ya sea para reemplazar células que han cumplido su ciclo de vida, o para reparar lesiones sufridas, manteniendo así la integridad del organismo. Las células cancerosas violan este ordenamiento [15], desvinculándose de su comunicación con las demás células del organismo. Sufren una acumulación de múltiples alteraciones genéticas: activación de oncogenes, delección de regiones cromosómicas e inactivación de genes supresores tumorales. La sobreexpresión y las alteraciones en las proteínas codificadas por estos genes, producen alteraciones en el control del ciclo celular. Por su parte, un desarrollo celular normal es un proceso totalmente equilibrado que incluye la proliferación y la muerte celular. A su vez, estos procesos de proliferación y muerte celular por apoptosis son muy complejos e involucran la participación de muchos genes. La mutación de estos genes permite que las células neoplásicas o cancerosas se hagan virtualmente inmortales. En ambos procesos, el gen supresor p53 es uno de los genes más importantes y estudiados [16].

### 1.3. Proteína p53

El gen supresor de tumores *p53* está localizado en el brazo corto del cromosoma 17, codifica una fosfoproteína nuclear de 53 kDa que le otorga su nombre. p53 es una proteína involucrada en la regulación del ciclo celular. Este factor de regulación transcripcional activa una variedad de genes que resulta en la inhibición de la progresión del ciclo celular, a nivel del paso de G1 a S, y la reparación celular, o bien en apoptosis. Las señales que activan la función de p53 incluyen: daño o alteración al ADN por agentes químicos o radiación gama y ultravioleta e hipoxia, entre otros [17]. Un mecanismo de acción típico se

muestra en la Figura 3. Las señales de estrés activan diferentes proteínas quinasas y/o acetiltransferasas las que fosforilan o acetilan respectivamente a p53, modificaciones que provocan la estabilización y activación de la proteína p53 en el núcleo celular donde interactúa con secuencias específicas del ADN. Cuando p53 deja de ser necesaria es ubiquitinizada por una proteína llamada mdm2 y transportada fuera del núcleo para ser degradada por el proteosoma 26S. Además, p53 puede actuar fuera del núcleo para inducir la apoptosis mediante la unión a proteínas anti-apoptóticas, tales como Bcl2 [18].

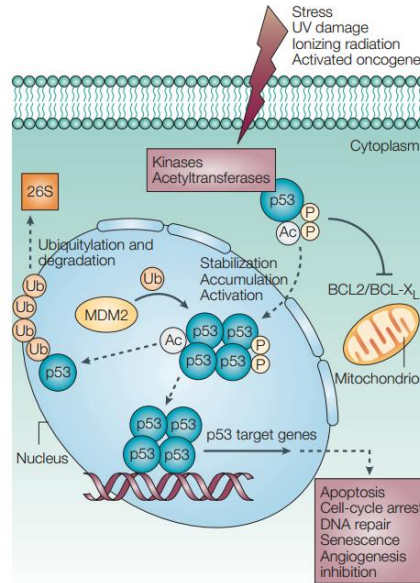


Figura 3. Activación de p53 y respuesta celular [18]

El gen *p53* participa por tanto, en la mantención de la integridad del genoma, pues la pérdida de la función de p53 permite la sobrevivencia de elementos celulares genéticamente dañados que eventualmente conducen a transformación celular tumoral. La evidencia actual señala que las alteraciones de p53 a nivel génico ocurren tardíamente en la patogénesis del cáncer y que el mecanismo de inactivación más frecuentemente involucrado corresponde a la mutación de un alelo seguido por la delección del alelo restante. Estas alteraciones se han observado en la mayoría de las neoplasias malignas en humanos [19]. El desarrollo del estudio de este gen ha motivado en los últimos 20 años múltiples indagaciones que buscan la recuperación de la función de la proteína p53, posibilitando así el desarrollo de fármacos que puedan eliminar células cancerígenas de modo selectivo. [20-21].

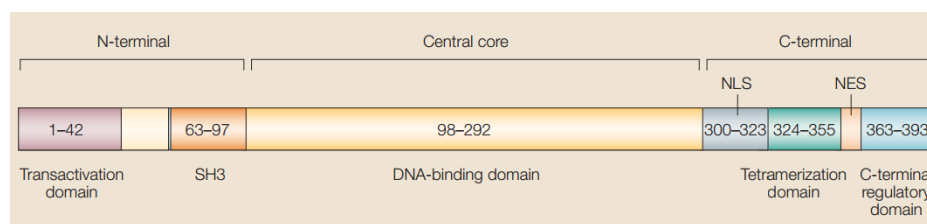


Figura 4. Dominios funcionales de p53 [18]

La molécula p53 contiene 393 aminoácidos y es comúnmente dividida en tres dominios (Figura 4): El dominio de transactivación en el extremo amino donde interactúa con mdm2; una región central con dominio de unión específico a ADN; y un dominio de regulación negativa ubicado en el extremo carboxilo de p53. La mayoría de las mutaciones presentes en células tumorales, son mutaciones *missense*<sup>1</sup> y han sido encontradas en la región central de la proteína p53, lo que impediría el acoplamiento de la molécula al ADN interfiriendo así en su funcionamiento normal [22].

#### 1.4. Péptidos derivados de p53: p53p-Ant y PNC-27

En 1997, un grupo de investigadores demostró que es posible restaurar la función inhibidora del crecimiento en células tumorales por medio de la transfección de un péptido sintético, derivado de la proteína p53 [23]. Este péptido está formado por la región del extremo carboxilo de p53 (aa 361-382) fusionado a un CPP llamado Penetratina, específicamente una secuencia de la región de unión a ADN de la proteína Antennapedia (*Ant*, factor de transcripción de *Drosophila*), la cual facilita el ingreso a la célula. En 2005, se demostró que el péptido indujo, *in vitro*, apoptosis de forma selectiva en líneas celulares pre malignas y malignas de distintos tejidos [24]. Esta fusión de secuencias proteicas se conoce como **p53p-Ant**, la que fue probada también *in vivo* en gliomas de rata e *in vitro* en líneas celulares humanas en 2006 [20].

El mecanismo de acción por medio del cual el péptido p53p-Ant le devuelve la función a p53 no está completamente definido, sin embargo se sabe que opera a nivel intracelular y depende de la presencia de p53 en la célula. Se ha descrito, en base a modelos computacionales, los distintos estados de p53 (latente/activo), estos modelos sugieren una interacción directa entre el dominio amino terminal y el dominio del extremo carboxilo de la proteína p53 nativa. En el modelo, la proteína p53 normal se mantiene en su forma latente debido a la interacción entre dichos dominios, lo que evita la funcionalidad del dominio central de unión a ADN. Las señales celulares de estrés genotóxico provocan cambios conformacionales en p53 de tal forma que la interacción entre los dominios extremos se pierde, permitiendo así la actividad del dominio central y por tanto la función antiproliferativa. Cuando existen mutaciones en p53, la conformación de ésta es modificada de manera tal que no existe respuesta ante las señales que activan su estado latente, así la proteína deja de ser funcional pues la interacción entre los dominios extremos permanece intacta [25]. Ahora bien, cuando se adiciona el péptido p53p-Ant, este actúa como un inhibidor competitivo ya que desplaza el dominio carboxilo-terminal de la proteína mutada para que se establezca una nueva interacción con el péptido, permitiéndole el despliegue de la proteína para

---

<sup>1</sup> Mutación *missense* es una mutación puntual en la que el cambio de base produce un codón que codifica un aminoácido diferente en la proteína resultante.

que adopte la conformación propia de su estado activo y con esto la recuperación de la función del dominio central. Un esquema de la recuperación de la función de p53, puede observarse en la Figura 5.

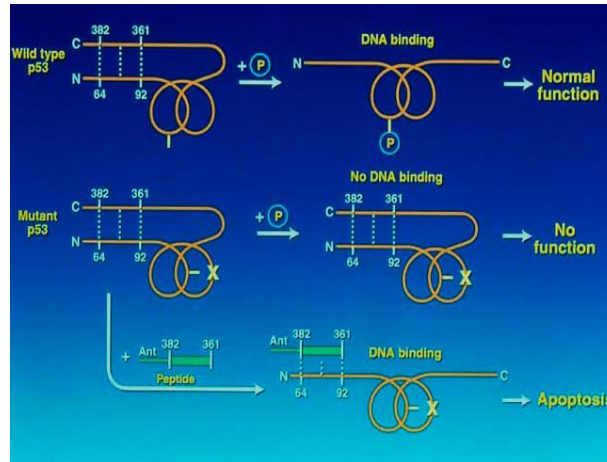


Figura 5. Modelo del mecanismo de acción de p53p-Ant [25]

Por otra parte, se sabe que las células cancerígenas eventualmente pueden activar múltiples mecanismos específicos de resistencia a agentes terapéuticos que inducen apoptosis, sin embargo estudios han demostrado que al incorporarse p53p-Ant en estas células, es posible evadir dicha resistencia provocando su muerte mediante necrosis [26].

Una de las modulaciones de interacción proteína-proteína conocidas en la célula es aquella conocida como p53-mdm2. La proteína mdm2, codificada por el gen *MDM2*, corresponde a uno de los factores nucleares que regulan el ciclo celular en la transición de las fases G1 (intervalo entre el fin de la mitosis y el inicio de la síntesis de ADN) a S (replicación del ADN), cuya función y expresión se ven alteradas en diversos tipos de neoplasias humanas. En la porción amino-terminal de la proteína mdm2 se encuentran los sitios de unión a la proteína p53 (aminoácidos 19-102) y al promotor de fase S, E2F1 (aminoácidos 1-220). Esta zona de la proteína es llamada tumorigénica, debido a su capacidad de interactuar con las proteínas p53 y E2F1, las que tienen un rol crucial en el control del ciclo celular [27].

Últimamente la función de la proteína mdm2 y su interacción con otros factores nucleares ha comenzado a dilucidarse en forma más clara. La proteína mdm2 puede unirse a p53 e inhibir su capacidad de activar la transcripción génica, impidiendo así la detención del ciclo celular dependiente de p53 en la fase G1 y anulando las propiedades antiproliferativas y apoptóticas de esta proteína. La proteína mdm2 aparece como producto de la transactivación<sup>2</sup> del gen *MDM2* por la proteína p53, siendo entonces capaz de unirse a esta proteína para su degradación vía ubiquitinas en el citoplasma celular. El sitio de unión de mdm2 en la proteína p53 está situado en una pequeña región de la zona aminoterminal de p53. Sólo dos

<sup>2</sup> Inducción de la expresión de un gen por la unión de un factor, codificado por un gen diferente, a regiones del ADN que corresponden a secuencias promotoras de su expresión

aminoácidos, leucina 22 y triptófano 23, críticos para la interacción de p53 con la maquinaria transcripcional, están relacionados con la unión a mdm2 [28].

Por otro lado, se sintetizó, en base a p53, un péptido denotado PNC-27, en este caso utilizando el dominio amino-terminal, de unión a mdm2, de p53 fusionado por el extremo carboxilo al CPP Penetratina (el mismo que se fusionó en p53p-Ant ), que confiere al péptido capacidad para atravesar la membrana plasmática. Se demostró que PNC-27, entre otros similares, puede tener un efecto citotóxico o antiproliferativo de manera selectiva en células cancerígenas tanto de ratón como humanas [29]. En otro estudio, este péptido demostró un claro efecto citotóxico en líneas celulares humanas de cáncer mamario debido a la inducción de muerte celular por necrosis, lo que se asoció a la pérdida de la integridad de la membrana plasmática [30].

En 2010 se encontraron niveles significativos de hdm2 (homólogo humano de mdm2) en las membranas de una variedad de células cancerosas, y no en membranas de diversas líneas celulares no transformadas. A diferencia de los estudios anteriores con PNC-27, experimentos demostraron que este péptido se une a la membrana celular enlazado a hdm2. Más aún, se transfectó un plásmido que expresa hdm2 con una señal de localización en la membrana en células MCF-10-2A sin transformar, no susceptibles a PNC-27 y se encontró que estas células que expresan hdm2 en su superficie celular se convirtieron en susceptibles a PNC-27, concluyéndose que PNC-27 se une a hdm2 en las membranas de las células cancerosas, lo que permite inducir membranolisis de estas células de forma selectiva [31].

El mecanismo específico mediante el cual el péptido PNC-27 desencadena la necrosis no está completamente dilucidado, sin embargo, a diferencia del p53p-Ant, éste no depende de la presencia de p53, pues se postula la formación de poros toroidales (Figura 6) en la membrana plasmática gracias a la estructura anfipática del péptido [26]. De este modo, en células no tumorales, el péptido ingresa a la célula, mientras que en células cancerígenas éste queda retenido en la membrana debido a su afinidad por mdm2/hdm2 formando los poros.

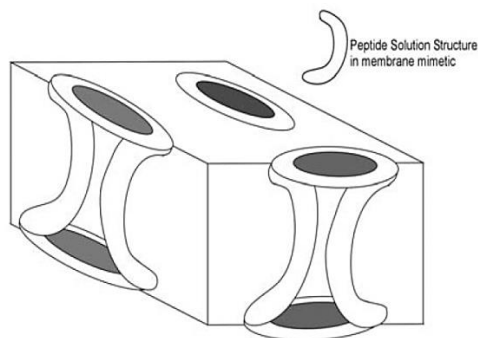


Figura 6. Modelo del mecanismo de acción del péptido PNC-27 en la formación de poros membranales [25]



Sobre la base de la evidencia y los antecedentes que hablan de la capacidad supresora de tumores de los péptidos p53p-Ant y PNC-27 anteriormente citados, resulta interesante desde el punto de vista de la ingeniería biotecnológica, producir estos péptidos en forma recombinante y de manera eficiente con el fin de minimizar el costo de su obtención y así mostrarse como un proceso atractivo a la industria farmacológica.

## 1.5. Producción y purificación de péptidos

La producción recombinante de proteínas es una de las técnicas más poderosas utilizadas en la Biología Molecular. La capacidad de producir y purificar gran cantidad de una determinada proteína en forma recombinante abre una amplia gama de nichos económicamente atractivos, incluyendo su uso en procesos industriales, o su uso para diagnosticar o tratar una enfermedad.

En general, la producción de proteínas recombinantes tiene asociado un proceso bastante estandarizado. Las etapas que contempla son: manipulación génica, fermentación, recuperación y purificación. Cada una de estas etapas puede ser objeto de análisis para su mejoramiento y optimización.

La primera etapa de manipulación génica requiere de la expresión de proteínas heterólogas en una célula huésped para que ésta adquiera nuevas características y pueda sintetizar así la proteína deseada. Esencialmente, el ADN que codifica una proteína de interés se clona río abajo de un promotor en un vector de expresión. Este vector se introduce entonces en una célula huésped, y la maquinaria de síntesis de proteínas de la célula produce así la proteína deseada. En la práctica, sin embargo, la expresión de la proteína puede ser muy difícil debido a que muchos factores pueden influir en el proceso. Por ejemplo, cada proteína se pliega de manera propia y única, y este proceso puede estar influenciado a su vez por la elección del huésped de expresión. Del mismo modo, algunas proteínas requieren modificaciones post-traduccionales o una adecuada inserción en una membrana biológica. Por último, algunas proteínas pueden tener una actividad perjudicial para el huésped. Por lo tanto, no existe una solución única para el éxito de la producción de todas las proteínas recombinantes. Resulta beneficioso entonces tener acceso a variadas alternativas y herramientas de expresión, y la voluntad de explorar distintas miradas para aumentar así la probabilidad de éxito [32-33].

Si bien las etapas intermedias de la producción recombinante son bastante conocidas, la etapa de purificación se vuelve particularmente difícil y costosa, sobre todo por la gran cantidad de sustancias diferentes contenidas en la célula y los altos niveles de pureza requeridos para la proteína de interés, que van desde 40% para insumos industriales hasta 99,9% en productos de utilización terapéutica [34]. De este modo, una ventaja competitiva en la producción dependerá no sólo de innovaciones en la biología

molecular, inmunología y otras áreas de ciencias biológicas básicas, sino además de la innovación y optimización en la separación y procesos río abajo [34].

La etapa de purificación es aquella que contempla una amplia gama de interesantes estrategias metodológicas. Ahora bien, la purificación de una proteína que no ha sido antes purificada es un proceso más bien empírico que generalmente se orienta por protocolos previamente establecidos y por el conocimiento previo de la proteína (punto isoelectrico, peso molecular, función, etc). Así, la elección de una adecuada estrategia permitirá la obtención de la proteína de interés en forma aislada y biológicamente activa.

Una de las técnicas altamente selectivas de separación es la cromatografía, la cual es usada comúnmente para aislar y purificar proteínas [34]. Dentro de las cromatografías más utilizadas se encuentra la llamada Cromatografía de Afinidad (AC por sus siglas en inglés), que se basa en una afinidad específica que presenta la proteína de interés por algún compuesto en una fase estacionaria, es decir, ligando inmovilizados que interactúan bioselectivamente con la proteína deseada. AC es la técnica cromatográfica más poderosa y específica pues permite alcanzar altos niveles de concentración y purificación.

El modo de operación de esta técnica es relativamente sencillo: una vez que se tiene el ligando específico en la fase estacionaria se inyecta la muestra para que se adsorban aquellos componentes que presentan afinidad con el ligando, y luego se modifican las condiciones para permitir la desorción del producto de interés. Sin embargo, es necesario aclarar que sólo por medio de estudios empíricos se puede determinar las condiciones para la elución (cambios de pH, cambios de fuerza iónica, adición de detergentes, etc.).

Si bien AC es la alternativa preferible a otros tipos de cromatografía dado que presenta mayor capacidad, velocidad y resolución es necesario conocer específicamente alguna característica de la proteína que le otorgue afinidad a un ligando. Una estrategia común para prescindir de este obstáculo es expresar la proteína de interés, fusionada a otra proteína con afinidad conocida a un ligando específico, y de esta forma, obviar sus características físicas, químicas o biológicas. Esta proteína de fusión es también denominado *tag* de afinidad.

## 1.6. Sistema IMPACT

Una vez aislada la proteína recombinante, la eliminación de un *tag* de afinidad, por ejemplo una cola de histidina, se realiza normalmente utilizando digestión con proteasas específicas del sitio. Un inconveniente de esto es que la proteína de interés debe ser nuevamente separada del *tag* liberado y de la

proteasa usando etapas de cromatografía adicionales. En este sentido, las Inteínas son segmentos de proteínas que catalizan cortes en sí mismas ofreciendo así una alternativa a la hidrólisis mediada por proteasas [35].

Desde esta perspectiva, el sistema IMPACT (*Intein-Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag*) es un interesante método de purificación de proteínas recombinantes que permite, utilizando AC, la obtención de la proteína purificada sin tener que recurrir a la incorporación de secuencias *tag*, para facilitar su purificación ya que el método incluye el sistema de expresión en *E. coli* con las proteínas de fusión incorporadas. Este método fue desarrollado por *New England Biolabs* (NEB) a partir de estudios de distintos mecanismos de *splicing* de proteínas. A diferencia de otros sistemas similares, éste presenta la ventaja de purificar a través de una columna de afinidad, una proteína con su secuencia nativa sin el uso de proteasas [36].

Este sistema permite la expresión de la proteína de interés unida a una proteína de fusión constituida por un dominio de Inteína modificada, más un dominio de unión a quitina (*Chitin Binding Domain*, CBD). Éste último entrega a la proteína heteróloga la afinidad a una columna de quitina para facilitar su purificación. Luego, el método utiliza la actividad auto-catalítica inducible de la Inteína para separar la proteína de interés de la proteína de fusión. Para esto, se induce la auto-proteólisis específica por adición de un reactivo tiol y/o por cambio en el pH o la temperatura, lo que finalmente libera la proteína de interés desde su proteína de fusión, quedando esta última retenida en la columna de quitina.

El sistema provee dos vectores de expresión: pTXB1 y pTYB11, los cuales permiten que el *tag* de fusión Inteína-CBD pueda ser añadido, ya sea al extremo carboxilo de la proteína de interés o bien su extremo amino, respectivamente. En la Figura 7 se esquematiza el mecanismo de funcionamiento del método IMPACT.

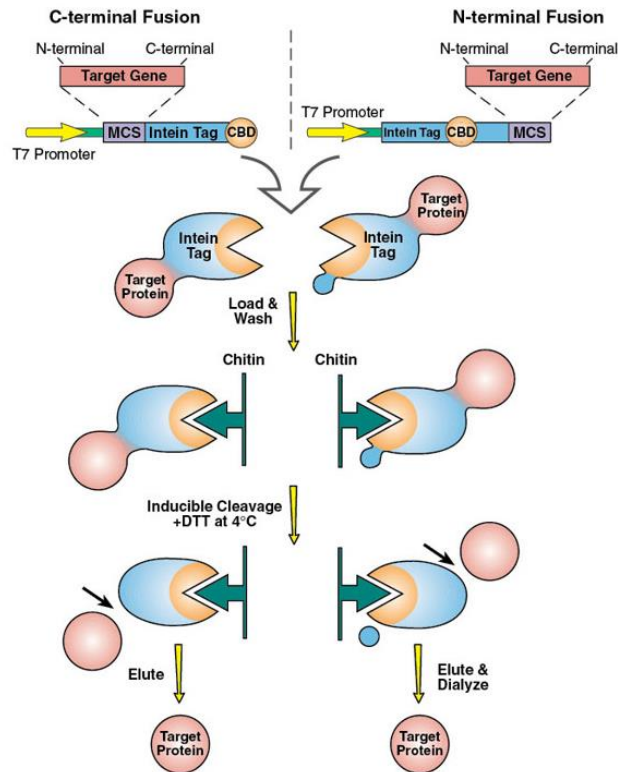


Figura 7. Representación esquemática del funcionamiento de IMPACT. A la izq. pTXB1, a la der. pTYB11 [36]

El vector pTXB1 utiliza una Inteína de 198 aminoácidos, proveniente del gen *gyrA* de *Mycobacterium xenopi*. Esta Inteína de aproximadamente 28 kDa ha sido diseñada desde la genética para que, al ser sometida a algún agente tiol, se induzca la actividad de auto-proteólisis en su extremo amino [37-38]. Por su parte, el vector pTYB11 incorpora una Inteína de 454 aminoácidos (56 kDa) codificada por el gen *VMA1* en *Saccharomyces cerevisiae*, induciendo auto-proteólisis en su extremo carboxilo liberando un pequeño péptido de 1,6 kDa, el cual coeluye con la proteína de interés y por tanto debe ser dializado al final del proceso [39].

Para regular la expresión de los genes o secuencias recombinantes, ambos vectores poseen el promotor *T7lac* y el represor *lacI*, los cuales permiten un fuerte control sobre la expresión de las secuencias de interés e inhiben la expresión basal del gen en ausencia de un inductor como IPTG [40].

A la fecha existen variados antecedentes que demuestran la efectividad de este método para purificar proteínas e incluso péptidos recombinantes ya sea mediante la aplicación del primer sistema de expresión (pTXB1) como del segundo (pTYB11). En particular la expresión y purificación del péptido SMAP-29 con actividad antimicrobiana, utilizando este sistema mediado por Inteínas, en particular el vector pTYB11, fue probada en 2005 y alcanzando un rendimiento de 0,1-0,2 mg de péptido purificado activo por litro de cultivo inicial [41].

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo General

Expresar en *Escherichia coli* de manera recombinante y mediante el sistema IMPACT, los péptidos p53p-Ant y PNC-27.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Establecer un protocolo de clonamiento, expresión y purificación específico para cada péptido de acuerdo a vectores de expresión IMPACT.
- Comparar y caracterizar la expresión de cada uno de los péptidos, para los distintos sistemas de expresión que ofrece el método IMPACT.
- Purificar cada uno de los péptidos producidos y evaluar la productividad y pureza lograda con los distintos sistemas.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Materiales

##### 3.1.1. Cepas bacterianas electrocompetentes

- Como huésped de clonación se utilizó células *E. coli* DH5 $\alpha$ . Genotipo F<sup>-</sup>  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK<sup>-</sup>, mK<sup>+</sup>) *phoA supE44*  $\lambda$ - *thi-1 gyrA96 relA1*
- Para la expresión se utilizó la cepa *E. coli* BL21(DE3). Genotipo F<sup>-</sup> *ompT hsdSB*(rB<sup>-</sup>, mB<sup>-</sup>) *gal dcm* (DE3)

##### 3.1.2. Vectores de clonamiento y expresión

Para obtener un alto número de copias de fragmentos de ADN, se utilizó el vector de clonamiento pGEM-T Easy (ver detalles en Anexo 7.1). Este vector se caracteriza por poseer una timidina no acoplada en el extremo 3' de cada una de las hebras en el sitio de inserción lo que permite la ligación de segmentos de ADN obtenidos por PCR que tienen una adenina en el extremo 3' de cada hebra debido a la actividad adenil-transferasa del mix de enzimas *Elongasa*.

Para seleccionar los clones positivos, el sitio de clonamiento múltiple del vector interrumpe la secuencia codificante del péptido  $\alpha$  de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, la cual hidroliza el sustrato X-gal, generando un precipitado de color azul. De esta forma, incluyendo este sustrato en el medio de cultivo, las colonias que adquieren coloración azul se identifican como negativas, y las blancas como positivas. Como sistema promotor, éste vector utiliza los promotores de la ARN polimerasa T7 y SP6 que flanquean el sitio de clonamiento múltiple.

Para la expresión de los péptidos recombinantes en *E. coli* se utilizó los vectores pTXB1 y pTYB11 (ver detalles en Anexo 7.1). El vector pTXB1 produce una proteína recombinante unida por su extremo C-terminal a una mini-Inteína (Mxe GyrA intein, 28 kDa) que contiene además un Sitio de Unión a Quitina (CBD por sus siglas en inglés) lo permite su posterior purificación. Por su parte, pTYB11 genera una proteína fusionada por su extremo N-terminal a una Inteína-CBD (Sce VMA1 intein, 56 kDa) facilitando de igual modo su purificación posterior. En ambos vectores, la expresión del gen de interés está controlada por el promotor T7*lac*.

### 3.1.3. Enzimas de restricción

El detalle del sitio de restricción de las enzimas utilizadas se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Sitios de restricción de endonucleasas utilizadas

Endonucleasa de restricción	Sitio de corte	Proveedor
EcoRI	5' - G $\nabla$ A A T T C -3' 3' - C T T A A $\blacktriangle$ G -5'	NEB
SapI	5' - G C T C T T C (N) <sub>1</sub> $\nabla$ -3' 3' - C G A G A A G (N) <sub>4</sub> $\blacktriangle$ -5'	NEB
NdeI	5' - C A $\nabla$ T A T G -3' 3' - G T A T $\blacktriangle$ A C -5'	NEB
PstI	5' - C T G C A $\nabla$ G -3' 3' - G $\blacktriangle$ A C G T C -5'	NEB

### 3.1.4. Oligonucleótidos

Un total de 9 partidores fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies, IDT. Entre estos, 7 corresponden a partidores diseñados para amplificar las secuencias de los péptidos y los restantes 2 diseñados para efectuar una mutación sitio dirigida con el fin de cambiar un codón en el gen que expresa p53p-Ant y así evitar un corte no deseado de la enzima de restricción SapI en el posterior clonamiento de la secuencia en los vectores de expresión. La Tabla 2 muestra la secuencia y  $T_m$  asociada a cada partidor. El detalle de la secuencia nucleotídica de cada péptido, los sitios de restricción presentes en los partidores y su correspondiente alineamiento con la secuencia de cada dímero se presentan en los Anexos 7.2 y 7.3.

**Tabla 2.**  $T_m$  y secuencias de los nueve partidores diseñados

Partidor	$T_m$ (°C)	Secuencia (5'→3')
pTXp53pS	60,2	CATATGGGCAGCCGCGCCCAT
pTXPNCS	60,2	CATATGCCGCCGCTGAGCCAG
pTXReverse	60,6	GCTCTTCCGCAACCGCGTTGAAC
pTYp53pS	60	GCTCTTCCAACGGCAGCCGC
pTYPNCS	67,4	GCTCTTCCAACGGTCCGCCGCTGAGC
pTYReverseI	59,7	CTGCAGTTAACCGCGTTGAACTTTCAC
pTYReverseII	67	CGCGGACGCTGCAGTTAACCGCGTTGAACTTT
Mutp53pSense	63,2	GCCCATAGCAGTCATCTGAAAAGCAAAAAGGGT
Mutp53pReverse	63,2	ACCCTTTTTGCTTTTCAGATGACTGCTATGGGC

### 3.1.5. Medios de cultivo líquidos y sólidos

- Líquidos:
  - **Medio Luria Bertani (LB):** Por cada 100 mL de solución, el medio LB contiene:
    - 1,55 g de Luria Broth
    - 0,95 g de NaCl
 Se ajusta el volumen a 100 mL con agua estéril y se esteriliza en autoclave.
- Sólidos:
  - **Placas LB-Agar con Amp/IPTG/X-Gal:** Se agregó 1,5 gr de agar a medio LB hasta completar 100 mL, se esterilizó en autoclave y se dejó enfriar a 50°C. Se agregó ampicilina para obtener una concentración final de 100 µg/mL (100 µL del stock de Amp 100 mg/mL), se agregó IPTG para obtener una concentración final de 0,5 mM (100 µL del stock de IPTG 0,5 M) y se agregó X-Gal para una concentración final de 80 µg/mL (160 µL del stock de X-Gal 50 mg/mL). Luego se repartió el contenido en 4 placas Petri estériles, las que, una vez gelificadas, fueron selladas, rotuladas y almacenadas a 4°C.

### 3.1.6. Soluciones y Buffers

Se preparó soluciones *stock* de los reactivos listados a continuación, en las concentraciones indicadas y utilizando agua desionizada estéril. Las soluciones fueron esterilizadas por filtración utilizando un filtro estéril con tamaño de poro de 0,2 µm. Luego fueron almacenadas a -20°C.



- Ampicilina 100 mg/mL
- IPTG 0,5 M
- X-Gal 50 mg/mL

Los *buffers* fueron preparados en agua desionizada y ajustados al pH necesario.

- *Column Buffer* (20 mM Tris-HCl, pH 8.5, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA)
- *Column Buffer Urea 8M* (20 mM Tris-HCl, pH 8.5, 8 M Urea, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA)
- *Washing Buffer* (20 mM Tris-HCl, pH 8.5, 1,5 M NaCl, 0,3% v/v Triton X-100)
- *Cleavage Buffer* (20 mM Tris-HCl, pH 8.5, 500 mM NaCl, 50 mM DTT, 1 mM EDTA)

El listado de reactivos y equipos utilizados durante el desarrollo experimental se muestra en el Anexo 7.4.

### 3.1.7. Herramientas Computacionales

Se recurrió a las siguientes aplicaciones informáticas indicadas en la Tabla 3.

Tabla 3. Herramientas bioinformáticas recurridas

Herramienta	Fuente	Sitio web	Referencia
BioEdit Sequence Alignment Editor	Hall, T.A.	<a href="http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html">http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html</a>	[Hall Tom.A., 1999]
ImageJ	National Institutes of Health, USA.	<a href="http://rsb.info.nih.gov/ij/">http://rsb.info.nih.gov/ij/</a>	[Rasband Wayne, 1997]
Oligo Calc	Basic Science at Northwestern University Medical School, USA.	<a href="http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html">http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html</a>	[Kibbe et al, 2007]
RestrictionMapper	Blaiklock Peter, Canada.	<a href="http://www.restrictionmapper.org">www.restrictionmapper.org</a>	[Blaiklock Peter, 2003]
Compute pI/Mw	Expasy, Suiza.	<a href="http://web.expasy.org/compute_pi/">http://web.expasy.org/compute_pi/</a>	[Gasteiger E. et al, 2005]

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Diseño de oligonucleótidos

En base a los sitios de clonamiento de los vectores de expresión pTXB1 y pTYB11, se diseñó los partidores para amplificar las secuencias *p53p-Ant* y *PNC-27*; cuatro partidores con sentido *sense*, cada uno para adicionar los correspondientes extremos cohesivos en el extremo amino terminal de cada dímero; tres partidores con sentido *reverse*, para agregar los extremos cohesivos adecuados en el extremo carboxilo terminal de cada dímero. Para clonar las secuencias deseadas en el vector pTXB1 se utilizó el mismo partididor *reverse*, así los partidores pTXp53pS y pTXReverse agregan los respectivos sitios de restricción a *p53p-Ant*, mientras que el par pTXPNCS y pTXReverse adiciona los sitios de restricción a *PNC-27*. A diferencia de lo anterior, para clonar dichas secuencias en el vector pTYB11 se debió utilizar dos partidores *reverse* distintos, los partidores pTYp53pS y pTYReverseI agregan los sitios de restricción a *p53p-Ant*, y por su parte, el par pTYPNCS y pTYReverseII agrega los sitios a *PNC-27*.

En el diseño se tomó en cuenta el sentido en que se transcribe cada vector de expresión, de modo de agregar codones de inicio y de término en los casos que así fuere requerido. Se consideró que las  $T_m$  de los oligonucleótidos que actúan pareados fuera lo más similar posible, que existiera el mínimo alineamiento entre ellos y que la formación de *hairpin* internos también fuese mínima. Para determinar todo esto se utilizó la herramienta *online Oligo Calc*<sup>3</sup>. De esta manera, el requerimiento de dos partidores *reverse* distintos se debió a la decisión de agregar un codón adicional en el dominio amino terminal de la secuencia original del péptido PNC-27, específicamente se agregó el residuo Glicina (GGC) para mejorar la eficiencia de proteólisis del sistema de purificación posterior.

Por otra parte y bajo las mismas premisas anteriores se diseñó dos partidores para hacer una mutación sitio dirigida en el dímero *p53p-Ant*, en este caso los partidores debían considerar el *miss match* de la base a cambiar.

---

<sup>3</sup> <<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>>

### 3.2.2. Clonamiento de secuencias en pGEM-T Easy

#### 3.2.2.1. Secuencias originales

La región codificante de ambos péptidos (secuencia nucleotídica detallada en Anexo 7.1), con la que se comenzó a trabajar, se obtuvo ya sintetizada químicamente y clonada en pGEM-T Easy, sin necesidad de recurrir al genoma completo para recuperarla. Ambos contienen la secuencia Penetratina en su extremo carboxilo terminal. La secuencia aminoacídica de los péptidos es la indicada en la Tabla 4. En base a esta secuencia, se estimó el tamaño teórico de p53p-Ant y PNC-27 mediante la herramienta *Compute pI/Mw* del servidor Expasy<sup>4</sup>, estableciéndose 4,43 kDa y 4,03 kDa para cada péptido respectivamente.

Tabla 4. Secuencia aminoacídica de péptidos (en negrita se destaca la secuencia del péptido de penetración celular: Penetratina de 17 aa)

Péptido	Secuencia	Aminoácidos	Tamaño [kDa]
p53p-Ant	GSRAHSSHLKSKKGQSTSRH <b>KKWKMRRNQFWVKVQ</b> RG	37	4,43
PNC-27	PPLSQETFSDLWKLL <b>KKWKMRRNQFWVKVQ</b> RG	33	4,03

Antes de comenzar con el proceso de amplificación de las secuencias para su posterior clonamiento en pGEM-T Easy, la secuencia nucleotídica original de los péptidos fue modificada con el fin de evitar secuencias no deseadas (ver Anexo 7.2). A continuación se describe la mutación previa al proceso de clonamiento.

#### 3.2.2.2. Mutagénesis sitio dirigida

Dado que la secuencia nucleotídica inicial del segmento que expresa p53p-Ant contenía el sitio de restricción de SapI, se debió efectuar una mutación sitio dirigida para cambiar un codón de este sitio y así evitar un corte no deseado. En particular, se reemplazó el codón AAG por AAA, ambos codifican Lisina (K).

Para generar la secuencia mutada se realizó una reacción PCR basada en el sistema *QuikChange*, utilizando como templado el vector pGEM-T Easy recombinante que contenía el fragmento *p53p-Ant* original. La reacción se llevó a cabo con la enzima Taq DNA Polimerasa (GoTaq, Promega), de acuerdo a las instrucciones del proveedor y con cada partidor a una concentración final de 0.4 mM.

<sup>4</sup> <[http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)>

El programa de ciclos térmicos para la amplificación fue el siguiente: 1 ciclo a 95°C por 2 min; 30 ciclos a 95°C por 1min, 58°C por 40 s, 72°C por 30 s, y finalmente 1 ciclo a 72°C por 5 min.

### 3.2.2.3. Purificación de fragmentos desde gel de agarosa

El producto de la reacción se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa 1% o 2% p/v (ver Anexo 7.5.1) y se purificó desde el mismo utilizando el sistema QIAEX II *Gel Extraction Kit*, según las instrucciones del fabricante [42]. El ADN aislado fue almacenado a -20 °C.

### 3.2.2.4. Adición de sitios de restricción

Una vez mutada la secuencia *p53p-Ant*, esta fue extraída al igual que *PNC-27* desde el vector pGEM-T Easy. Para extraer los fragmentos codificantes de cada péptido se usó la enzima de restricción EcoRI (*New England Biolabs*), ya que los sitios de corte de esta enzima presentes en el vector flanquean la secuencia insertada.

Las digestiones se realizaron de acuerdo a las instrucciones del proveedor, a 37 °C por un período de 2 horas. Los fragmentos obtenidos se purificaron de acuerdo con el punto 3.2.2.3.

Los fragmentos digeridos y purificados fueron diluidos 10 veces en agua estéril para utilizarlos como templado en la reacción de PCR que adiciona a cada uno, los sitios de restricción necesarios para una correcta expresión. Se obtuvieron así cuatro dímeros de amplificación con sus respectivos extremos para ser clonados posteriormente en los vectores de expresión pTXB1 y pTYB11. Los dímeros provenientes de *p53p-Ant* y *PNC-27*, destinados al vector pTXB1, se denominaron *p53pTX* y *PNCpTX* respectivamente. Aquellos provenientes de *p53p-Ant* y *PNC-27*, destinados al vector pTYB11, se denominaron *p53pTY* y *PNCpTY* respectivamente.

Para amplificar el fragmento *p53pTX* se utilizaron los partidores pTXp53pS y pTXReverse, para el fragmento *PNCpTX* los partidores pTXPNCS y pTXReverse, para el fragmento *p53pTY* los partidores pTYp53pS y pTYReverseI, mientras que para amplificar *PNCpTY* se utilizó el par pTYPNCS y pTYReverseII.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con el mix de enzimas *Elongasa (Elongase Enzyme Mix, Invitrogen)*, el cual agrega una base de adenina al extremo 3', permitiendo la posterior ligación al vector de clonamiento pGEM-T. Esta enzima además posee actividad exonucleasa 3'-5', permitiendo una amplificación de alta fidelidad.

La reacción se realizó de acuerdo a las instrucciones del proveedor y con cada partidor a una concentración final de 0.4 mM. Las condiciones de los ciclos térmicos varían de acuerdo a la  $T_m$  de los partidores utilizados, por tanto se describen por separado:

- Para las construcciones *p53pTX*, *p53pTY* y *PNCpTX*: 1 ciclo a 94 °C por 1 min; 30 ciclos a 94°C por 30 s, 55 °C por 30 s, 68 °C por 40 s, y finalmente 1 ciclo a 68°C por 1 min.
- Para la construcción *PNCpTY*: 1 ciclo a 94 °C por 1 min; 30 ciclos a 94 °C por 30 s, 62,5 °C por 30 s, 68 °C por 40 s, y finalmente 1 ciclo a 68 °C por 1 min.

Los productos de PCR fueron analizados y purificados de acuerdo al punto 3.2.2.3.

### 3.2.2.5. Ligación a pGEM-T Easy y transformación de *E. coli* DH5 $\alpha$

Para ligar al vector pGEM-T Easy los cuatro fragmentos purificados desde el gel de agarosa se utilizó 1  $\mu$ L de enzima T4 DNA ligasa, 5  $\mu$ L de *buffer* Ligasa 2X (ambos incluidos en el sistema de clonamiento), 0.5  $\mu$ L de vector, y 1.5  $\mu$ L de inserto. La reacción se incubó durante la noche a 4°C.

Los plasmidios generados se denominaron pGEM/*p53pTX*, pGEM/*PNCpTX*, pGEM/*p53pTY* y pGEM/*PNCpTY*. Estas mezclas de ligación fueron utilizadas para transformar células de *E. coli* DH5 $\alpha$  electrocompetentes mediante electroporación, según el protocolo indicado en el Anexo 7.5.2. Las células fueron sembradas en placas LB agar con Ampicilina 0.1 mg/mL, IPTG 0.5 mM y X-gal 50  $\mu$ g/mL. De ellas, se hizo PCR de las colonias blancas para corroborar la presencia de cada inserto en los clones seleccionados como positivos, según se muestra en el protocolo del Anexo 7.5.3.

Para amplificar cada fragmento se utilizó el par de partidores correspondientes indicado en el punto 3.2.2.4. Los programas de amplificación, utilizando la enzima Taq DNA Polimerasa, se muestran a continuación:

- Para las construcciones *p53pTX*, *p53pTY* y *PNCpTX*: 1 ciclo a 95 °C por 2 min; 30 ciclos a 95°C por 1 min, 55 °C por 40 s, 72 °C por 30 s, y finalmente 1 ciclo a 72°C por 5 min.
- Para la construcción *PNCpTY*: 1 ciclo a 95 °C por 2 min; 30 ciclos a 95 °C por 1 min, 62,5 °C por 40 s, 72 °C por 30 s, y finalmente 1 ciclo a 72 °C por 5 min.

De acuerdo a los resultados del PCR de colonias, se seleccionó una colonia de cada inserto, correspondiente a la de mayor concentración de producto de PCR, y se inoculó en 4 mL de medio LB con Ampicilina 0.1 mg/mL, para luego extraer el ADN plasmidial mediante minipreparación. (ver Anexo 7.5.4). Adicionalmente, 375  $\mu$ L de cada cultivo fueron almacenados a -80 °C en glicerol 80%.

Finalmente el ADN recombinante de los 4 plasmidios: pGEM/*p53pTX*, pGEM/*PNCpTX*, pGEM/*p53pTY*, pGEM/*PNCpTY* fue purificado desde un gel de agarosa 1% y fue secuenciado por Macrogen.

### 3.2.3. Clonamiento de secuencias en vectores de expresión

#### 3.2.3.1. Digestión de ADN plasmidial

Las cuatro secuencias deseadas, *p53pTX*, *PNCpTX*, *p53pTY* y *PNCpTY* se encontraban, cada una inserta en el vector de clonamiento pGEM-T Easy. Sus tamaños teóricos son 128 pb, 113 pb, 131 pb y 119 pb respectivamente.

Con la finalidad de ligar cada inserto con su respectivo vector de expresión, se digirieron ambos con las mismas enzimas de restricción (ver Tabla 5) Los plasmidios pGEM/*p53pTX* y pGEM/*PNCpTX*, y el vector pTXB1 se digirieron con las enzimas SapI y NdeI. Por otra parte, los plasmidios pGEM/*p53pTY* y pGEM/*PNCpTY*, y el vector pTYB11 se digirieron con las enzimas SapI y PstI.

Tabla 5. Enzimas de restricción requeridas para la doble digestión

Plasmidio	Enzimas
pGEM/ <i>p53pTX</i> , pGEM/ <i>PNCpTX</i> , pTXB1	SapI, NdeI
pGEM/ <i>p53pTY</i> , pGEM/ <i>PNCpTY</i> , pTYB11	SapI, PstI

Las digestiones se realizaron en forma simultánea, de acuerdo a las instrucciones del proveedor, a 37 °C por un período de 2 horas. Los fragmentos se purificaron de acuerdo al protocolo descrito en el punto 3.2.2.3.

#### 3.2.3.2. Ligación a vectores de expresión y transformación de *E. coli* BL21(DE3)

Para insertar los fragmentos *p53pTX*, *p53pTY*, *PNCpTX* y *PNCpTY* en sus correspondientes vectores de expresión linealizados se utilizó la enzima T4 DNA Ligasa (Invitrogen). Las reacciones de ligación se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones del fabricante, como se muestra en la Tabla 6:

**Tabla 6.** Mezclas de ligación para las distintas construcciones

Construcción	pTXB1/ <i>p53pTX</i>	pTYB11/ <i>p53pTY</i>	pTXB1/ <i>PNCpTX</i>	pTYB11/ <i>PNCpTY</i>
Mezcla	3 µL <i>p53pTX</i>	2 µL <i>p53pTY</i>	4 µL <i>PNCpTX</i>	3 µL <i>PNCpTY</i>
	1,5 µL pTXB1	4 µL pTYB11	1 µL pTXB1	1 µL pTYB11
	4 µL Tampón 5X	4 µL Tampón 5X	4 µL Tampón 5X	4 µL Tampón 5X
	1 µL enzima T4	1 µL enzima T4	1 µL enzima T4	1 µL enzima T4
	DNA Ligasa	DNA Ligasa	DNA Ligasa	DNA Ligasa
	10,5 µL agua estéril	9 µL agua estéril	10 µL agua estéril	11 µL agua estéril
Tiempo de incubación	16 h	32 h	24 h	16 h
Temp. de incubación	25 °C	4 °C	4 °C	4 °C

De acuerdo con la Tabla 6, las construcciones producto de la reacción de ligación se denominaron pTXB1/*p53pTX*; pTXB1/*PNCpTX*; pTYB11/*p53pTY* y pTYB11/*PNCpTY*. Estos plasmidios fueron incorporados en bacterias electrocompetentes *E. coli* BL21(DE3) por medio de electrotransformación (Anexo 7.5.2). Estas células fueron sembradas en placas de LB-Agar con Amp 100 µg/mL. El criterio de selección estuvo dado por considerar en primera instancia aquellas colonias generadas como clones positivos para luego confirmarlas mediante PCR de colonias (Anexo 7.5.3) para cada una de las construcciones, utilizando los partidores indicados en el punto 3.2.2.4. Las colonias positivas con mayor concentración de producto PCR de cada construcción fueron inoculadas en 4 mL de LB/Amp 100µg/mL, incubadas a 37 °C y 200 rpm durante la noche y finalmente 375 µL de cada cultivo almacenados a -80 °C en glicerol 80%.

A partir del resto del cultivo, se purificó los plasmidios mediante minipreparación de ADN plasmidial según el protocolo del Anexo 7.5.4. Finalmente para confirmar las secuencias clonadas, el ADN recombinante purificado de cada construcción fue secuenciado por MacroGen.

### 3.2.4. Inducción de la expresión de proteínas recombinantes

A partir de las construcciones pTXB1/*p53pTX*, pTXB1/*PNCpTX*, pTYB11/*p53pTY* y pTYB11/*PNCpTY* almacenadas en células BL21(DE3) a -80 °C, se inoculó 4 mL de medio LB/Amp 100 µg/mL y se incubó durante la noche a 37 °C y 200 rpm. Como control negativo se utilizó bacterias BL21(DE3) transformadas con los vectores sin inserto pTXB1 y pTYB11 respectivamente (sistemas

control pTXB1/*E. coli* BL21(DE3) y pTYB11/*E. coli* BL21 (DE3)). Luego se midió D.O.<sub>600 nm</sub> de cada cultivo. Cada uno de ellos fue inoculado respectivamente en 6 matraces de 500 mL con 100 mL de medio LB/Amp 100 µg/mL con la cantidad necesaria aproximada para que la lectura de la D.O.<sub>600 nm</sub> inicial de cada cultivo fuese 0,05. Estos matraces fueron incubados bajo distintas condiciones experimentales hasta que sus respectivas D.O.<sub>600 nm</sub> alcanzaran el valor 2,0.

Para inducir la expresión de las distintas proteínas, a cada uno de los 6 cultivos anteriores se adicionó IPTG 0,5 M a distintas concentraciones finales. Los 6 matraces fueron llevados a diversas condiciones de cultivo (temperatura, agitación y tiempo de incubación), con el fin de establecer las condiciones óptimas para la expresión. Al concluir el cultivo se tomó una alícuota de 4,5 mL de cada cultivo experimental para posteriormente medir la masa seca de bacterias presente en ellos.

### 3.2.5. Purificación de proteínas recombinantes

#### 3.2.5.1. Recuperación de proteínas recombinantes

Ya que las proteínas de interés no poseen señales de exportación, éstas debiesen encontrarse en la fracción citoplasmática de la célula. Con el fin de recuperarlas se procedió como sigue: los 6 cultivos fueron centrifugados a 5000 g durante 10 min a 4 °C para coleccionar las células. El sobrenadante fue descartado. Manteniendo en todo momento la temperatura de 4 °C, las células de los cultivos control negativo fueron resuspendidas en 10 mL de *Column Buffer*, mientras que las células de los 4 cultivos restantes fueron resuspendidas en 9,55 mL de *Column Buffer* (10% del volumen original). Estas suspensiones se mantuvieron en hielo y, utilizando el sonicador Microson Ultrasonic Cell Disruptor, se sonicaron 6 veces con 6 pulsos de 10 s, a 20 W en intervalos de 10 s evitando la formación de burbujas. Se tomó alícuotas de 200 µL de los 6 productos de sonicación y se almacenaron a 4 °C. Esta fracción corresponde a las proteínas **citoplasmáticas** totales. Los productos de sonicación se centrifugaron a 12000 g durante 10 min a 4 °C. Luego se recuperó el sobrenadante obtenido de los 6 tubos, correspondiendo éste a la fracción de proteínas **solubles** citoplasmáticas, que se mantuvo a 4 °C, separando además una alícuota de 200 µL de ésta. Posteriormente se resuspendió el sedimento de los tubos control negativo en 10 mL de *Column Buffer Urea 8M*, mientras que los sedimentos de los tubos restantes fueron resuspendidos en 9,55 mL de *Column Buffer Urea 8M* (10% del volumen original). Las suspensiones fueron centrifugadas a 12000 g por 10 min a 4 °C. Se tomó alícuotas de 200 µL de los 6 sobrenadantes obtenidos y se guardaron a 4 °C, correspondiendo éstos últimos a la fracción de proteínas citoplasmáticas **insolubles**, que contiene los cuerpos de inclusión formados por agregados proteicos, mientras que el sedimento corresponde al *debris* celular, el cual se descartó.



### **3.2.5.2. Ambientación de la columna de quitina**

Las etapas a continuación se llevaron a cabo a 4 °C a menos que se indicara lo contrario. Para 100 mL de cultivo original se tomó el volumen de resina recomendado por el fabricante, la cual está constituida por microesferas de quitina. La resina fue resuspendida en 10 mL de *Column buffer*, esta suspensión se empacó en una columna de purificación 1,45 cm de diámetro y 10 mL de capacidad. Aquí la resina fue lavada con 10 mL de *Column buffer* permitiendo por gravedad el flujo del tampón.

### **3.2.5.3. Carga de la fracción de proteína soluble**

Cada una de las 6 fracciones de proteína soluble reservadas en la sección 3.2.5.1 fueron cargadas respectivamente en 6 columnas previamente ambientadas impidiéndose el flujo por la columna. Las columnas cargadas fueron incubadas durante 1 h con agitación mínima a 4 °C. A continuación se reanudó el flujo y se colectó 1 mL de muestra para cada columna, la que corresponde a las proteínas que no se unieron a la resina, con esto posteriormente se estimó la eficiencia de unión a la resina.

### **3.2.5.4. Lavado de la columna**

La columna fue lavada con 50 mL de *Washing Buffer* para desprender cualquier otra proteína que no sea la de interés que pudiese haber interactuado con la resina. Se colectó una muestra de 1 mL al final del lavado de cada columna. Se detuvo el flujo y se agregó 5 mL adicionales de *Washing Buffer*, se resuspendió en éste la resina empacada en el fondo de la columna y se tomó una muestra de 200 µL de esta resina suspendida para posteriormente estimar la eficiencia de corte

### **3.2.5.5. Inducción de actividad de auto-proteólisis**

Para liberar los péptidos deseados desde las respectivas proteínas de fusión se indujo la actividad auto-proteolítica de estas últimas agregando 2 mL de *Cleavage Buffer* a cada columna. Una vez que 0,5 mL hubo abandonado la columna, se detuvo el flujo y cada columna fue incubada a 23 °C con agitación leve durante 40 h.

### **3.2.5.6. Elución de péptidos de interés**

El producto de la actividad auto-proteolítica de las proteínas de fusión fue eluido reanudando el flujo en cada columna y colectándose muestras de 1,5 mL. Este eluato se hizo recircular 3 veces por la columna con el fin de obtener mayor concentración. Posteriormente se lavó las columnas con 10 mL de *Column Buffer*. Luego se agregó 5 mL adicionales de *Column Buffer* con el flujo detenido para resuspender la resina y tomar una muestra de 200 µL de esta suspensión. Posteriormente se procedió a regenerar la resina de acuerdo con las indicaciones del fabricante [36].

### 3.2.5.7. Diálisis

La utilización del vector pTYB11 como sistema de expresión implica la traducción de un péptido de 1,6 kDa adicional a la proteína de fusión. Este péptido es liberado desde la inteína de este vector al eluato luego de activar la proteólisis. Los productos eluidos provenientes de este sistema de expresión (*PNCpTY* y *p53pTY*) fueron por tanto sometidos a diálisis con el fin de separar los péptidos de interés del péptido antes mencionado. Para esto se utilizó membranas de diálisis con poros de tamaño tal que permiten el paso de moléculas de hasta 3,5 kDa. Las membranas fueron hidratadas durante 1 h en agua desionizada, luego se agregó 0,5 mL del eluato de cada muestra dentro de las membranas, las que fueron selladas y posteriormente incubadas en 1,5 L de *Column Buffer* bajo agitación suave durante la noche a 4°C. El contenido dentro de las membranas fue recuperado y almacenado a 4°C.

### 3.2.6. Detección de proteínas recombinantes

#### 3.2.6.1. Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)

Con el objetivo de estudiar la producción de proteína recombinante en las distintas fracciones celulares de cada variante o bien para visualizar el producto de la Cromatografía de Afinidad, se realizaron separaciones electroforéticas en condiciones desnaturalantes y reductoras. Este procedimiento se llevó a cabo en una cámara vertical MiniProtean II. Las muestras se prepararon de acuerdo con el manual *Protein Methods* [43], se mezclaron en proporción 4:1 con tampón de carga 5X (Tris/HCl 60 mM, glicerol 25% v/v, SDS 2% p/v, 2-β mercaptoetanol 14,4 mM y azul de bromofenol 0,1% p/v pH 6,8), se desnaturalaron por ebullición durante 5 min, excepto aquellas que contenían urea, y posteriormente se cargaron en geles de acrilamida/bis-acrilamida preparados al 12,5% v/v. Se utilizó 5 µL de marcador de peso molecular.

Para visualizar las proteínas en el gel de acrilamida, se incubó durante 1 h en una solución de tinción de azul de Coomassie (45 % metanol, 10 % ácido acético, 45% agua destilada y 1 g de azul de Coomassie R), posteriormente se destiñó el gel con una solución de destinción (45 % metanol, 10 % ácido acético, 45 % agua destilada) y agitación suave hasta visualizar las bandas de proteínas. Finalmente, el gel se lavó con agua destilada y se fotografió. Este método de tinción tiene un límite de detección de 0,1 – 1 µg de proteína por banda [43]).

Para analizar la producción de proteínas recombinantes en las distintas fracciones celulares se utilizó tampón de corrida Tris-glicina-SDS (Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1% p/v) [43]. Las electroforesis de este tipo se realizaron bajo voltaje constante de 200 V durante 45 min.

A diferencia de lo anterior, con el fin de obtener la resolución que permitiera visualizar péptidos como los que se buscaba en forma adecuada, se recurrió a la electroforesis en tampón de corrida Tris-

Tricina. La composición del gel de poliacrilamida en este caso varía del anterior. En la Tabla 6 se describe la composición del gel de electroforesis requerido para esta técnica.

**Tabla 7.** Composición de geles de resolución y concentrador para electroforesis en tampón Tris-Tricina

Componente	Gel de resolución	Gel concentrador
Acrilamida/bisacrilamida (29:1)	1,24 mL	0,13 mL
Tampón Tris-HCl/SDS pH 8,5	1,27 mL	0,25 mL
H <sub>2</sub> O Desionizada	0,29 mL	0,62 mL
Glicerol 40% v/v	1,0 mL	-
PSA 10% p/v	19 µL	7,5 µL
TEMED	1,9 µL	0,75 µL

El Tampón Tris-HCl/SDS pH 8,5 mencionado en la Tabla 7 se preparó con 3M Tris ajustando pH a 8,5 con HCl, luego se filtró y se agregó SDS hasta alcanzar la concentración de 10,4 mM.

El tampón de corrida se componía de 2 tampones: Tampón Anódico y Tampón Catódico. El primero (0,2 M Tris-HCl pH 8,9) se vertió fuera de la cámara de electroforesis, mientras que el segundo (0,1 M Tris, 0,1 M Tricina y 3,5 mM SDS) fue vertido al interior de la cámara, en contacto con los geles. Luego se cargaron las muestras de interés y finalmente se realizó la electroforesis bajo voltaje constante a 120 V durante 2 h. Finalmente, para visualizar bandas, se tiño y destiño como se mencionó anteriormente.

### 3.2.6.2. Tinción de geles con nitrato de plata

Este método de tinción tiene un rango de detección de 2 – 10 ng de proteína por banda [43]. Dado que este rango es inferior al de tinción con azul de Coomassie, se utilizó la tinción con plata para visualizar la presencia de péptidos en los casos donde no fue posible mediante el uso de azul de Coomassie.

Una vez desteñido un gel por el método convencional, se lavó 4 veces en agua destilada durante 1 hora. Se incubó luego por 30 min en 125 mL de una solución de DTT 0,005 g/L. Se removió la solución y se añadió 125 mL de Nitrato de Plata 1 mg/mL en ausencia de luz. Se incubó por 30 min y luego se descartó la solución. Se agregó 125 mL de una solución fresca de Carbonato de Sodio 36 mg/mL y 0,06% de formaldehído al 37%. Se verificó la aparición de bandas en un transcurso de 2 a 10 min y se detuvo la reacción adicionando 3 g de Ácido Cítrico por cada 125 mL de solución. Se lavó con agua destilada y se fotografió.

### 3.2.7. Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína para las diferentes muestras correspondientes a los 6 cultivos se determinó mediante el ensayo de Bradford modificado [44], para lo cual se mezcló: 1,2 mL de agua destilada, 500  $\mu$ L de reactivo de Bradford (1 g/L de azul de Coomassie G 250 en HCl 2,2% v/v) y 50  $\mu$ L de muestra o proteína estándar de calibración.

Se utilizó una solución de BSA de 2 mg/mL como patrón para la construcción de una curva de calibración en concentraciones entre 0,004 y 1 mg/mL. Se midió la absorbancia a 465 y 595 nm, y se calculó la razón  $O.D._{595}/O.D._{465}$ . El valor obtenido en ausencia de BSA se restó a todas las demás razones y se graficó en función de la concentración de BSA. El rango de detección de este método es entre 0,1 -1 mg/mL, por lo que se consideró este rango para las mediciones.

### 3.2.8. Espectrometría de masas

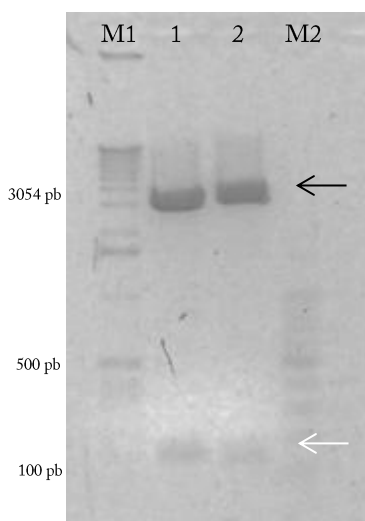
Una vez eluidas los tres productos, estos fueron concentrados mediante tubos Centricon de acuerdo al protocolo indicado en el Anexo 7.5.5 y posteriormente precipitados con acetona como se señala en el Anexo 7.5.6. Con el fin de corroborar la presencia de los péptidos esperados en las muestras, estas fueron enviadas precipitadas a análisis mediante espectrometría de masas. La adquisición de espectros de masas se realizó en un equipo MALDI-TOF Microflex (Bruker Daltonics INC., USA) en modo ion positivo mediante detección lineal y detección por reflexión.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Clonamiento de secuencias en pGEM-T Easy

#### 4.1.1. Adición de sitios de restricción

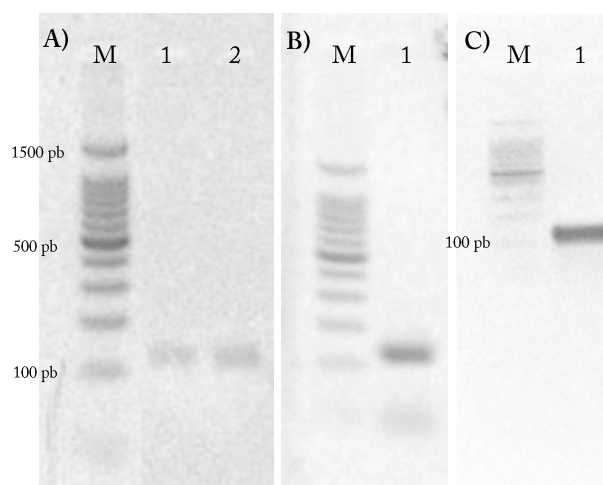
Con el fin de recuperar los fragmentos para poder luego adicionar sitios de restricción, se digirió los vectores pGEM-T Easy donde se encontraban insertos *p53p-Ant* y *PNC-27* (*p53p-Ant* fue digerido una vez realizada la mutación sitiodirigida). El resultado de la digestión se muestra en la Figura 8.



**Figura 8.** Análisis electroforético de la digestión de ADN plasmidial. Gel Agarosa 1%. M1: Marcador de peso molecular 1kb; 1: *p53p-Ant*; 2: *PNC-27*; M2: Marcador de peso molecular 100pb.

Aquí se observan dos bandas para cada caso, que corresponden a los tamaños esperados. En primer lugar, las bandas superiores representan el vector de clonamiento pGEM-T Easy (3015 pb) y las inferiores, los fragmentos *p53p-Ant* (111 pb) y *PNC-27* (96 pb) en los carriles 1 y 2 respectivamente. La escasa nitidez de las bandas inferiores señaladas con flecha blanca es atribuible a la concentración de agarosa en el gel, pues al contener 1% p/v opone menor resistencia a la migración de moléculas pequeñas de ADN en comparación a moléculas de mayor tamaño como las correspondientes a las bandas superiores, por lo que la migración es más rápida y menos homogénea, lo que se puede apreciar también en el marcador de peso molecular 100bp.

Las secuencias *p53p-Ant* y *PNC-27* recuperadas se utilizaron como templado de las reacciones PCR que agregan a cada una los sitios de restricción correspondientes a los vectores de expresión pTXB1 y pTYB11. Los productos de amplificación se denominaron *p53pTX*, *p53pTY*, *PNCpTX* y *PNCpTY*, y sus tamaños esperados son 128 pb, 131 pb, 113 pb y 119 pb, respectivamente. Los productos de las reacciones de PCR se muestran en la Figura 9.



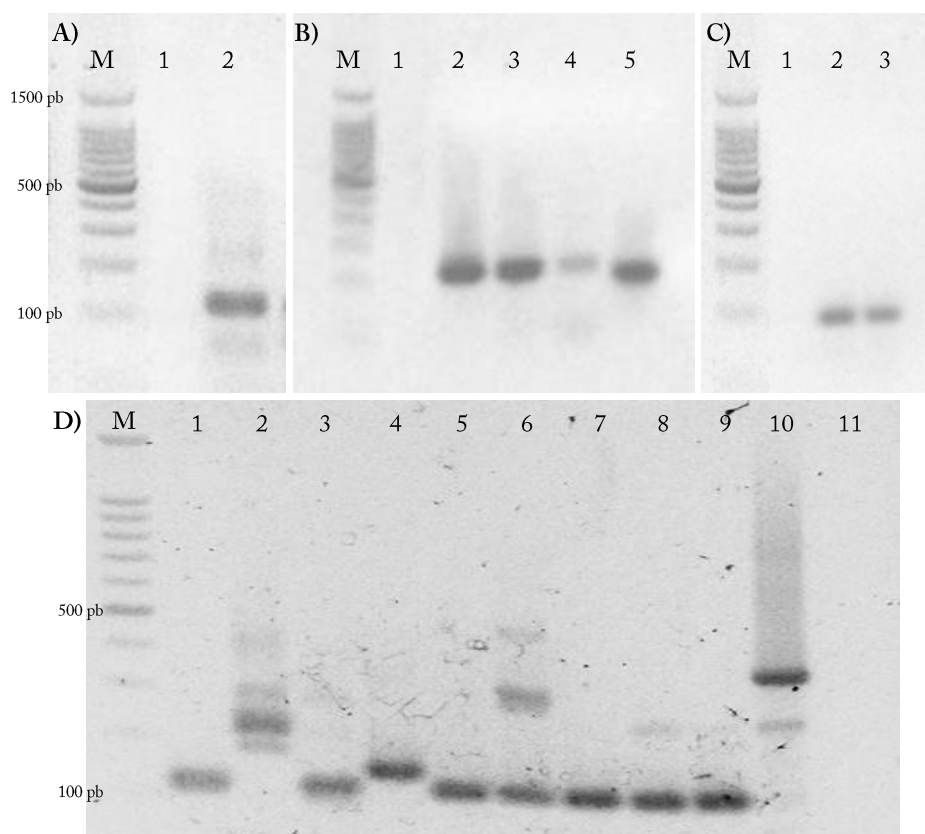
**Figura 9.** Análisis electroforético de producto de PCR de la construcción de los segmentos *p53p-Ant* y *PNC-27* modificados. Gel Agarosa 2%. M: Marcador de peso molecular 100bp; A) 1: Producto de PCR de *p53pTX*; 2: Producto de PCR de *p53pTY*; B) 1: Producto de PCR de *PNCpTX*; C) 1: Producto de PCR de *PNCpTY*.

Es posible apreciar *a priori*, que la síntesis de los cuatro fragmentos se logró exitosamente, puesto que se observa sólo una banda para cada uno de los casos a una altura aproximada de 100 pb o superior, que correspondería al tamaño predicho de los segmentos más los extremos necesarios para sus respectivas inclusiones en los vectores de expresión. En La Figura 9.B, se observa la presencia de una banda difusa y de bajo tamaño molecular (<100 pb) la que correspondería a productos de amplificación inespecífica de los mismos partidores.

#### 4.1.2. Transformación de *E. coli* DH5 $\alpha$

Luego de agregar los sitios de restricción correspondientes, los productos de amplificación fueron ligados al vector de clonamiento pGEM-T Easy para posteriormente electrotransformar bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$ . Estas bacterias se sembraron en placas LB-Agar con Amp 100  $\mu$ g/mL, X-Gal 50  $\mu$ g/mL e IPTG 0,5 mM.

En el caso de las variantes *p53pTY*, *PNCpTX* y *PNCpTY*, no hubo crecimiento de colonias blancas para ser consideradas recombinantes a primera vista, sin embargo se observó colonias de color azul y otras de color celeste. Se procedió, de todos modos, a realizar el PCR de cada una de estas colonias que presentaban coloración celeste, inclusive de aquellas azules en el caso de *p53pTY* y *PNCpTY*. El resultado es interesante, la Figura 10 muestra los productos de PCR realizado a las colonias asociadas a las 4 variantes, indicando que algunas de las bacterias fueron efectivamente transformadas con el vector recombinante respectivo aun cuando presentaron la capacidad de hidrolizar X-Gal.



**Figura 10.** Análisis electroforético del producto de PCR de colonias transformadas. Gel Agarosa 2%. M: Marcador de peso molecular 100bp; A) 1: Control negativo de PCR para el segmento *p53pTX*; 2: Producto de PCR de colonia transformada con *pGEM/p53pTX*; B) 1: Control negativo de PCR para el segmento *p53pTY*; 2 - 5: Producto de PCR de colonias 1, 2, 3 y 4 transformadas con *pGEM/p53pTY*; C) 1: Control negativo de PCR para el segmento *PNCpTX*; 2 - 3: Producto de PCR de colonias 1 y 2 transformadas con *pGEM/PNCpTX*; D) 1 - 10: Producto de PCR de colonias transformadas con *pGEM/PNCpTY*; 11: Control negativo de PCR para el segmento *PNCpTY*.

En todos los casos, Figuras 10.A, B, C y D, no se observa producto de amplificación en las reacciones que no contenían templado. En las Figuras 10.A, B y C, se observa una única banda en cada carril alrededor de los 100 pb, lo que indica que el 100% de las colonias presentes en las placas de estas 3 variantes resultaron clones positivos. En la Figura 10.D, sólo se observa una banda única por carril en las colonias 1, 4, 5 y 7, sin embargo esta última fue descartada por presentarse de tamaño levemente menor al esperado.

En la Figura 10.B la intensidad de las bandas es similar para todos los casos, a excepción de la franja de la tercera colonia transformada con *pGEM/p53pTY*, la que se observa levemente disminuida, indicando que la reacción de PCR obtuvo menor producto en comparación con las demás colonias.

Era esperable que en 10.B, C y D no existiera el producto deseado ya que la coloración de las colonias fue azul o celeste. Teóricamente la coloración azul es el producto de la reacción catalizada por la

enzima  $\beta$ -galactosidasa que hidroliza X-Gal, lo que indica que el vector pGEM-T Easy incorporado en estas bacterias no tendría interrumpida la secuencia del péptido  $\alpha$  de esta enzima, por el fragmento deseado. No obstante, según las imágenes, los fragmentos fueron efectivamente clonados.

#### 4.1.3. Secuenciación y análisis de constructos en pGEM-T Easy

Se realizó un cultivo de 4 mL de LB y Amp 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para cada una de las colonias positivas y así luego se extrajo el ADN plasmidial, el cual fue secuenciado por MacroGen. El resultado de esta secuenciación fue analizado con la herramienta BioEdit.

La secuencia recombinante de *p53pTX* obtenida corresponde a la secuencia esperada, posee los sitios de restricción añadidos en ambos extremos, el codón de inicio incorporado en el extremo amino terminal y la región codificante se presentó intacta, incluida la mutación realizada en un comienzo. (ver resultados de la secuenciación en Anexo 7.6).

En el caso de las 4 secuencias recombinantes de *p53pTY*, todas conservaron la región codificante del péptido p53p-Ant. Específicamente se exhibe un inserto de 131 pb, tal como se esperaba. También presentan los sitios de restricción y el codón de término adicionados.

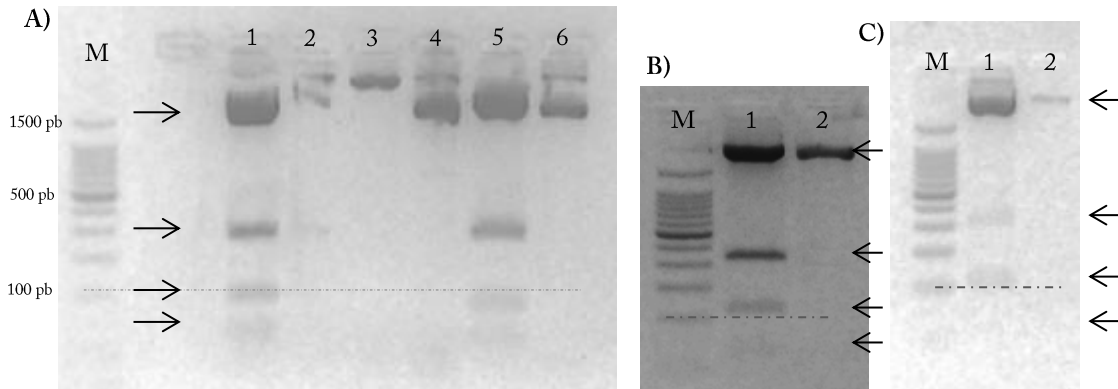
En cuanto a la variantes *PNCpTX* y *PNCpTY*, se obtiene que ambas muestras incorporaron el inserto en el vector pGEM-T Easy, se observa conservada la secuencia codificante de 96 pb para *PNCpTX* y de 99 para *PNCpTY*, que está en cada caso, correctamente flanqueada por los respectivos sitios de restricción. Esto finalmente confirma el resultado del producto de PCR de colonias transformadas de la Figura 10. La secuenciación del sitio de clonación indica que las secuencias codificantes de los péptidos estaban presentes en el gen que codifica el péptido  $\alpha$  sin modificar el marco de lectura. Este resultado indica que algunos clones positivos retienen la actividad  $\beta$ -galactosidasa, a pesar de la interrupción del gen *lacZ*, probablemente debido al menor tamaño del péptido insertado con respecto a la enzima completa.

## 4.2. Clonamiento de secuencias en vectores de expresión

### 4.2.1. Digestión de vectores pGEM-T Easy recombinantes

Los vectores pGEM-T Easy recombinantes fueron amplificados *in vivo* en *E. coli*. Luego se realizó minipreparación de ADN plasmidial desde el cultivo en medio líquido de una colonia seleccionada como positiva mediante PCR de colonias. Los plasmidios obtenidos y los vectores pTXB1 y pTYB11 fueron digeridos con las enzimas correspondientes (Tabla 5), para luego ligar cada inserto a su respectivo vector de expresión. La Figura 11.A muestra el gel de extracción con los productos de digestión de pGEM/*p53pTX*, pGEM/*PNCpTX* y pTXB1. El análisis electroforético de la digestión de pGEM/*p53pTY*, pGEM/*PNCpTY* y pTYB11 se muestra en las Figuras 11.B. y 11.C.





**Figura 11.** Análisis electroforético de la digestión de ADN plasmidial. Gel Agarosa 2%. M: Marcador de peso molecular 100pb; A) 1: digestión de pGEM/*p53pTX*; 2: pTXB1 sin digerir; 3: pTXB1 digerido; 4: pGEM/*PNCpTX* sin digerir; 5: digestión de pGEM/*PNCpTX*; 6: pGEM/*p53pTX* sin digerir. B) 1: digestión de pGEM/*p53pTY*; 2: pTYB11 digerido. C) 1: digestión de pGEM/*PNCpTY*; 2: pTYB11 digerido.

En el caso de la digestión de pGEM/*p53pTX* y pGEM/*PNCpTX*, los carriles 1 y 5 de la Figura 11.A muestran que se obtiene 4 bandas como producto para ambos, la mayor tiene un tamaño mayor a 1500 pb, una cercana a los 300 pb, otra cercana a 100 pb y otra inferior. Gracias a la herramienta en línea *Restriction Mapper*<sup>5</sup> es posible digerir el vector pGEM-T Easy de manera virtual. El resultado que arroja la herramienta dice que la secuencia total del vector (3015 pb), bajo la acción de las enzimas SapI y NdeI es fraccionada en 2 segmentos, uno de 2711 pb y otro de 304 pb. De este modo, al incorporar al vector un fragmento como *p53pTX* o *PNCpTX*, que contienen nuevos sitios de restricción SapI y NdeI (uno de cada uno), la digestión teóricamente generaría cuatro fragmentos, conservándose el de 304 pb y originándose 3 nuevos fragmentos: uno de 39 pb, el segundo de 2672 y un tercero, correspondiente al inserto, cercano a los 100 pb dependiendo específicamente del tamaño del inserto. Así, los tamaños predichos coinciden con los resultados obtenidos en la electroforesis, identificándose los fragmentos *p53pTX* y *PNCpTX* como las bandas más cercanas a los 100 pb en los carriles 1 y 5. Por otra parte, en el carril 3 se observa una banda correspondiente al vector pTXB1 linealizado, la cual es posible de contrastar con las bandas presentes en el carril 2 que representan el vector en forma circular, con sus distintos niveles de enrollamiento. Por último los carriles restantes de esta Figura muestran los vectores pGEM-T Easy recombinantes sin digerir para contar un control negativo de digestión.

En cuanto a la Figura 11.B, se obtiene un resultado similar a lo anterior. El carril 1 muestra la obtención de 4 bandas producto de la digestión del vector recombinante pGEM-T Easy. Al igual que antes, dadas las enzimas de restricción utilizadas, los fragmentos generados son del tamaño que se

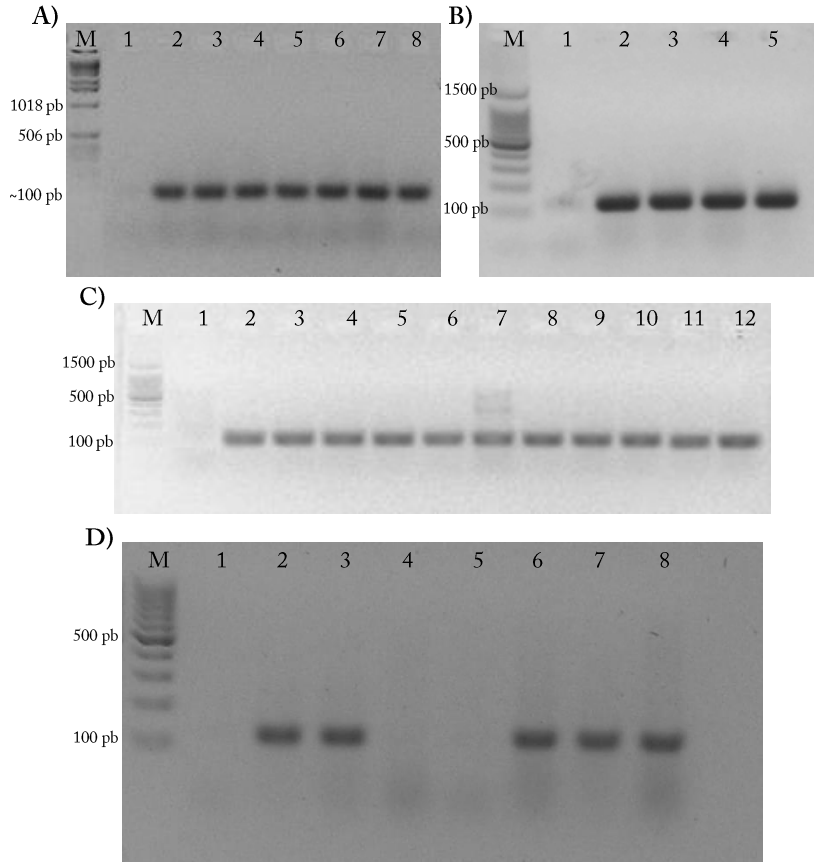
<sup>5</sup> <[www.restrictionmapper.org](http://www.restrictionmapper.org)>

esperaba, identificándose entonces la banda cercana a los 100 pb como la secuencia *p53pTY* que tiene un tamaño teórico de 131 pb. En el carril 2 se observa el producto de la digestión del vector pTYB11, el cual se muestra lineal sin indicios de circularidad o sobreenrollamiento. En 11.C, carril 1, se identifica consecuentemente la banda alrededor de 100 pb como el fragmento *PNCpTY*, mientras que en el carril 2 se observa el vector pTYB11 digerido sin muestras de sobreenrollamiento.

#### 4.2.2. Ligación y transformación de *E. coli* BL21(DE3)

Después de digerir las cuatro secuencias, éstas fueron purificadas y luego ligadas a los vectores de expresión correspondientes para posteriormente transformar por electroporación bacterias *E. coli* BL21(DE3) con las respectivas mezclas de ligación. Estas bacterias fueron sembradas en placas LB-Agar con Amp 100 µg/mL.

La Figura 12 muestra los productos de PCR realizados con primers específicos a las colonias asociadas a las 4 variantes, indicando que las bacterias fueron efectivamente transformadas con el plasmidio recombinante respectivo puesto que se observa en todos los casos una única banda alrededor de los 100 pb al mismo tiempo en que no se observa producto en las reacciones que no contenían templado (control negativo). En la Figura 12.C el producto de amplificación en los carriles se observa como una única banda próxima a 100 pb, a excepción del producto obtenido en el carril 7 donde se distingue más de una banda, de hecho es posible apreciar 2 bandas de tamaño claramente mayor a 100 pb, indicando que la reacción PCR pudo haber generado productos de amplificación inespecíficos a partir de esta colonia por lo que no se consideró para la posterior secuenciación.



**Figura 12.** Análisis electroforético del producto de PCR de colonias transformadas. Gel Agarosa 2%. M: Marcador de peso molecular; **A)** 1: Control negativo de PCR para el segmento *p53pTX*; 2-8: Producto de PCR de colonias transformadas con *pTXB1/p53pTX*; **B)** 1: Control negativo de PCR para el segmento *p53pTY*; 2-5: Producto de PCR de colonias transformadas con *pTYB11/p53pTY*; **C)** 1: Control negativo de PCR para el segmento *PNCpTX*; 2-12: Producto de PCR de colonias transformadas con *pTXB1/PNCpTX*. **D)** 1: Control negativo de PCR para el segmento *PNCpTY*; 2-8: Producto de PCR de colonias transformadas con *pTYB11/PNCpTY*.

Luego en la Figura 12.D, de las 7 colonias, 5 incorporaron efectivamente la construcción *pTYB11/PNCpTY*, mientras que las colonias de los carriles 4 y 5 no generaron producto alguno lo que indicaría transformación con el vector *pTYB11* sin digerir, el cual pudo haberse arrastrado desde la purificación a partir del gel de agarosa después de la digestión.

Con respecto a la ligación, se realizó varios ensayos bajo distintas condiciones que finalmente dieron como resultado las colonias de bacterias transformadas con el vector recombinante esperado. La masa de cada fragmento era difícil de determinar debido a su tamaño. Para utilizar la relación inserto/vector recomendada (3:1) se estimó cualitativamente la masa de fragmento purificado y vector linealizado a partir de la imagen resultante de la electroforesis. De esta manera sólo fue posible establecer relaciones de volúmenes entre las distintas, las mezclas de ligación (Tabla 6).

### 4.2.3. Secuenciación y análisis de vectores de expresión recombinantes

Para verificar que la secuencia amplificada mediante PCR fuera efectivamente la que se esperaba, se extrajo el ADN plasmidial de las colonias positivas y se determinó la secuencia de los fragmentos clonados. El resultado de esta secuenciación fue analizado con la herramienta BioEdit. La Figura 13 muestra un esquema de la secuencia obtenida para cada variante (ver detalle de resultados de la secuenciación en Anexo 7.7).

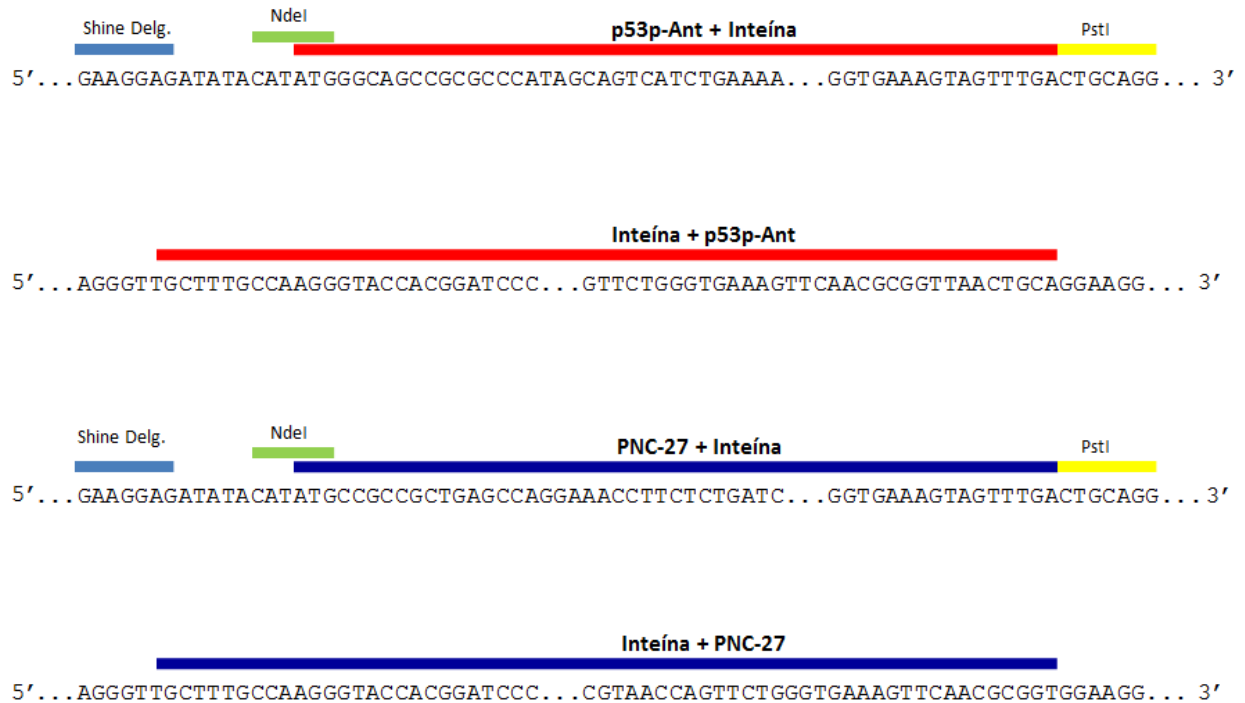


Figura 13. Esquema de la determinación de la secuencia de cada variante.

La secuencia obtenida de todas las colonias asociadas a *p53pTX* corresponde a la secuencia esperada, posee tanto los sitios de restricción como el codón de inicio incorporados, asimismo la región codificante se presentó intacta.

Las 4 secuencias obtenidas de pTXB1/*p53pTY* exhiben un inserto de 131 pb, tal como se esperaba, éstas conservaron la región codificante del péptido además de los codones adicionales para su expresión.

Asimismo, la secuencia codificante de 96 pb del péptido PNC27 se conservó en los constructos pTXB1/*PNCpTX* y pTYB11/*PNCpTY*, presentando respectivamente los nucleótidos adicionales que la flanquean. En cuanto a la variante *PNCpTY*, se verifica la adición del codón GGC (Glicina) para favorecer su la posterior purificación.

Si bien, la secuenciación finalmente confirma el resultado del producto de PCR de colonias transformadas de la Figura 12, fue difícil clonar debido al tamaño de los fragmentos con que se trabajó.

### 4.3. Expresión de proteínas recombinantes

Se realizó varios ensayos preliminares en cultivos celulares con diferentes condiciones experimentales con el objeto de producir las proteínas esperadas en forma soluble. Las variables ajustadas para determinar las condiciones óptimas fueron la concentración de IPTG, temperatura, y tiempo de incubación.

Para determinar la concentración final de IPTG adecuada se indujo la producción utilizando 0,4 mM, 0,2 mM, 0,1 mM y 0,05 mM. En base a SDS-PAGE se determinó que aquella concentración que generó mayor cantidad de producto soluble fue 0,1 mM de inductor.

Por su parte, para determinar la temperatura y tiempo de incubación adecuados, en la fase previo a la inducción, se incubó los cultivos bajo dos condiciones: a 37 °C durante 2 h; y a 30 °C durante 5 h, cuando alcanzaron una D.O.<sub>600 nm</sub> de 2,0 se agregó el inductor. Luego, los cultivos fueron sometidos a cuatro condiciones diferentes en paralelo: a 37°C durante 6 h; 25°C por 10 h; 18°C por 16 h; y 12°C durante 20 h.

De las 4 variantes, *p53pTY* sólo fue posible expresarla en forma soluble incubando el cultivo previo a la inducción a 30°C y 5 h, por lo que se decidió llevar todos los cultivos a esa condición. De este modo se estableció que las condiciones experimentales que maximizaron la producción de proteína recombinante en forma soluble fueron: incubación previa a 200 rpm, 30°C durante 5 h (o hasta que la D.O.<sub>600 nm</sub> sea 2,0); inducción con 0,1mM de IPTG, incubación a 200 rpm, 12°C durante 20 h.

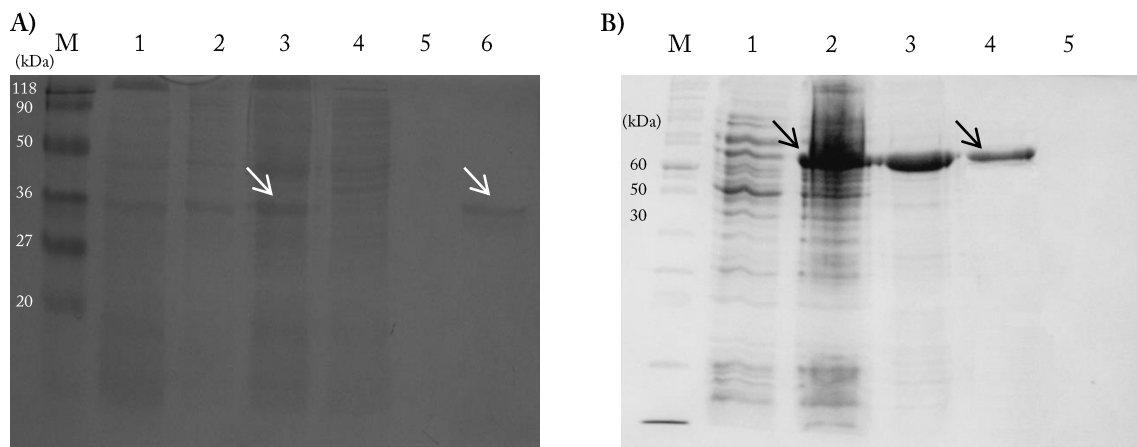
La expresión recombinante tarda en total 25 h aproximadamente, requiriendo 12°C de temperatura durante 20 h. Este resultado no es sorprendente ya que es sabido que la disminución de la temperatura de inducción puede mejorar el plegamiento proteico debido a la reducción en la tasa de formación de la proteína recombinante y también a la reducción de la actividad proteolítica. Además, aun habiendo determinado las condiciones de cultivo óptimas para la expresión, no fue posible obtener la proteína recombinante correspondiente a *pTXB1/p53pTX* en forma soluble.

### 4.4. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

A continuación se muestra el resultado de la expresión de las distintas proteínas provenientes de sus respectivos sistemas de expresión en un análisis electroforético en gel de poliacrilamida. Cabe mencionar que la etapa de purificación se inicia inmediatamente después de obtener las fracciones solubles

de las distintas muestras por lo que el análisis electroforético se presenta como una secuencia temporal de eventos río abajo en el proceso completo de expresión y purificación.

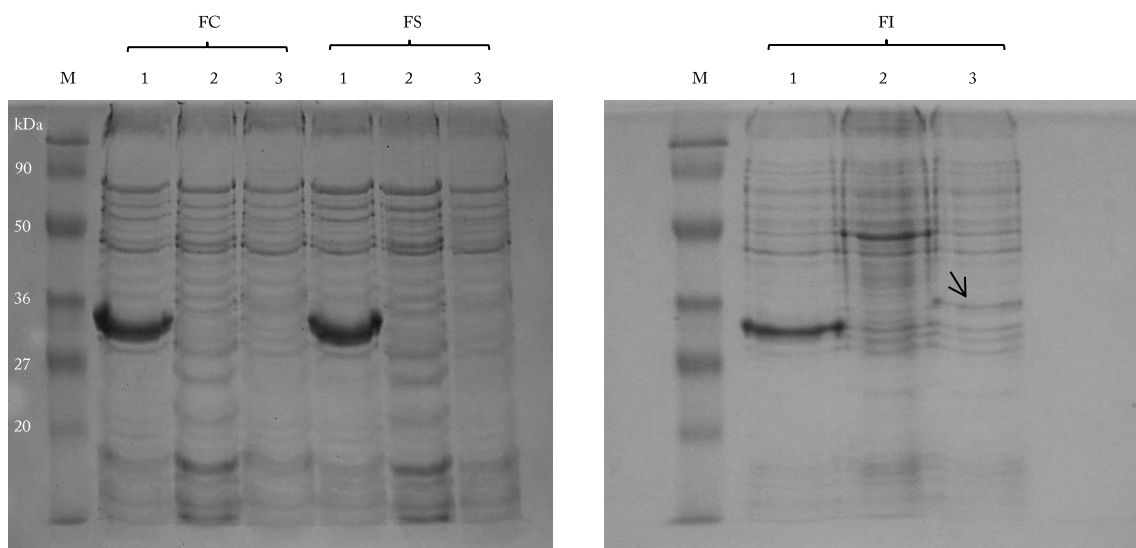
Se corroboró la efectividad del sistema IMPACT (Figura 14). Bajo las condiciones establecidas en la sección anterior, los controles negativos (sin los péptidos fusionados) expresaron proteínas del tamaño esperado. El tamaño esperado de la inteína asociada a pTXB1 es aproximadamente 28 kDa, mientras que el tamaño esperado de la inteína de pTYB11 es de 56 kDa.



**Figura 14.** Análisis electroforético (SDS-PAGE) de la expresión y purificación de los sistemas control. M: Marcador de peso molecular; **A)** Expresión control pTXB1/*E. coli* BL21 (DE3); 1: Fracción citoplasmática; 2: Fracción insoluble; 3: Fracción soluble; 4: Proteínas no retenidas en la resina; 5: Lavado; 6: Proteína retenida en la resina. **B)** Expresión control pTYB11/*E. coli* BL21 (DE3); 1: Fracción citoplasmática; 2: Fracción soluble; 3: Fracción insoluble; 4: Proteína retenida en la resina; 5: Lavado.

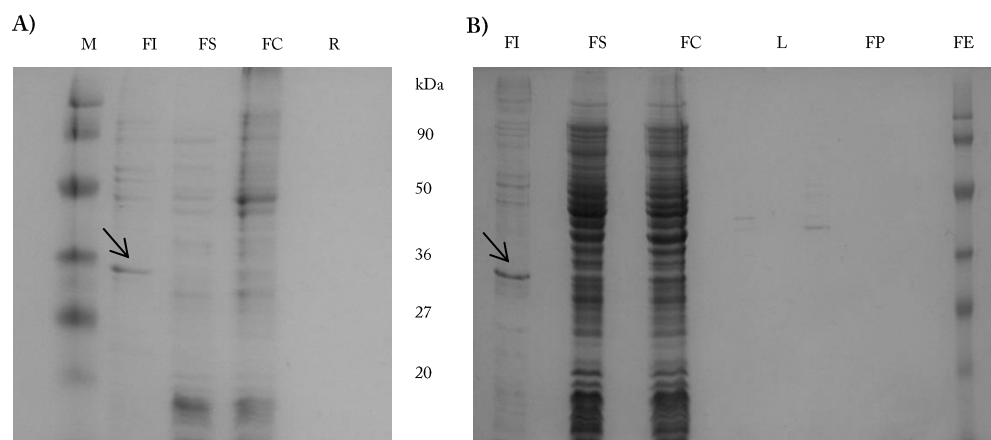
#### 4.4.1. Expresión de p53pTX

La expresión del péptido p53p-Ant unido a su proteína de fusión codificado por p53pTX no se logró en forma soluble. El resultado de la inducción de la expresión de esta variante se muestra en la Figura 15. La inducción se contrastó con la expresión de la misma variante sin inducción como control negativo y con la expresión del vector pTXB1 como control positivo.



**Figura 15.** Inducción de la expresión de la proteína recombinante derivada de la construcción *pTXB1/p53pTX*. M: Marcador de peso molecular. FC: Fracción citoplasmática; FS: fracción soluble; FI: Fracción insoluble. 1: Control positivo (*pTXB1*); 2: Control negativo (*pTXB1/p53pTX* no inducido); 3: *pTXB1/p53pTX* inducido.

Se observó un muy bajo nivel de expresión de la proteína y se demostró que ésta se expresa sólo en forma de cuerpos de inclusión como se señala en la Figura 15. La Figura 16.A indica que no hay presencia de la proteína esperada en la fracción soluble y como se muestra en el carril R, no se detecta la proteína adsorbida en la resina de purificación. Más aun, para verificar que la proteína no se expresaba y descartar su presencia en otras fracciones celulares, se recuperó la fracción periplasmática y del medio extracelular sin encontrarse indicio de la proteína de interés. Esto último se muestra en la Figura 16.B.

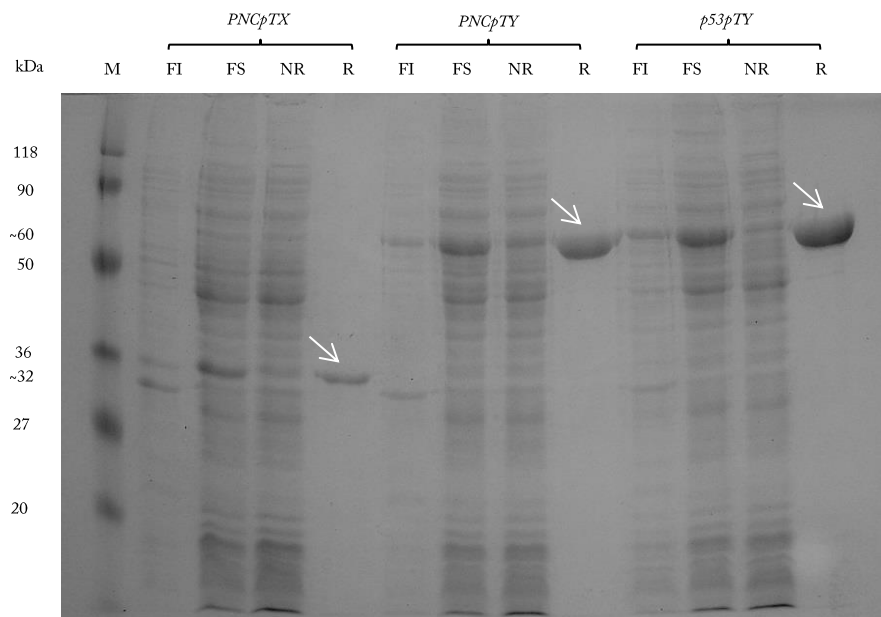


**Figura 16.** Expresión del péptido p53p-Ant unido a su proteína de fusión derivada de *p53pTX*. A) Carga de Fracción Soluble (FS) en la columna (R: proteína retenida en la columna). B) Recuperación de Fracción Periplasmática (FP) y Fracción Extracelular (FE) después de una etapa de Lavado (L).

Una nueva secuenciación del vector recombinante pTXB1/p53pTX indicó que no existen alteraciones en la secuencia promotora ni codificante, por lo que se descartó mutaciones a nivel de ADN que pudieran impedir una adecuada expresión. No existen tampoco antecedentes que permitan afirmar la formación de estructuras no deseadas en el ARN mensajero. Las Figuras 15 y 16 muestran la expresión de la proteína en forma insoluble, lo que indica que la traducción efectivamente ocurre. Como se ve más adelante, este péptido sí se expresó en forma soluble desde el vector pYB11, donde se encuentra unido a su proteína de fusión por el extremo N-terminal del péptido, se cree por tanto que existen restricciones estructurales dadas por la secuencia que no permiten el correcto plegamiento de p53p-Ant unido a la inteína por el extremo carboxilo. El experimento control de la Figura 14 muestra la expresión soluble de la proteína de pTXB1, por lo que se puede establecer que la expresión soluble de la proteína recombinante completa en pTXB1 (péptido + proteína de fusión) depende notablemente de la expresión de la región amino terminal de ésta.

#### 4.4.2. Expresión y purificación de PNCpTX, PNCpTY y p53pTY

Ahora bien, las variantes que sí se pudieron expresar en forma soluble y luego purificar son aquellas asociadas a las construcciones pTXB1/PNCpTX, pTYB11/PNCpTY y pTYB11/p53pTY. Éstas se presentan en la Figura 17.



**Figura 17.** Análisis electroforético (SDS-PAGE) de la expresión y purificación de proteínas recombinantes derivadas de las construcciones pTXB1/PNCpTX, pTYB11/PNCpTY y pTYB11/p53pTY. M: Marcador de peso molecular; FI: Fracción insoluble; FS: Fracción soluble; NR: Proteínas no retenidas en la resina; R: Proteína retenida en la resina.



En el gel, las tres proteínas expresadas se situaron dentro del rango de tamaño esperado, vale decir, la proteína codificada por *PNCpTX* mostró un tamaño cercano a los 32 kDa (28 kDa de la Inteína-CBD + 4 kDa de PNC-27), mientras que aquellas derivadas de *PNCpTY* y *p53pTY* se ubicaron cercanas a los 60 kDa (56 kDa de la Inteína-CBD + 4 kDa de PNC-27 o bien p53p-Ant). Aun cuando previamente se determinó las condiciones óptimas de cultivo, se observó que existe un porcentaje de la proteína recombinante citoplasmática que se expresa en forma insoluble.

#### 4.4.3. Determinación de la producción de proteínas recombinantes

La curva de calibración del ensayo Bradford obtenida es la que se indica en el Anexo 7.8. En base a ésta se cuantificó las fracciones proteicas intracelulares provenientes de los distintos sistemas de control. En el Anexo 7.9 se muestra la cuantificación de las distintas fracciones.

Junto con esto, mediante densitometría de imagen (Figura 17) se determinó el porcentaje de proteína recombinante presente en la fracción soluble de cada variante (Anexo 7.9). Aplicando este valor sobre la cuantificación de proteína soluble total, se estimó el nivel de producción de proteína recombinante soluble por litro de cultivo, como se indica en la Tabla 8, columna 1.

Tabla 8. Nivel de producción y pureza de los péptidos en el proceso de producción.

Muestra	Proteína recombinante soluble* [mg]	Razón péptido/proteína recombinant	Péptido esperado [mg]	Péptido obtenido** [mg]	Pureza del péptido [%]
<i>PNCpTX</i>	8,0	0,13	0,65	0,82	80
<i>PNCpTY</i>	8,5	0,07	0,40	0,41	97
<i>p53pTY</i>	20,0	0,07	1,18	1,26	94

\* Proteína de fusión + péptido; \*\*Por cuantificación Bradford

Las muestras que contenían las proteínas recombinantes solubles, fueron cargadas en la matriz de quitina e incubadas durante 1 hora. La matriz fue luego empacada en una columna, eliminando las proteínas no adsorbidas a la resina. La columna fue lavada y se colectó muestras de perlas de quitina. Las proteínas unidas a estas perlas fueron recuperadas y cargadas a un gel de poliacrilamida y analizadas por SDS-PAGE. Un factor importante que afecta el rendimiento total es la que se denominó **Eficiencia de Unión (EU)** a quitina, pues en ningún caso fue posible fijar el 100% de la proteína recombinante a la columna. En base al análisis de densitometría de imagen mediante la herramienta ImageJ, fue posible establecer cuantitativamente este factor para cada proteína recombinante, el cual se detalla en la Tabla 9, columna 1, más adelante.

#### 4.4.4. Inducción de auto-proteólisis y recuperación de péptidos recombinantes

Una vez inducida la actividad de auto-proteólisis, la reacción se incubó durante 40 h. El eluato colectado fue analizado mediante análisis SDS-PAGE.

El factor de **Eficiencia de Corte (EC)** mostrado en la Tabla 9, columna 3, fue determinado por densitometría a partir del análisis SDS-PAGE de las proteínas adsorbidas a la quitina, antes y después de la inducción de auto-proteólisis. Los valores de EC obtenidos son similares o mejores que los valores de eficiencia sugeridos por el proveedor del sistema IMPACT (Tabla 9, columna 2). Estos valores son sólo una referencia, pues de acuerdo al diseño genético de las inteínas incorporadas en los vectores de expresión, existe por defecto este factor de Eficiencia de Corte que depende no sólo del residuo adyacente al sitio de corte y del tiempo y temperatura de incubación, sino también del plegamiento de la proteína de fusión completa, ya sea por el extremo amino o carboxilo terminal de la inteína correspondiente, dado los diferentes grados de impedimento estérico que ciertos aminoácidos o estructuras podrían oponer a la separación.

El aminoácido que se ubica adyacente la posición de corte, en los tres casos es glicina (Gly, G). Si bien la secuencia original del péptido PNC-27 suponía prolina (Pro, P) en esa posición, al construir el fragmento recombinante, se añadió G al extremo amino para favorecer el factor EC, ya que con P en esa posición la eficiencia de corte sugerida resultaría inferior.

Mediante un ensayo Bradford se cuantificó la masa de péptido ya purificado presente en el eluato. Un tercer factor, denominado **Eficiencia de Elución (EE)** (Tabla 9, columna 4) fue obtenido a partir de la razón de péptido recuperado en el eluato y el total de péptido disponible. El total de péptido disponible corresponde a la suma entre las cuantificación del péptido recuperado en el eluato y la cuantificación de péptido recuperado en el lavado posterior.

Tabla 9. Determinación de los factores EC y EE para cada producto.

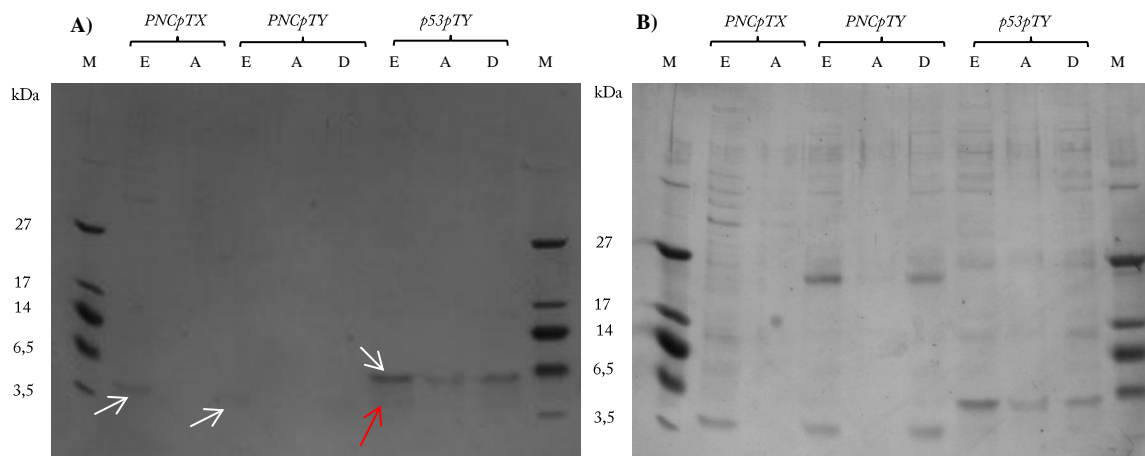
Muestra	EU	EC*	EC	EE
<i>PNCpTX</i>	0,94	0,6	0,73	0,93
<i>PNCpTY</i>	0,88	>0,9	0,90	0,90
<i>p53pTY</i>	0,93	>0,9	0,95	0,96

\* Valores de referencia sugeridos por el fabricante del sistema IMPACT

Por otra parte se consideró que la masa de péptido contenido en cada proteína recombinante está dada por la razón entre sus respectivos tamaños. Así, aplicando los factores de eficiencia obtenidos para cada etapa, se pudo establecer la masa esperada de cada péptido (Tabla 8, columnas 2 y 3). Este valor corresponde por tanto al rendimiento de péptido por litro de cultivo.

En base a la cuantificación de los péptidos purificados se determinó que la productividad difiere para cada sistema péptido-vector. Estos resultados se muestran en la Tabla 8, columna 4. Se observó que estos valores son mayores a la masa de péptido esperada. Esto se puede atribuir a la presencia de otras proteínas, diferentes a los péptidos de interés.

La pureza de los péptidos obtenidos fue estudiada mediante análisis SDS-PAGE. En la Figura 18.A se corrobora que ambos péptidos fueron efectivamente eluidos luego de la escisión desde sus respectivas proteínas de fusión. Estos se ubicaron en el gel dentro del tamaño esperado, cercano a los 4 kDa, observándose la diferencia de tamaño entre PNC-27 y p53p-Ant. La visualización de la tinción con Coomasie (Figura 18.A, carriles E), mostró que la intensidad de las bandas de los péptidos es consistente con la cantidad de péptido determinada en la Tabla 8, columna 4. La tinción con nitrato de plata del gel de poliacrilamida, mostró la presencia de proteínas contaminantes en las distintas muestras (Figura 18.B). Dado que este método de visualización no permite relacionar la intensidad de las bandas con la abundancia de proteínas, la pureza de los péptidos (Tabla 8, columna 5) fue determinada como la razón entre la cantidad esperada de péptido (calculada con los factores de eficiencia) y la cantidad de proteína en las muestras, obtenida de la cuantificación por Bradford.



**Figura 18.** Análisis electroforético (SDS-PAGE) de la purificación de los péptidos p53p-Ant y PNC-27 derivados de las construcciones pTXB1/*PNCpTX*, pTYB11/*PNCpTY* y pTYB11/*p53pTY*. **A)** Tinción del gel con azul de Coomassie; **B)** Tinción del gel con nitrato de plata. M: Marcador de peso molecular; E: Muestra del eluato; A: Muestra precipitada con acetona; D: Muestra dializada.

Los péptidos producidos a partir del vector, deberían haber mostrado un péptido adicional de 1,6 kDa, el cual es producto del este sistema de proteólisis mediada por inteínas. Con el fin de eliminar este péptido, las muestras pTYB11/*PNCpTY* y pTYB11/*p53pTY* fueron dializadas usando una membrana con tamaño de poro de 3,5 kDa, y visualizadas en un gel de poliacrilamida (Figura 18, carriles D). Se observó que existe una pérdida cercana al 40% de péptido durante el proceso de diálisis. Sin embargo no fue

posible visualizar este péptido de 1,6 kDa en los geles (tampoco se visualizó la banda de 1 kDa del marcador de peso molecular usado), incluso cuando se utilizó glutaraldehído para la fijación de péptidos al gel. Es probable que péptidos tan cortos como estos sean muy susceptibles a degradación, lo que podría explicar la ausencia de estos en el gel de poliacrilamida. Por este resultado, la diálisis fue omitida del proceso final.

Con respecto al punto anterior, existen diversos factores que afectan la estabilidad de péptidos en solución. La composición del tampón, y la concentración del péptido, son factores que afectan la tasa de degradación de éstos [45]. Además se sabe que una de las vías típicas de degradación de péptidos es la hidrólisis de los mismos cuando hay residuos como serina (S) en la secuencia aminoacídica, con glicina (G) en el extremo amino terminal. [46]. Un estudio paralelo de expresión recombinante y purificación del mismo péptido p53p-Ant mostró que efectivamente existe hidrólisis del enlace peptídico ante la presencia de G-S en el extremo N-terminal, además de la hidrólisis en 3 residuos de serina en la región derivada de p53 [47]. Considerando la concentración de los péptidos obtenidos, el tiempo transcurrido durante su manipulación, como también la secuencia de los mismos, se puede inferir que éstos resultaron parcialmente degradados. Muestra de lo anterior, lo constituye la “sombra” difusa observada debajo de la banda correspondiente a p53p-Ant, en el carril E de la Figura 18.A (flecha roja), la que correspondería al producto de la degradación de dicho péptido. Es recomendable por lo tanto, minimizar el tiempo de manipulación de los péptidos en medio líquido y someterlos a liofilización para almacenarlos.

Se estudió la precipitación de péptidos con acetona. Las muestras sometidas a precipitación (ver Anexo 7.5.6) fueron solubilizadas en tampón denaturante y cargadas en un gel de policacrilamida para su análisis (Figura 18, carriles A). Se observó que los resultaron menos concentrados que aquellos no precipitados. Sin embargo, cuando los péptidos fueron previamente concentrados en filtros de centrifugación (Centricón YM3, ver Anexo 7.5.5) precipitaron con acetona. Esto debido a la dependencia de este método con la concentración de proteína inicial.

La comparación de los rendimientos de los péptidos provenientes del vector pTYB11 (Tabla 8, columna 3) muestra que son muy diferentes, y no es posible esbozar conclusiones respecto de la productividad general del sistema para estos péptidos. Sin embargo, los niveles de producción se podrían mejorar mediante el uso de volúmenes de cultivo más grandes, cuando sea necesario. Además, se observó que los valores exceden los niveles de producción reportados para otros péptidos producidos mediante este sistema [41, 48, 49]. Se determinó también, que el grado de pureza de p53p-Ant y PNC-27 obtenidos a partir de este método es mayor al 90%, que es adecuado para su uso en ensayos biológicos *in vitro* o *in vivo*.

En el caso del vector de expresión pTXB1, aunque no fue posible producir el péptido p53p-Ant, el péptido PNC-27 obtuvo un mayor rendimiento que usando el sistema de pTYB11 (Tabla 8, columna 3). Sin embargo, el nivel de pureza alcanzado fue sólo del 80%, lo que permite aplicaciones limitadas. Con el fin de mejorar la pureza final del péptido, una purificación adicional podría llevarse a cabo. Dada la carga positiva del péptido, se recomienda una cromatografía de intercambio catiónico.

Las muestras purificadas de los péptidos p53p-Ant y PNC-27 producidos por el sistema pTYB11, fueron sujetas a análisis de espectrometría de masa MALDI-TOF. La razón  $m/z$  teórica promedio de los péptidos en su forma protonada es de 4435 y 4089, respectivamente. Estos *peaks* fueron identificados en los espectros obtenidos (Figuras 19 y 20), confirmando la presencia de los péptidos.

Los datos experimentales muestran que el rendimiento final de la producción de péptido depende principalmente del nivel de producción de proteína recombinante soluble alcanzado, además de la eficiencia del proceso de proteólisis relacionado, en principio, a la secuencia del péptido. Menor dependencia se observó en la eficiencia de unión a quitina y en la eficiencia de elución sobre el rendimiento final de los péptidos. El factor de Eficiencia de Unión a quitina (EU) podría mejorarse, ya que la manipulación y sucesiva regeneración de la resina de quitina podrían haber afectado su rendimiento.

Si bien los péptidos p53p-Ant y PNC-27 producidos por el sistema IMPACT fueron caracterizados por espectrometría de masas y la actividad antitumoral de la secuencia aminoacídica ha sido demostrada por otros investigadores [50], idealmente se debe confirmar que el péptidos sintetizados mediante este proceso mantienen 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.

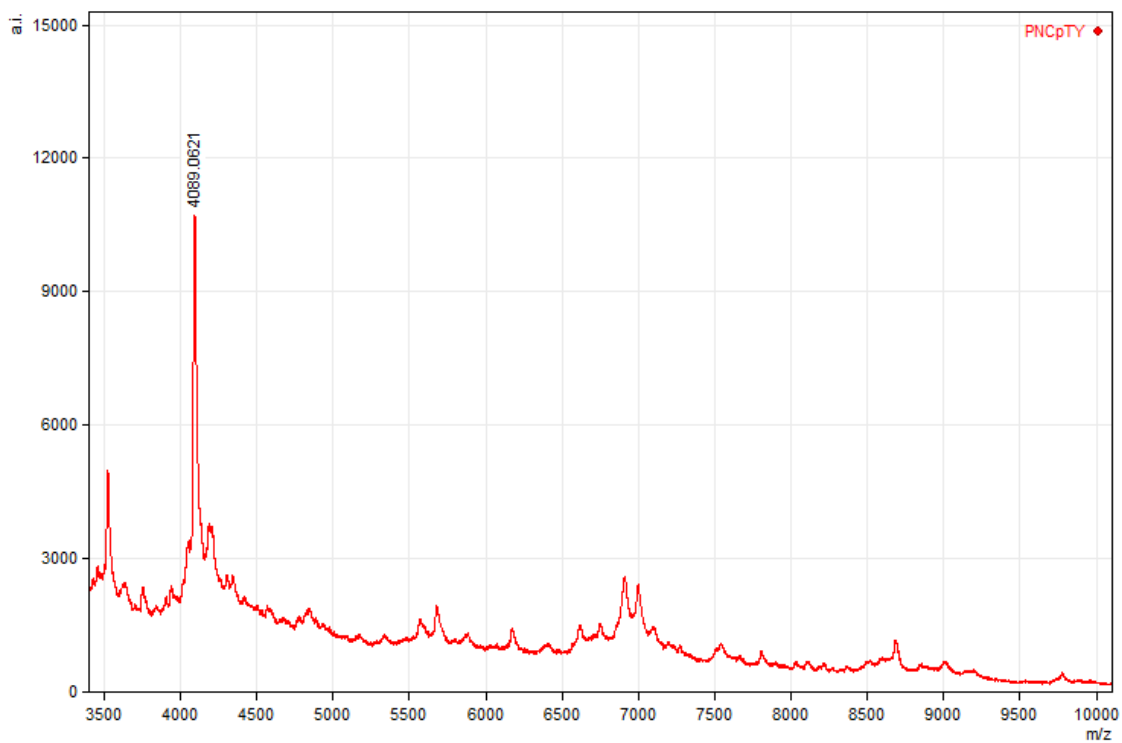


Figura 19. Espectro de ionización por detección lineal de la muestra *PNCpTY*

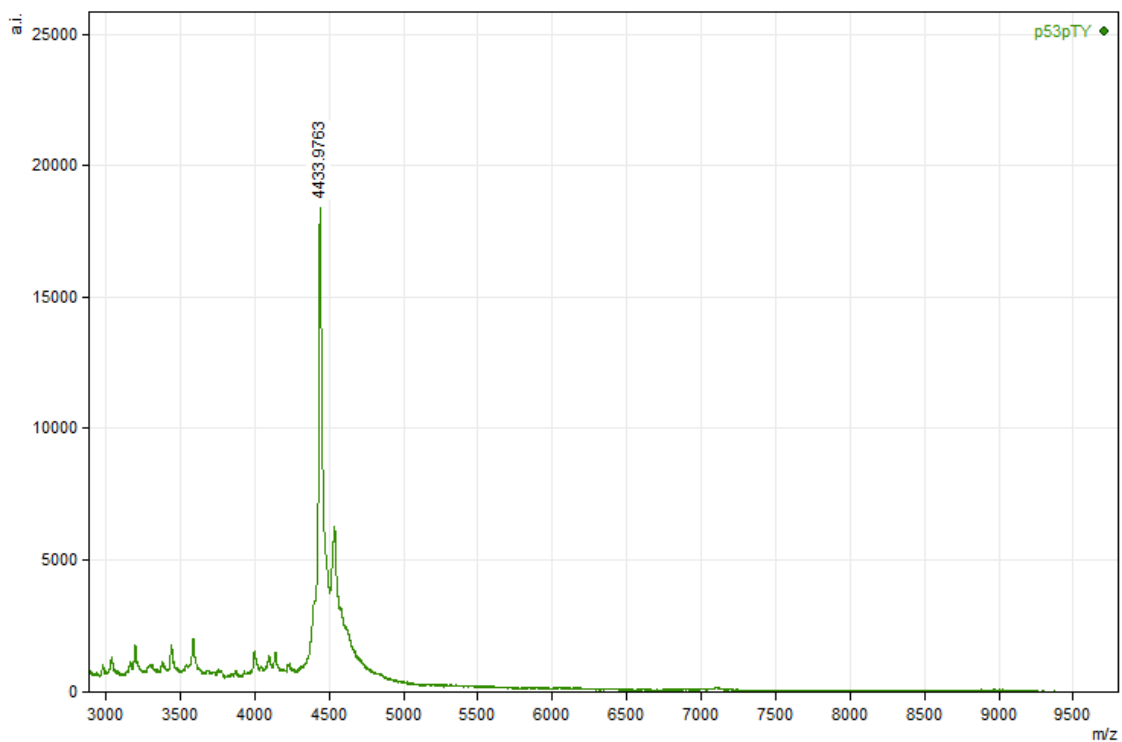


Figura 20. Espectro de ionización por detección lineal de la muestra *p53pTY*

## 5. Conclusiones

En relación a la etapa de manipulación génica, se diseñaron 2 variantes para cada péptido. Fue posible clonar todas las variantes tanto en el vector de clonamiento, como en los vectores de expresión pTXB1 y pTYB11 según correspondiera. Se logró la expresión soluble de 3 de las 4 variantes unidas a sus respectivas proteínas de fusión: p53p-Ant proveniente de pTYB11, PNC-27 derivado de pTXB1 y PNC-27 derivado de pTYB11. El péptido p53p-Ant unido a su proteína de fusión procedente del vector pTXB1 fue expresado únicamente en forma insoluble. La expresión de los péptidos, se llevó a cabo en *E. coli* BL21 (DE3) estableciéndose las condiciones experimentales que maximizaron la producción de proteína recombinante en forma soluble: incubación previa a 200 rpm, 30°C durante 5 h; inducción con 0,1mM de IPTG, incubación a 200 rpm, 12°C durante 20 h.

La expresión del péptido PNC-27 se logró en ambos sistemas de expresión. Aunque se observaron diferencias en el rendimiento, el péptido se obtuvo en forma soluble fusionado a una inteína tanto por su extremo amino como carboxilo. La expresión, sin embargo requiere incubación a baja temperatura.

La expresión de p53p-Ant precisa, al igual PNC-27, incubación a baja temperatura para generarse soluble. Por otra parte, la expresión de este péptido depende notablemente del sistema de expresión que se utilice, pues no es posible producirlo en forma soluble cuando su secuencia se encuentra clonada por su extremo carboxilo terminal a la inteína recombinante. Se concluye con esto que en el vector pTXB1, la expresión está determinada por la secuencia del péptido unido a su proteína de fusión.

Mediante Cromatografía de Afinidad a quitina se logró separar los péptidos de sus respectivas proteínas de fusión y luego purificarlos. A partir del análisis por espectrometría de masa se concluye que fue posible aislar los péptidos p53p-Ant y PNC-27.

Entre las 3 variantes expresadas, la biosíntesis del péptido p53p-Ant consiguió el mayor rendimiento, obteniéndose 1,18 mg de péptido por litro de cultivo. Se estimó los factores de eficiencia de las principales etapas del proceso. De acuerdo con esto se determinó que los niveles de productividad dependen esencialmente de la productividad de proteína recombinante soluble y de la eficiencia asociada a la proteólisis. Se determinó que el vector de expresión pTYB11 permite la producción de ambos péptidos con una pureza cercana al 95%, lo que es aceptable para ensayos biológicos. Sin embargo, el nivel de pureza del péptido generado a partir del vector pTXB1 es menor que el requerido para este tipo de aplicaciones.

Así, el diseño de las construcciones que incluyen el vector pTYB11 del sistema IMPACT permite la producción recombinante de péptidos de penetración celular en *E. coli*, mediante un proceso efectivo de purificación de péptidos que utiliza un único paso cromatográfico..

## 6. Bibliografía

1. ADESSI, C., SOTO C., 2002. Converting a peptide into a drug: Strategies to improve stability and bioavailability. *Current Medicinal Chemistry*. vol. 9: 963.
2. LIEN, S., LOWMAN, H. 2003. Therapeutic peptides. *Trends in Biotechnology*. vol. 21: 556-562.
3. JIMÉNEZ, J., GIRALT, E., ALBERICIO, F. 2004. Péptidos y la industria farmacéutica. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*. vol. 2: 10.
4. TRANSPARENCY MARKET RESEARCH. Peptide Therapeutics Market - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends and Forecast, 2012 – 2018. [en línea] Albany, New York, USA. <<http://www.transparencymarketresearch.com/peptide-therapeutics-market.html>> [consulta: 13 marzo 2013]
5. REICHERT J., Peptide Therapeutics Foundation. [en línea] Developments Trends for Peptide Therapeutics. 2010 Report Summary <[http://www.peptidetherapeutics.org/PTF\\_report\\_summary\\_2010.pdf](http://www.peptidetherapeutics.org/PTF_report_summary_2010.pdf)> [consulta: 5 de octubre 2011]
6. JOLIOT, A., PROCHIANTZ, A. 2004. Transduction peptides: from technology to physiology. *Nature Cell Biology*. vol 6 (3): 189-195
7. HAMAN, M. T., SHEUER, P. 2001. Kahalalide F: a bioactive depsipeptide from the sacoglossan mollusk *Elysia rufescens* and the green alga *Bryopsis* sp. vol. 123: 11198-11201.
8. GASTROENTEROLOGÍA ONCOLÓGICA, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción. Carcinogénesis. [en línea] <<http://www2.udec.cl/~oncogastro/main.php?page=13>> [consulta: 11 noviembre 2010].
9. INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS (INE), Estadísticas Vitales Informe Anual 2010 [en línea] <[http://www.ine.cl/canales/chile\\_estadistico/demografia\\_y\\_vitales/estadisticas\\_vitales/pdf/vitales\\_2010.pdf](http://www.ine.cl/canales/chile_estadistico/demografia_y_vitales/estadisticas_vitales/pdf/vitales_2010.pdf)> [consulta: 15 marzo 2011].
10. INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS (INE), Estadísticas Vitales Informe Anual 2006 [en línea] <[http://www.ine.cl/canales/chile\\_estadistico/demografia\\_y\\_vitales/estadisticas\\_vitales/pdf/anales/vitales\\_completa\\_2006.pdf](http://www.ine.cl/canales/chile_estadistico/demografia_y_vitales/estadisticas_vitales/pdf/anales/vitales_completa_2006.pdf)> [consulta: 15 marzo 2011].
11. INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS (INE), Estadísticas Vitales Informe Anual 2007 [en línea]



- <[http://www.ine.cl/canales/chile\\_estadistico/demografia\\_y\\_vitales/estadisticas\\_vitales/2010/04\\_01\\_10/vitales2007.pdf](http://www.ine.cl/canales/chile_estadistico/demografia_y_vitales/estadisticas_vitales/2010/04_01_10/vitales2007.pdf)> [consulta: 15 marzo 2011].
12. INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS (INE), Estadísticas Vitales Informe Anual 2008 [en línea]  
<[http://www.ine.cl/canales/menu/publicaciones/calendario\\_de\\_publicaciones/pdf/21\\_12\\_10/vit\\_08211210.pdf](http://www.ine.cl/canales/menu/publicaciones/calendario_de_publicaciones/pdf/21_12_10/vit_08211210.pdf)> [consulta: 15 marzo 2011].
  13. INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS (INE), Estadísticas Vitales Informe Anual 2009 [en línea]  
<[http://www.ine.cl/canales/chile\\_estadistico/demografia\\_y\\_vitales/estadisticas\\_vitales/2011/Vitales\\_2009\\_21102011.pdf](http://www.ine.cl/canales/chile_estadistico/demografia_y_vitales/estadisticas_vitales/2011/Vitales_2009_21102011.pdf)> [consulta: 15 marzo 2011]
  14. MINISTERIO DE SALUD, Panorama de Salud 2011 Informe sobre Chile y comparación con países miembros [en línea] <<http://www.eligevivirsano.cl/wp-content/uploads/2012/01/Panorama-de-la-Salud-2011.pdf>> [consulta: 13 agosto 2011]
  15. VALENZUELA, K., ESPINOZA, M. 2012. Oxidative stress, solar radiation skin carcinogenesis and chemoprotection with polyphenols. vol. 27(8): 446-452.
  16. VOLLMANYA LLENA F.R. ET AL. 2006. Expresión inmunohistoquímica de p53, p21, p16 y Ciclina D1 en el cáncer de vejiga superficial. *Actas Urológicas Españolas*, 30(8): 543-550.
  17. MENDOZA C., CERBÓN, M. 2001. El gen supresor de tumores p53: mecanismos de acción en la proliferación y muerte celular. *Revista de Investigación Clínica del Hospital de Enfermedades de la Nutrición*. 53(3):266-273.
  18. BODE A. M., DONG Z. 2004. post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer*. vol. 4 (10): 793-805.
  19. ROA J.C. y colaboradores. 2006. Gen supresor de tumores p53 en neoplasias digestivas. *Revista médica de Chile*, 128(11): 1269-1278.
  20. BEN-ELIYAHU S., YIRMIYA R., LIEBESKIND J.C. 1991. Stress increases metastatic spread of a mammary tumor in rats: Evidence for mediation by the immune system. vol. 5(2): 193-205.
  21. LANE D. P., BENCHIMOL S. 1990. p53: oncogene or anti-oncogene? *Genes & Development*. vol. 4: 1-8.
  22. SENATUS P., YIN LI., MANDIGO C. 2006. 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*. 5(1): 20-28.

23. SELIVANOVA G., IOTSOVA V., OKAN I. 1997. Restoration of the growth suppression function of mutant p53 by a synthetic peptide derived from the p53 C-terminal domain. *Nature Medicine*. 3(6): 632-638.
24. YIN LI., MAO Y., ROSAL R., DINNEN R. 2005. 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*. (115): 55-64.
25. BRANDT-RAUF P. W., ROSAL R. 2004. Computational protein chemistry of p53 and p53 peptides. *Frontiers in Bioscience*. vol. 9: 2778-2787.
26. DINNEN R. D., FINE R. 2007. Activation of targeted necrosis by a p53 peptide - A novel death pathway that circumvents apoptotic resistance. *The Journal of Biological Chemistry*. 282(37): 26675- 26686.
27. DÖMLING A. y colaboradores. 2008. Small molecular weight protein-protein interaction antagonists - an insurmountable challenge? *Current Opinion in Chemical Biology*. vol. 12: 289-291.
28. FLORES, C., SOBREVIA, L. 2000. Tumorigénesis y proteína mdm2. *Revista médica de Chile* 128(5):539-46.
29. KANOVSKY, M. y colaboradores. 2001. Peptides from the amino terminal mdm-2-binding domain of p53, designed from conformational analysis are selectively cytotoxic to transformed cells. *PNAS*. 98(22): 12438-12443.
30. DO T. y colaboradores. 2003. Preferential induction of necrosis in human breast cancer cells by a p53 peptide derived from the MDM2 binding site. *Nature Medicine*. (22): 1431-1444.
31. SARAFRAZ-YAZDI E., BOWNE W. 2010. Anticancer peptide PNC-27 adopts an HDM-2-binding conformation and kills cancer cells by binding to HDM-2 in their membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. vol. 107(5): 1918-1923.
32. BANEYX, F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*. vol. 10: 411-421.
33. NOVAGEN, pET System Manual, (2003) 1-50.
34. ASENJO, J. 1990. Separation processes in Biotechnology, Marcel Dekker. USA. 801 p.
35. CHONG, S. y colaboradores. 1998. Modulation of protein splicing of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar membrane ATPase intein. *Journal of Biological Chemistry*. vol. 273: 10567-10577.
36. NEW ENGLAND BIOLABS. 2008. IMPACT Kit – Protein Purification System Featuring Fusion to C- or N- Terminus of the Target Protein. Version 1.1. Upton, New York, USA. 3p.

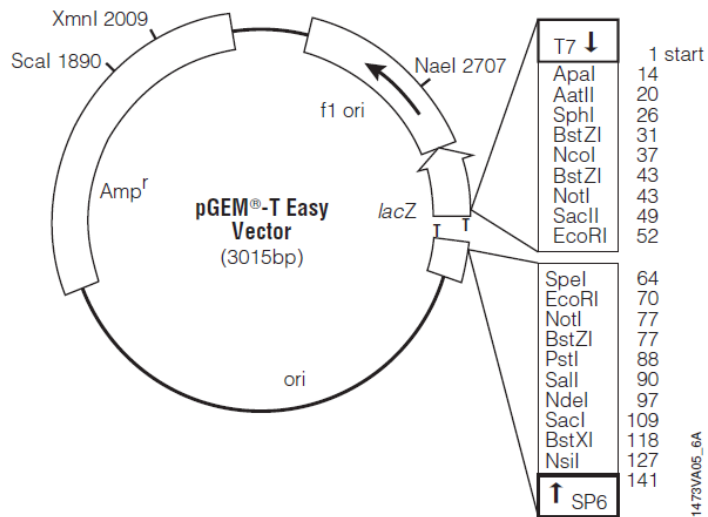
37. EVANS, T.C. y colaboradores. 1998. Semisynthesis of cytotoxic proteins using a modified protein splicing element. *Protein Sciences*. vol 7: 2256-2264.
38. SOUTHWORTH, M. W. y colaboradores. 1999. *BioTechniques*. vol 27: 110-120.
39. CHONG, S. y colaboradores. 1998. Utilizing the Cterminal cleavage activity of a protein splicing element to purify recombinant proteins in a single chromatographic step. *Nucleic Acids Research*. vol 26: 5109-5115.
40. DUBENDORFF, J. W., STUDIER, F. W. 1991. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *Journal of Molecular Biology*. vol.219: 45-59.
41. MORASSUTTI, C., DE AMICIS, F., BANDIERA, A. 2005 Expression of SMAP-29 cathelicidin-like peptide in bacterial cells by intein-mediated system. *Protein Expression & Purification*. vol. 39: 160-168.
42. Manual para QIAEX II Gel Extraction Kit. Pp. 12-13  
<[http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/PDF/DNACleanupAndConcentraDNAC/QIAEX\\_II/1011033\\_qiaexii.pdf](http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/PDF/DNACleanupAndConcentraDNAC/QIAEX_II/1011033_qiaexii.pdf)> [Consulta: abril de 2011].
43. BOLLAG, D.M., EDELSTEIN, S.J., 1996. *Protein Methods*, John Wiley and Sons.
44. BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*. vol. 72, 248-54
45. BELL, L.N. 2008, Peptide Stability in Solids and Solutions. *Biotechnology Progress*. vol. 13(4), 342-346.
46. TESTA, B. and MAYER J.M., *Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism: Chemistry, Biochemistry, and Enzymology*. Wiley-VCH. 2003.
47. RODRÍGUEZ V., Diseño de un sistema de producción recombinante de péptidos con potencial terapéutico. Tesis (Doctor en Ciencias de la Ingeniería, Mención Ingeniería Química y Biotecnología). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, 2013.
48. EVANS, T.C. Jr., BENNER, J., and Xu, M.-Q. 1999. The cyclization and polymerization of bacterially-expressed proteins using modified self-splicing inteins. *J. Biol. Chem*. vol. 274, 18359-18363.
49. Lv, G.S., G.C. Huo, and X.Y. Fu. 2003. Expression of milk-derived antihypertensive peptide in *Escherichia coli*. *J Dairy Sci*. vol. 86(6): 1927-31.
50. Kim AL, Raffo AJ, Brandt-Rauf PW, Pincus MR, Monaco R, Abarzua P, Fine RL. 1999. Conformational and molecular basis for induction of apoptosis by a p53 C-terminal peptide in human cancer cells. *J Biol Chem*. 274:34924-34931.

51. PROMEGA. 2009. pGEM-T and pGEM-T Easy vector System. Part#TM042. Madison, WI, USA.

## 7. Anexos

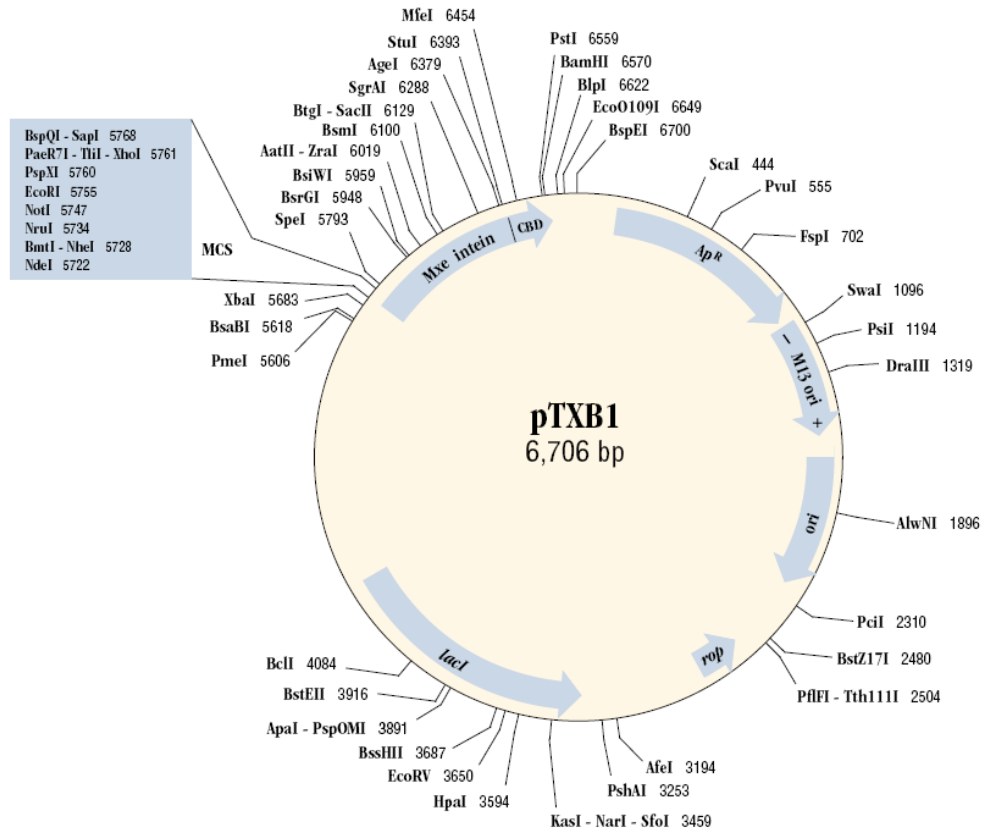
### 7.1. Mapa de restricción de vectores de clonamiento y expresión

En la Figura 21 se muestra un esquema del vector de clonamiento pGEM-T Easy y sus principales puntos de referencia.



**Figura 21.** Vector pGEM-T Easy. F1 ori: origen de replicación de ADN de hebra simple derivado del bacteriófago F1. Amp<sup>r</sup>: gen de resistencia a ampicilina; T7: promotor para T7 polimerasa; lacZ, región codificante para la β-galactosidasa interrumpida por el sitio de clonamiento. A la derecha, el recuadro indica los sitios de restricción disponibles en el sitio de clonamiento múltiple [51].

En las Figuras 22 y 23 se presentan esquemas de los vectores pTXB1 y pTYB11 respectivamente, y sus principales puntos de referencia.



**Figura 22.** Vector pTXB1. M13 ori: origen de replicación derivado del bacteriófago M13; ori: origen de replicación bacteriano derivado de pMB1; *LacI*: gen que codifica el represor *lac*; Mxe intein-CBD: secuencia codificante para la mini-Inteína unida a CBD. A la izquierda, el recuadro indica los sitios de restricción disponibles en el sitio de clonamiento múltiple. *New England Biolabs* [36].

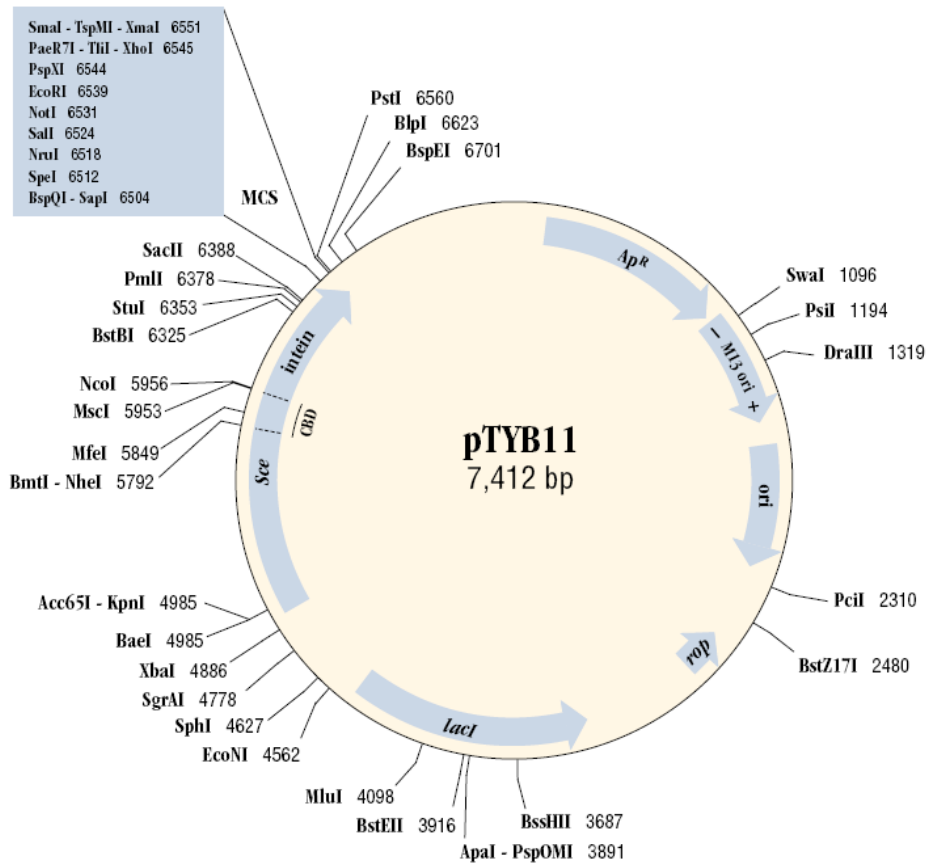


Figura 23. Vector pTYB11. M13 ori: origen de replicación derivado del bacteriófago M13; ori: origen de replicación bacteriano derivado de pMB1; *LacI*: gen que codifica el represor *lac*; CBD-intein: secuencia codificante para CBD unido a la mini-Inteína. A la izquierda, el recuadro indica los sitios de restricción disponibles en el sitio de clonamiento múltiple. *New England Biolabs* [36].

## 7.2. Secuencia nucleotídica y peptídica de fragmentos

La secuencia de la región codificante del gen *p53p-Ant* inicial es la siguiente:

```
GGC AGC CGC GCC CAT AGC AGT CAT CTG AAG AGC AAA AAG GGT CAG AGT
-G---S---R---A---H---S---S---H---L---K---S---K---K---G---Q---S-
ACC AGC CGT CAC AAG AAA TGG AAA ATG CGC CGT AAC CAG TTC TGG GTG
-T---S---R---H---K---K---W---K---M---R---R---N---Q---F---W---V-
AAA GTT CAA CGC GGT
-K---V---Q---R---G-
```

El segmento subrayado corresponde al sitio de restricción de la enzima SapI, que se utilizó en la manipulación genética, por lo que el codón AAG fue mutado por AAA, sin variar así la secuencia peptídica.

La secuencia de trabajo definitiva es la siguiente:

```
GGC AGC CGC GCC CAT AGC AGT CAT CTG AAA AGC AAA AAG GGT CAG AGT
-G---S---R---A---H---S---S---H---L---K---S---K---K---G---Q---S-
ACC AGC CGT CAC AAG AAA TGG AAA ATG CGC CGT AAC CAG TTC TGG GTG
-T---S---R---H---K---K---W---K---M---R---R---N---Q---F---W---V-
AAA GTT CAA CGC GGT
-K---V---Q---R---G-
```

La secuencia de la región codificante del gen *PNC-27* inicial es la siguiente:

```
CCG CCG CTG AGC CAG GAA ACC TTC TCT GAT CTG TGG AAA CTG CTG AAG
-P---P---L---S---Q---E---T---F---S---D---L---W---K---L---L---K-
AAA TGG AAA ATG CGC CGT AAC CAG TTC TGG GTG AAA GTT CAA CGC GGT
-K---W---K---M---R---R---N---Q---F---W---V---K---V---Q---R---G-
```

La síntesis por PCR del fragmento *PNCpTY* supone la adición de un codón de Glicina (G) a la región codificante, por lo que para ese caso la secuencia sería así:

GGC CCG CCG CTG AGC CAG GAA ACC TTC TCT GAT CTG TGG AAA CTG CTG  
-G--P--P--L--S--Q--E--T--F--S--D--L--W--K--L--L-

AAG AAA TGG AAA ATG CGC CGT AAC CAG TTC TGG GTG AAA GTT CAA CGC  
-K--K--W--K--M--R--R--N--Q--F--W--V--K--V--Q--R-  
GGT  
-G-



### 7.3. Diseño de oligonucleótidos

Tabla 10. Denominación de partidores diseñados

Denominación	Significado
pTXp53pS	Partidor con sentido <i>sense</i> que agrega sitios de restricción al gen <i>p53p-Ant</i> para clonarlo en el vector de expresión pTXB1
pTXPNCS	Partidor con sentido <i>sense</i> que agrega sitios de restricción al gen <i>PNC-27</i> para clonarlo en el vector de expresión pTXB1
pTXReverse	Partidor con sentido <i>reverse</i> que agrega sitios de restricción a cualquiera de los dos genes para clonarlo en el vector de expresión pTXB1
pTYp53pS	Partidor con sentido <i>sense</i> que agrega sitios de restricción al gen <i>p53p-Ant</i> para clonarlo en el vector de expresión pTYB11
pTYPNCS	Partidor con sentido <i>sense</i> que agrega sitios de restricción al gen <i>PNC-27</i> para clonarlo en el vector de expresión pTYB11
pTYReverseI	Partidor con sentido <i>reverse</i> que agrega sitios de restricción al gen <i>p53p-Ant</i> para clonarlo en el vector de expresión pTYB11
pTYReverseII	Partidor con sentido <i>reverse</i> que agrega sitios de restricción al gen <i>PNC-27</i> para clonarlo en el vector de expresión pTYB11
Mutp53pSense	Partidor con sentido <i>sense</i> que muta el gen <i>p53p-Ant</i>
Mutp53pReverse	Partidor con sentido <i>reverse</i> que muta el gen <i>p53p-Ant</i>

### 7.3.1. pTXp53pS

Secuencia:

5' -CAT ATG GGC AGC CGC GCC CAT-3'

Alineamiento:

5' -CAT ATG GGC AGC CGC GCC CAT-3' → Partidor  
 ||| ||| ||| ||| |||  
 3' -GTATAC CCG TCG GCG CGG GTA TCG-5' ADN molde

Largo = 21

T<sub>m</sub> = 60,2 °C

S Sitio de restricción de NdeI

■ Codón de inicio

▼ Sitio de corte

→ Sentido de polimerización

Información adicional:

Minimum base pairs required for single primer self-dimerization: 5.  
 Minimum base pairs required for a hairpin: 4.

**Potential hairpin formation :**

5' CATATGGGCAGCCGCGCCCAT 3'

**3' Complementarity:**  
 None !

**All potential self-annealing sites are marked in red (allowing 1 mis-match):**

5' CATATGGGCAGCCGCGCCCAT	3'
3' TACCCGCGCCGACGGGTATAC	5'
5' CATATGGGCAGCCGCGCCCAT	3'
3' TACCCGCGCCGACGGGTATAC	5'
5' CATATGGGCAGCCGCGCCCAT	3'
3' TACCCGCGCCGACGGGTATAC	5'

Figura 24. Potenciales *hairpins* y alineamientos en sí mismo del partidor pTXp53pS (OligoCalc <<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>>)

### 7.3.2. pTXPNCS

Secuencia:

5' -CAT ATG CCG CCG CTG AGC CAG-3'

Alineamiento:

5' - <u>CAT</u> <span style="background-color: #90EE90;">ATG</span> CCG CCG CTG AGC CAG-3' →	Partidor
3' - <u>GTATAC</u> GGC GGC GAC TCG GTC CTT-5'	ADN molde

Largo = 21

T<sub>m</sub> = 60,2°C

S Sitio de restricción de NdeI

■ Codón de inicio

▼ Sitio de corte

→ Sentido de polimerización

Información adicional:

Minimum base pairs required for single primer self-dimerization: 5.  
Minimum base pairs required for a hairpin: 4.

**Potential hairpin formation :**

None !

**3' Complementarity:**

None !

**All potential self-annealing sites are marked in red (allowing 1 mis-match):**

None !

Figura 25. Potenciales *hairpins* y alineamientos en sí mismo del partidor pTXPNCS (OligoCalc <<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>>)

### 7.3.3. pTXReverse

Secuencia:

5' -GCTCTTC C GCA ACC GCG TTG AAC-3'

Alineamiento:

5' -AAA GTT CAA CGC GGT ▼ TGC G GAAGAGC-3'

ADN molde

||| ||| ||| |||

← 3' -CAA GTT GCG CCA ACG ▲ C CTTCTCG-5'

Partidor

Largo = 23

T<sub>m</sub> = 60,6°C

S Sitio de restricción de SapI

▼ Sitio de corte

← Sentido de polimerización

Información adicional:

```
Minimum base pairs required for single primer self-dimerization: 5.
Minimum base pairs required for a hairpin: 4.

Potential hairpin formation :

None !

3' Complementarity:
None !

All potential self-annealing sites are marked in red (allowing 1 mis-match):
None !
```

Figura 26. Potenciales *hairpins* y alineamientos en sí mismo del partidor pTXReverse (OligoCalc <<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoCalc.html>>)

### 7.3.4. pTYp53S

Secuencia:

5' -GCTCTTC C AAC GGC AGC CGC-3'

Alineamiento:

5' - <u>GCTCTTC</u> C▼AAC GGC AGC CGC-3'→	Partidor
3' -CGAGAAG G TTT▲CCG TCG GCG GTA-5'	ADN molde

Largo = 20

T<sub>m</sub> = 60°C

S Sitio de restricción de SapI

▼ Sitio de corte

→ Sentido de polimerización

Información adicional:

```
Minimum base pairs required for single primer self-dimerization: 5.
Minimum base pairs required for a hairpin: 4.

Potential hairpin formation :

None !

3' Complementarity:
None !

All potential self-annealing sites are marked in red (allowing 1 mis-match):

None !
```

Figura 27. Potenciales *hairpins* y alineamientos en sí mismo del partidor pTYp53S (OligoCalc <<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>>)

### 7.3.5. pTYPNCS

Secuencia:

5' -GCTCTTC C AAC GGT CCG CCG CTG AGC-3'

Alineamiento:

5' -GCTCTTC C▼AAC GGT CCG CCG CTG AGC-3' →  
  | | | | | | | |  
3' -CGAGAAG G TTG▲CCA GGC GGC GAC TCG-5'

Largo = 26

T<sub>m</sub> = 67,4°C

S Sitio de restricción de SapI

▼ Sitio de corte

→ Sentido de polimerización

■ Codón de Glicina

Información Adicional:



Figura 28. Potenciales *hairpins* y alineamientos en sí mismo del partidor pTYPNCS (OligoCalc <<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoCalc.html>>)

### 7.3.6. pTYReverseI

Secuencia:

5' -CTGCAG TTA ACC GCG TTG AAC TTT CAC-3'

Alineamiento:

5' -TGG GTG AAA GTT CAA CGC GGT TAA CTGCAG-3' ▼

ADN molde

||| ||| ||| ||| ||| |||

← 3' -CAC TTT CAA GTT GCG CCA ATT GACGTC-5' ▲

Partidor

Largo = 27

T<sub>m</sub> = 59,7°C

S Sitio de restricción de PstI

■ Codón de término

▼ Sitio de corte

← Sentido de polimerización

Información adicional:

Minimum base pairs required for single primer self-dimerization: 5.  
Minimum base pairs required for a hairpin: 4.

**Potential hairpin formation :**

5' CTGCAGTTAACC GCGTTGAAC TTT CAC 3'

**3' Complementarity:**  
None !

**All potential self-annealing sites are marked in red (allowing 1 mis-match):**

5' CTGCAGTTAACC GCGTTGAAC TTT CAC 3'	3'
3' CACTTTCAAGTTGCGCCAATTGACGTC	5'
5' CTGCAGTTAACC GCGTTGAAC TTT CAC 3'	3'
3' CACTTTCAAGTTGCGCCAATTGACGTC	5'
5' CTGCAGTTAACC GCGTTGAAC TTT CAC 3'	3'
3' CACTTTCAAGTTGCGCCAATTGACGTC	5'

Figura 29. Potenciales *hairpins* y alineamientos en sí mismo del partidor pTYReverseI (OligoCalc <<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>>)



### 7.3.7. pTYReverseII

Secuencia:

5'-CG CGG ACG CTG CAG **TTA** ACC GCG TTG AAC TTT-3'

Alineamiento:

5'-GTG AAA GTT CAA CGC GGT TAA CTG CAG CGT CCG CG-3'  
| | | | |  
← 3'-TTT CAA GTT GCG CCA **ATT** GAC GTC GCA GGC GC-5'

Largo = 32

T<sub>m</sub> = 67°C

S Sitio de restricción de PstI

■ Codón de término

▼ Sitio de corte

← Sentido de polimerización

Información adicional:



Figura 30. Potenciales *hairpins* y alineamientos en sí mismo del partidor pTYReverseII (OligoCalc <<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoCalc.html>>)

### 7.3.8. Mutp53pSense

Secuencia:

5' -GCC CAT AGC AGT CAT CTG AA**A** AGC AAA AAG GGT-3'

Alineamiento:

```
5' -GCC CAT AGC AGT CAT CTG AAA AGC AAA AAG GGT-3' → Primer
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| || ||| ||| ||| |||
3' -GCG CGG GTA TCG TCA GTA GAC TTC TCG TTT TTC CCA GTC-5' ADN molde
```

Largo = 33

T<sub>m</sub> = 63,2°C

■ Par de bases reemplazado

→ Sentido de polimerización

### 7.3.9. Mutp53pReverse

Secuencia:

5' - ACC CTT TTT GCT TT**T** CAG ATG ACT GCT ATG GGC-3'

Alineamiento:

```
5' -ACC CTT TTT GCT TTT CAG ATG ACT GCT ATG GGC-3' → Primer
      ||| ||| ||| ||| || ||| ||| ||| ||| ||| |||
3' -GAC TGG GAA AAA CGA GAA GTC TAC TGA CGA TAC CCG CGC-5' ADN molde
```

Largo = 33

T<sub>m</sub> = 63,2°C

■ Par de bases reemplazado

→ Sentido de polimerización

## 7.4. Reactivos y equipos

Tabla 11. Reactivos utilizados en el desarrollo experimental

Reactivo	Proveedor
Acrilamida: Bisacrilamida 29:1, DTT, Glicerol, TEMED, TRIS.	Winkler
Agar	Bacto
Agarosa	Genética y Tec. Ltda.
Ampicilina, SDS	CalBioQuem
Azul de Coomassie, Estándar de tamaño molecular de proteínas bajo rango, N,N'- dimetil-formamida.	Sigma
BSA, Enzimas de restricción SapI, NdeI, PstI, EcoRI, <i>Buffer</i> 1, 2, 3, 4 para enzimas de restricción, Resina <i>Chitin beads</i> , Vectores pTXB1, pTYB11.	New England Biolabs
Bromuro de etidio, Cloruro de sodio, EDTA, Triton X-100.	Merck
Carbenicilina, Elongase Enzime Mix, T4 DNA Ligasa.	Invitrogen
dNTP's, IPTG, X-GAL.	Fermentas
Estándar de tamaño molecular de ADN 100bp, Kit pGEM-T Easy, Kit Taq DNA Polimerasa.	Promega
Estándar de tamaño molecular preteñido de proteínas	ThermoScientific
Kit QIAEX II, Kit QIAprep Spin Miniprep	Qiagen
Medio Luria-Bertani	Difco

**Tabla 12.** Equipos utilizados en laboratorio

<b>Equipo</b>	<b>Proveedor</b>
Agitador orbital MaxQ 4000	Barnstead, Lab-Line, USA
Autoclave	Orthman, Chile
Balanza Analítica Ohaus Analytical Plus, Balanza Ohaus Precision Estándar.	Ohaus, USA
Cámara electroforética horizontal	Fermelo Biotec YL, Chile
Cámara electroforética vertical MiniProtean II	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Cámara fotográfica	Kodak EasyShare M340, China
Centrifuga Eppendorf 5804 R	Eppendorf, Alemania
Centrífuga Sorvall RC-6 plus	ThermoFisher Scientific, USA
Electroporador <i>Electroporator</i> 2510	Eppendorf, USA
Espectrofotómetro Genesys 6	Thermo Scientific, USA
Espectrofotómetro UV/visible ULtrospec 3000	Pharmacia Biotech, Inglaterra
Fuente de poder electroforesis	BRL 500, Bio-Rad Power Pac 1000, USA
Incubador	Shel Lab Shaking Incubator Sheldon Manufactury, USA
Microcentrífuga	BOECO M-24A, USA
Refrigerador -80°C	UltFreezer Haier, China
Sistema de purificación de agua Molli-Q	Millipore, USA
Sonicador Microsoon Ultrasonic Cell Disruptor	Misonix, USA
Termicilcador Mastercycler Gradient, Thermomixer Comfort	Eppendorf, Alemania
Transiluminador de geles de agarosa	Vilber Loumat, Francia

## 7.5. Protocolos

### 7.5.1. Electroforesis en gel de agarosa

Este protocolo se utilizó para analizar el tamaño de productos de PCR y de digestión plasmidial. Las muestras de ADN fueron mezcladas en proporción 5:1 con tampón de carga 6X (glicerol 30% p/v y azul de bromofenol 0,25% p/v) y posteriormente se cargaron en los respectivos carriles del gel de agarosa 1% o 2% p/v dependiendo del tamaño de los fragmentos esperados.

### 7.5.2. Transformación de bacterias electrocompetentes

Las mezclas de ligación se diluyeron 10 veces en agua estéril. Se agregó 1  $\mu\text{L}$  de esta dilución ligación a 20  $\mu\text{L}$  de bacterias electrocompetentes *E. coli*. Las condiciones del electroporador fueron: 410 V, 330  $\mu\text{F}$ , baja impedancia y tasa de carga rápida. Las bacterias transformadas se traspasaron a 1 mL de medio LB estéril y se incubaron a 37°C durante 1 h. Posteriormente se centrifugaron a 13.000 rpm durante 1 min y se descartaron 900  $\mu\text{L}$  del sobrenadante. El sedimento de células se resuspendió en el sobrenadante restante y se sembró sobre placas LB-Agar con Ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , o bien placas suplementadas con Ampicilina, X-Gal e IPTG. Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche, y posteriormente se mantuvieron a 4°C.

### 7.5.3. PCR de colonias transformadas

Este método se utilizó para corroborar la presencia de cada inserto en las colonias seleccionadas como clones positivos. Para cada construcción, se escogieron aquellas colonias blancas que lograron crecer en la placa. Las células se transfirieron mediante una punta estéril a una nueva placa LB-Agar/Amp/IPTG/X-Gal (o bien LB-Agar/Amp) numerada dejándose incubar a 37°C durante la noche, al mismo tiempo, el remanente de cada punta fue resuspendido en 30  $\mu\text{L}$  de agua estéril, incubándose a 100°C durante 10 min, luego se tomaron 5  $\mu\text{L}$  como templado y se agregaron sobre 15  $\mu\text{L}$  de mezcla de PCR. Para confirmar la presencia de inserto, se utilizaron los partidores correspondientes al fragmento clonado, utilizando el siguiente protocolo de PCR:

Para cada uno de los cuatro fragmentos clonados, se completaron mezclas de PCR de 20  $\mu\text{L}$ , las que contenían:

- 4  $\mu\text{L}$  de tampón 10X
- 1,6  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM
- 0,4  $\mu\text{L}$  de dNTP's 10 mM
- 1  $\mu\text{L}$  de partidor *sense* 10 mM
- 1  $\mu\text{L}$  de partidor *reverse* 10 mM

- 0,35  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerasa
- 5  $\mu\text{L}$  de ADN templado
- 6,65  $\mu\text{L}$  de agua estéril

El programa de temperaturas usado para la reacción de PCR con la enzima fue: 1 ciclo a 95°C por 2 min; 30 ciclos a 95°C por 1min, 55°C por 40 s, 72°C por 30 s, y finalmente 1 ciclo a 72°C por 5 min.

Luego, los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 2% p/v. Las colonias que mostraron presencia de inserto en el producto de PCR, se cultivaron en 4 mL de medio LB suplementado con Ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , incubándose toda la noche a 37°C y 200 rpm.

#### 7.5.4. Minipreparación de ADN plasmidial (QIAprep® Spin Miniprep)

Se inoculó una colonia en 4 mL de medio LB con antibiótico y se incubó a 37 °C durante la noche. Se centrifugó el cultivo de a 1 mL a la vez, descartando el sobrenadante (máx. 5 mL de cultivo) (1 minuto a 13000 rpm). Se resuspendió con la pipeta en 250  $\mu\text{L}$  de *Buffer* P1. Se agregó 250  $\mu\text{L}$  de *Buffer* P2, y se mezcló invirtiendo el tubo suavemente 4-6 veces evitando que esta reacción de lisis tardara más de 5 minutos. Se agregó 350  $\mu\text{L}$  de *Buffer* N3 y se invirtió inmediatamente el tubo en forma suave para mezclar. Se centrifugó 10 minutos a 13000 rpm.

Se recuperó el sobrenadante y se depositó en una columna de *spin*. Se centrifugó 1minuto a 13000 rpm. Se descartó el líquido y se lavó el ADN de la columna de *spin* con 750  $\mu\text{L}$  de *Buffer* PE. Se centrifugó 1minuto a 13000 rpm. Se descartó el líquido y se centrifugó nuevamente durante 1minuto para remover los residuos de *buffer*. Se ubicó la columna en un tubo de 1.5 mL, se agregó 50  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O pH 8.5 (precalentada a 50 °C) en el centro. Se dejó reposar 1 minuto y se centrifugó 1 minuto a 13000 rpm.

#### 7.5.5. Concentración de péptidos mediante tubos Centricon YM-3 (Millipore)

Los tubos fueron previamente centrifugados con 100 mL de Tween 20 0,1% a 6500 rpm por 30 minutos. Luego se cargaron las muestras y se centrifugó a 6500 rpm y 4 °C durante 2 h. Se descartó el filtrado y se recuperó los péptidos concentrados con el colector centrifugando a 3000 rpm y 4 °C durante 5 min. Para determinar la concentración proteica se midió mediante el método de Bradford (Sección 3.2.7) antes y después de concentrar.

#### 7.5.6. Precipitación de péptidos con Acetona

Las muestras de los péptidos eluidos en la cromatografía y aquellos concentrados en tubos Centricón fueron precipitados agregando 5 volúmenes de acetona 100% por cada muestra. Luego los tubos se agitaron 30 s mediante Vortex y se incubaron toda la noche a -20 °C. Cada muestra fue centrifugada a 13000 rpm y 0 °C durante 15 min. Se descartó el sobrenadante para lavar con 2 volúmenes de acetona 100% cada muestra, se agitó nuevamente con Vortex y se incubó durante 1 h a -20°C. Las muestras se

centrifugaron a 13000 rpm y 0 °C durante 15 min. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente durante 30 min. El precipitado fue almacenado a 4 °C

## 7.6. Secuenciación de clones positivos en pGEM-T Easy

A continuación se presentan las secuencias nucleotídicas (5' → 3') de los 7 clones positivos en el vector pGEM-T Easy. En rojo se destacan los segmentos codificantes deseados:

### 7.6.1. pGEM/p53pTX

```
TNNAGNNNTTGGATTGTTNTTCTACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCG
ACGTCGCATGCTCCCGGCCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTCATAT
GGGCAGCCGCGCCCATAGCAGTCATCTGAAAAGCAAAAAGGGTCAGAGTA
CCAGCCGTACAAGAAATGGAAATGCGCCGTACCAGTTCTGGGTGAAA
GTTCAACGCGGTTGCGGAAGAGCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTG
CAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAG
TATTCATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGT
TTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCC
GGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCATAATGAGTGAGCTAACTCAC
ATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTTCGT
GCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCT
ATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGT
TCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTAT
CCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAG
CAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGCGGTTTTTCCATAG
GCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAGAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTG
GCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGNAAGCT
CCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACTCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCC
GCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAT
```

### 7.6.2. pGEM/p53pTY

```
NNNNNCCNNNNNNTNATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCGAC
GTCCAGCTCCCGGCCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTCTGCAGTTA
ACCGCGTTGAACCTTCCACCAGAACTGGTTACGGCGCATTTTCCATTTCT
TGTGACGGCTGGTACTCTGACCCTTTTTGCTTTTCAGATGACTGCTATGG
GCCGCGCTGCCGTTGGAAGAGCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTG
AGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGT
ATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTT
TCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCCG
GAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCATAATGAGTGAGCTAACTACA
TTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTTCGTG
CCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTA
TTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTT
CGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATC
CACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGC
AAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGCGGTTTTTCCATAGG
CTCCGCCCCCTGACGAGCATCAGAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTG
GCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCT
CCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCC
GCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTA
GGTATCTCAGTTCCGGGTGAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCA
CGAACCCCGGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATCGTC
TTGAGTCCAACCCGGTAAGACAGCACTTATCCGG
```



### 7.6.3. pGEM/PNC<sub>p</sub>TX

NNNNNTTACGGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCGACGTCGCATG  
CTCCGGCCGCCATGGCGCCGCGGGAATTCGATTGCTCTTCCGCAACCG  
CGTTGAACCTTTCACCCAGAACTGGTTACGGCGCATTTTCCATTTCTTCAG  
CAGTTTCCACAGATCAGAGAAGGTTTCTGGCTCAGCGCGGCATATGAA  
TCACTAGTGAATTCGCGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCC  
CAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATCTATAGTGTACCTAAATAGC  
TTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATGTTATCCGCT  
CACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGG  
GTGCCAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCC  
GCTTTCAGTCGGAAACCTGTCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCA  
ACGCGCGGGAGAGGCGGTTTGCATATGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCG  
TCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCT  
CACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCGAG  
AAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGG  
CCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAC  
AAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAG  
ATACCAGGCGTTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGA  
CCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTG  
GCCTTTTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTT

### 7.6.4. pGEM/PNC<sub>p</sub>TY

GCGAGCGGGATGTATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCGACGTC  
GCATGCTCCCGCCGCCATGGCGCCGCGGGAATTCGATTGCGGACGCT  
GCAGTTAACCGCGTTGAACTTTCACCCAGAACTGGTTACGGCGCATTTTC  
CATTCTTCAGCAGTTTCCACAGATCAGAGAAGGTTTCTGGCTCAGCGG  
CGGACCGTTGGAAGAGCAATCACTAGTGAATTCGCGCCGCGCTGCAGGTC  
GACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATCT  
ATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCCTG  
TGTGAAATGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGC  
ATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAAT  
TGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCTGCCAGC  
TGCAATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGCGGTTTGCATATGGG  
CGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGCT  
GCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAG  
AATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAG  
GCCAGGAACCGTAAAAAGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCG  
CCCCCTGACGAGCATCAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAA  
ACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCTGGAAGCTCCCTC  
GTGCGCTCTCCTGTTCCGACCTGCGGCTTACCGGATACCTGTCCGCTT  
TCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCATAGCTCACGCTGTAGGTATC  
TCAGTTCCG

## 7.7. Secuenciación de clones positivos en pTXB1 y pTYB11

A continuación se presentan las secuencias nucleotídicas (5' → 3') de los 7 clones positivos en el vector pGEM-T Easy. En rojo se destacan los segmentos codificantes de los péptidos deseados:

### 7.7.1. pTXB1/p53pTX

```
NNNNNGNGNNAANNNTCCNTCTAGAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAG
GAGATATACATATGGGCAGCCGGCCCATAGCAGTCACTGAAAAGCAAA
AAGGGTCAGAGTACCAGCCGTCACAAGAAATGGAAAATGCGCCGTAACCA
GTTCTGGGTGAAAGTTCAACGCGGTGTCATCACGGGAGATGCACTAGTTG
CCCTACCCGAGGGCGAGTCGGTACGCATCGCCGACATCGTCCGGGTGCG
CGGCCAACAGTGACAACGCCATCGACGTGAAAGTCCCTGACCGGCATGG
CAATCCCGTGTCTCGCCGACCGGCTGTTCCACTCCGGCGAGCATCCGGTGT
ACACGGTTCGTCACGGTTCGAAGTCTGCGTGTGACGGGCACCGGAACCAC
CCGTTGTTGTTGTTGGTTCGACGTCGCCGGGTGCCGACCTGCTGTGGAA
GCTGATCGACGAAATCAAGCCGGCGGATACCGGGTGATTCACGCAGCG
CATTCAGCGTTCGACTGTGCAGTTTGGCCCGGGAAACCCGAATTTGCG
CCACAACTTACACAGTTCGGCTCCCTGGACTGGTGGCTTCTTGGAAGC
ACACCACCGAGACCCGGACGCCAAGCTATCGCCGACGAGTACCGGACG
GGCGGTTCTACTACGCGAAAGTCCGCGTGTACCGGACCGCGCGTGCAG
CCGGTGTATAGCCTTCGTGTGACACGGCAGACCACCGGTTTATCACGAA
CCGGTTCGTCAGCCACGCTACTGTCCTACCGGTCGAACTCAGGCCTCA
CGACAAATCCTGGTGTATCCGCTTGGCAGGTCAACACAGCTTATACTGCG
GGACAATTTGGTACATATAACGGCAAGACGTATAAATGTTTGACGCCCA
CACCTCCTTGGCAGGATGGGAACCATCAACGTTTCCCTGCTTGTGGCAGC
TTCAATGACTGCAGGAAGGGGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGAG
CTGAGTTGGCTGCTGCACGCTGAGCATACTAGCATAACCCCTNNGGCNCTA
ACGGGTCTTGAGGTTTTTGCTGAAAGGAGGACTATATCCGGATACTAGC
TCAGGTGGCANN
```

### 7.7.2. pTYB11/p53pTY

```
NNGNCTNNGNNAATATTCGAGTTCAGATTGAAGGAGACGATTATTATGGGA
TTACTTTATCTGATGATTCTGATCATCAGTTTTTGTCTGGATCCAGGTT
GTTGTACAGAACGGCAGCCGGCCCATAGCAGTCACTGAAAAGCAAAA
GGGTTCAGAGTACCAGCCGTCACAAGAAATGGAAAATGCGCCGTAACCA
GTTCTGGGTGAAAGTTCAACGCGGTAACTGCAGGAAGGGGATCCGGCTGCT
AACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATA
ACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGC
TGAAAGGAGGAACATATCCGGATATCCCGCAAGAGGCCGGCAGTACCG
GCATAACCAAGCCTATGCCTACAGCATCCAGGGTGACGGTGCCGAGGATG
ACGATGAGCGCATTTGTTAGATTTTATACACGGTGCCTGACTGCGTTAGCA
ATTTAACTGTGATAAACTACCGCATTAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTT
TACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAACCTAAATCGCCTT
GCAGCACATCCCCCTTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCAC
CGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCAGCTTG
GCTGTTTTGGCGGATGAGATAAGATTTTCAGCCTGATACAGATTAAATCA
GAACGCAGAAGCGGTCTGATAAAACAGAATTTGCTGGCGGCAGTAGCGC
GGTGGTCCACCTGACCCATGCCGAATCAGAAGTGAACCGCGTAGCG
CCGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCATGCGAGAGTAGGGAATGCCAGGCA
TCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTTCGAAGACTGGGCCTTTCGTTTATCTGT
TGTTTGTGCGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCCGGGGAGCGG
AATTTGAACGTTGCGAGNA
```

### 7.7.3. pTXB1/PNCpTX

NNNNNCNNNNATTCCNTCTAGAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGA  
TATACATATG**CCGCCGCTGAGCCAGGAAACCTTCTCTGATCTGTGGAAAC**  
**TGCTGAAGAAATGGAAAATGCGCCGTAACCAAGTTCTGGGTGAAAGTTCAA**  
**CGCGGT**TGCATCACGGGAGATGCACTAGTTGCCCTACCCGAGGGCGAGTC  
GGTACGCATCGCCGACATCGTGCCGGGTGCGCGGCCAACAGTGACAACG  
CCATCGACCTGAAAGTCCTTGACCGGCATGGCAATCCCGTGCTCGCCGAC  
CGGCTGTTCCACTCCGGCGAGCATCCGGTGATACACGGTGCGTACGGTCTGA  
AGGTCTGCGTGTGACGGGCACCGCAACCACCCGTTGTTGTGTTTGGTTCG  
ACGTTCGCCGGGTGCGCACCTGCTGTGGAAGCTGATCGACGAAATCAAG  
CCGGGCGATTACGCGGTGATTCAACGCAGCGCATTAGCGTCTGACTGTGC  
AGGTTTTGCCCGGGAAACCCGAATTTGCGCCCAACAACCTACACAGTCG  
GCGTCCCTGGACTGGTGCCTTTCTTGAAGCACACCACCGAGACCCGGAC  
GCCAAGCTATCGCCGACGAGCTGACCGACGGGCGGTTCTACTACGCGAA  
AGTCGCCAGTGTACCGACGCGCGGTGCAGCCGGTGTATAGCCTTCGTG  
TCGACACGGCAGACCACGCGTTTATCAGCAACGGGTTCTGTCAGCCACGCT  
ACTGGCCTCACCGGTCTGAACTCAGGCTCACGACAAATCCTGGTGTATC  
CGCTTGGCAGGTCAACACAGCTTATACTGCGGACAAATGGTACATATA  
ACGGCAAGACGTATAAATGTTTGCAGCCCCACCTCCTTGGCAGGATGG  
GAACCATCCAACGTTCCCTGCCTTGTGGCAGCTTCAATGACTGCAGGAAAG  
GGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCA  
CCGCTGAGCAATAACTAGCATAAACCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTT  
GAA

### 7.7.4. pTYB11/PNCpTY

NNNNNCNNNNATTCCNTCTAGAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGA  
TATACATATG**GGCCCCGCTGAGCCAGGAAACCTTCTCTGATCTGTGGA**  
**AACGTGCTGAAGAAATGGAAAATGCGCCGTAACCAAGTTCTGGGTGAAAGTT**  
**CAACGCGGT**TGCATCACGGGAGATGCACTAGTTGCCCTACCCGAGGGCGA  
GTCGGTACGCATCGCCGACATCGTGCCGGGTGCGCGGCCAACAGTGACA  
CCATCGACCTGAAAGTCCTTGACCGGCATGGCAATCCCGTGCTCGCCGAC  
CGGCTGTTCCACTCCGGCGAGCATCCGGTGATACACGGTGCGTACGGTCTGA  
AGGTCTGCGTGTGACGGGCACCGCAACCACCCGTTGTTGTGTTTGGTTCG  
ACGTTCGCCGGGTGCGCACCTGCTGTGGAAGCTGATCGACGAAATCAAG  
CCGGGCGATTACGCGGTGATTCAACGCAGCGCATTAGCGTCTGACTGTGC  
AGGTTTTGCCCGGGAAACCCGAATTTGCGCCCAACAACCTACACAGTCG  
GCGTCCCTGGACTGGTGCCTTTCTTGAAGCACACCACCGAGACCCGGAC  
GCCAAGCTATCGCCGACGAGCTGACCGACGGGCGGTTCTACTACGCGAA  
AGTCGCCAGTGTACCGACGCGCGGTGCAGCCGGTGTATAGCCTTCGTG  
TCGACACGGCAGACCACGCGTTTATCAGCAACGGGTTCTGTCAGCCACGCT  
ACTGGCCTCACCGGTCTGAACTCAGGCTCACGACAAATCCTGGTGTATC  
CGCTTGGCAGGTCAACACAGCTTATACTGCGGACAAATGGTACATATA  
ACGGCAAGACGTATAAATGTTTGCAGCCCCACCTCCTTGGCAGGATGG  
GAACCATCCAACGTTCCCTGCCTTGTGGCAGCTTCAATGACTGCAGGAAAG  
GGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCA  
CCGCTGAGCAATAACTAGCATAAACCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTT  
GACCGACGG

## 7.8. Curva de calibración de Bradford

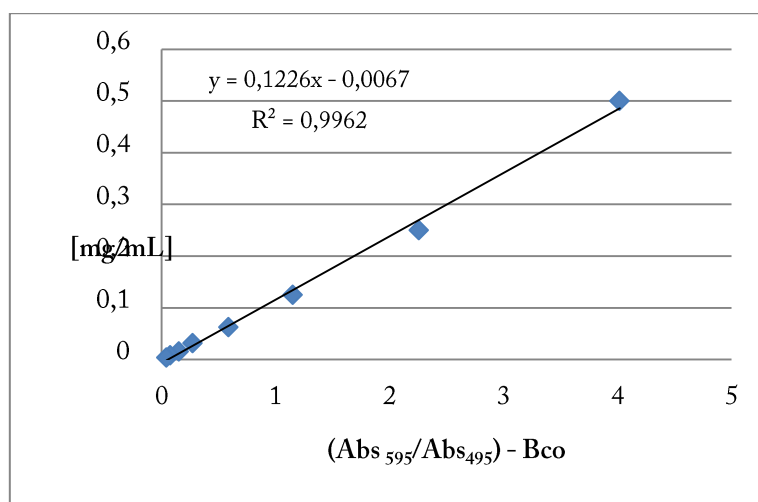


Figura 31. Curva de calibración de Bradford usando BSA como estándar. Se graficó la concentración de proteínas (mg/mL) versus la razón de absorbancia (595/465) menos el blanco, y se realizó una regresión lineal.

## 7.9. Cuantificación de fracciones celulares

Tabla 13. Cuantificación de proteínas obtenidas de los distintos sistemas de expresión y porcentaje de proteína recombinante presente en la fracción soluble.

Muestra	Fracción	Concentración [mg mL <sup>-1</sup> ]	Proteína recombinante* [%]
<i>PNCpTX</i>	Citoplasmática	3,31	
	Soluble	2,81	2,8
	Insoluble	0,63	
<i>PNCpTY</i>	Citoplasmática	3,53	
	Soluble	2,18	3,9
	Insoluble	1,03	
<i>p53pTY</i>	Citoplasmática	8,23	
	Soluble	4,60	4,3
	Insoluble	3,03	

\* Proteína de fusión + péptido