

Diálogo en bioeconomía:

La UNA al servicio del desarrollo nacional.

Uso de la biotecnología para el desarrollo de una bioeconomía avanzada: Caso de la obtención de nigrilisina, una toxina formadora de poros y su potencial para aplicaciones biomédicas



Dr. Javier Alvarado Mesén
Escuela de Ciencias Biológicas

LAS ANÉMONAS MARINAS SON UNA FUENTE PROMISORIA DE POLIPÉPTIDOS BIOACTIVOS

Inhibidores de proteasas (Delfín *et al.*, 1994 y 1996; González *et al.*, 2013).

Neurotoxinas bloqueadoras de canales iónicos (Castañeda *et al.*, 1995; Oliveira *et al.*, 2004).

Fosfolipasas (Pazos *et al.*, 1996).

Proteínas formadoras de poros “PFP” conocidas como actinoporinas (Lanio *et al.*, 2001; Kohno *et al.*, 2009; Alvarado-Mesén *et al.*, 2019).

Actinoporinas (Kem, 1988)

- Toxinas formadoras de poros en membranas producidas por anémonas de mar
- Masa molecular \approx 20 kDa
- $pI > 9$
- Alta afinidad por membranas que contienen esfingomielina
- Predomina la estructura β
- Tienen actividad permeabilizante en células y membranas modelos a concentraciones nM

- 31 actinoporinas han sido reportadas
- 25 secuencias se conocen
- 4 estructuras han sido resueltas



Stichodactyla helianthus

StI, StII

Macheño y col., 2003; Castrillo et al., 2009



Actinia equina

EqTII

Athanasiadis y col., 2001; Hinds et al., 2002

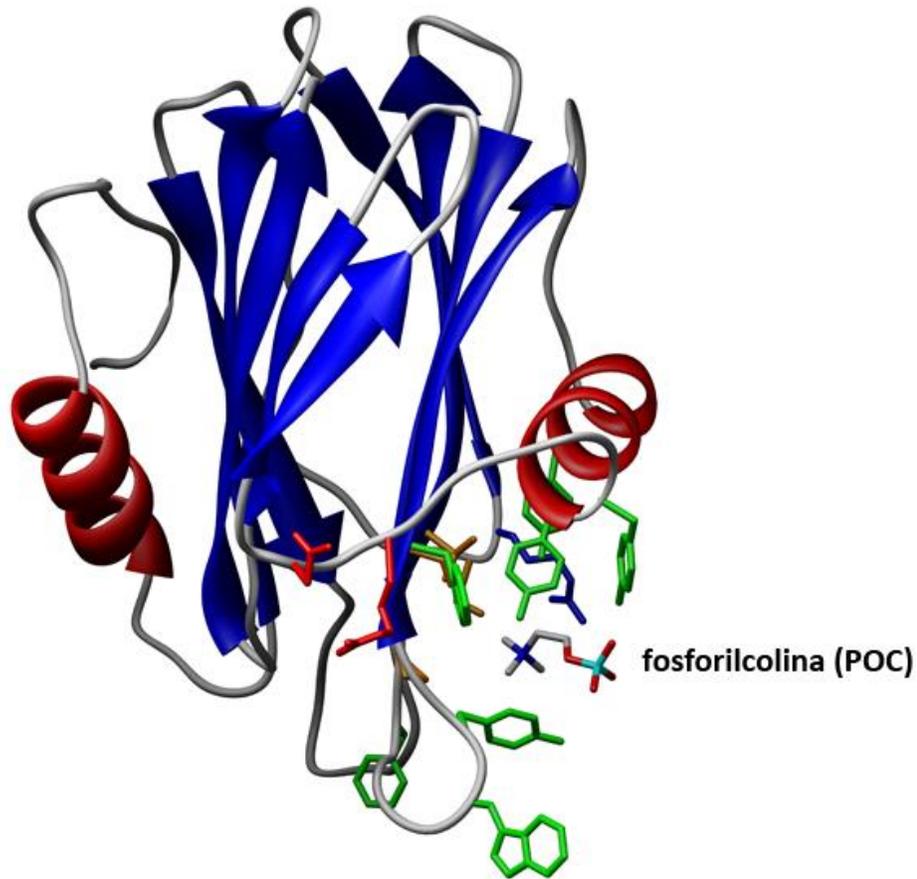


Actinia fragacea

FraC

Mechaly y col., 2011; Tanaka et al., 2015

Estructura 3D de las actinoporinas



1. Núcleo central de hojas- β intercaladas
2. Dos hélices α
3. Estructuras en forma de lazos
4. Sitio de unión interfacial (SUI)

Cristalografía con Difracción de Rayos X:

Eqt II *Athanasiadis y col. (2001)*

St II *Macheño y col. (2003)*

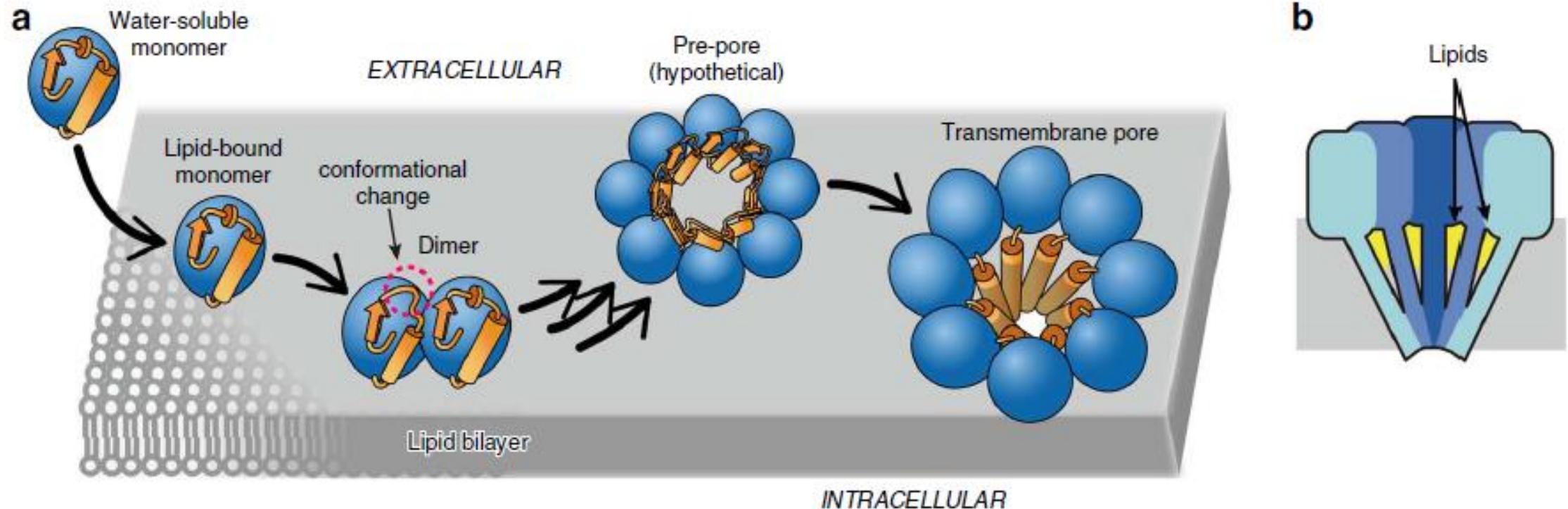
FraC *Mechaly y col. (2011)*
Tanaka y col. (2015)

Resonancia Magnética Nuclear (RMN):

Eqt II *Hinds y col. (2002)*

St I *Castrillo y col. (2009)*

Mecanismo de formación del poro de las actinoporinas



Tanaka *et al.*, 2015

First record of the sea anemone *Anthopleura nigrescens* (Cnidaria: Actiniaria: Actiniidae) on the Pacific coast of Central America

F.H. ACUÑA¹, J. ALVARADO², A. GARESE¹ AND J. CORTÉS^{3,4}

¹Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras, CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Funes 3250, 7600 Mar del Plata, Argentina, ²Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica, ³Centro de Investigación en Ciencias del Mar y Limnología (CIMAR), Ciudad de la Investigación, Universidad de Costa Rica, San Pedro, 11501-2060 San José, Costa Rica, ⁴Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, San Pedro, 11501-2060 San José, Costa Rica

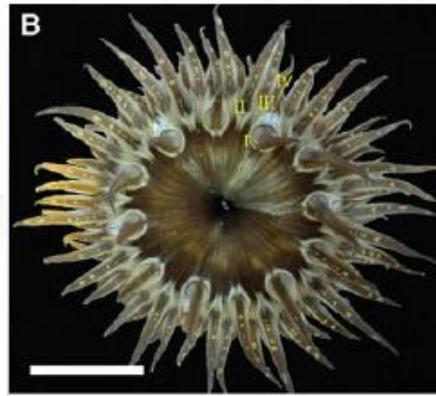
Biotecnología Aplicada 2014;31:53-56

Isolation and partial purification of a hemolytic sphingomyelin-inhibitable fraction from the sea anemone *Anthopleura nigrescens*

Javier Alvarado¹, Yeny Álvarez², Lohans Pedrera², Uris Ros², María E Lanio², Aisel Valle², ✉ Carlos Álvarez²

¹ Escuela de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional Apartado 86-300, Heredia, Costa Rica

² Centro de Estudio de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, UH Calle 25 No. 455 entre I y J, Vedado, CP 10400, La Habana, Cuba
✉ calvarez@fbio.uh.cu

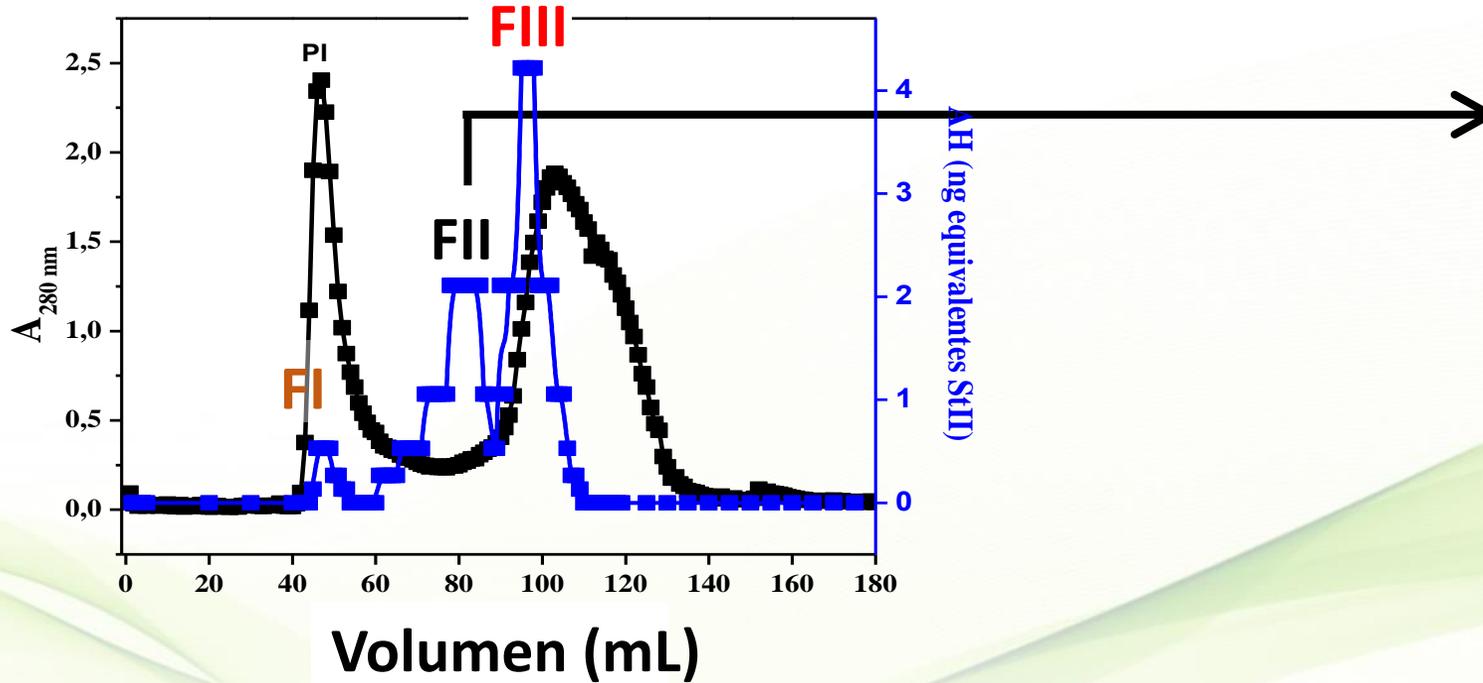




AH Inhibible por SM

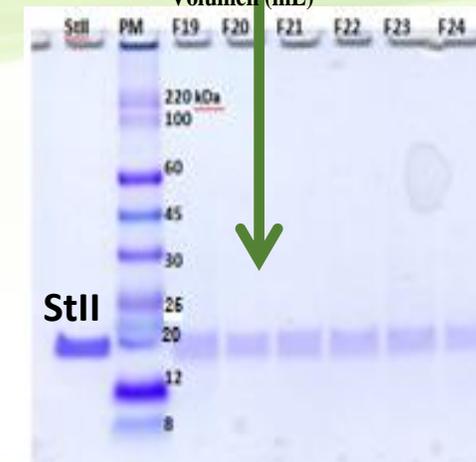
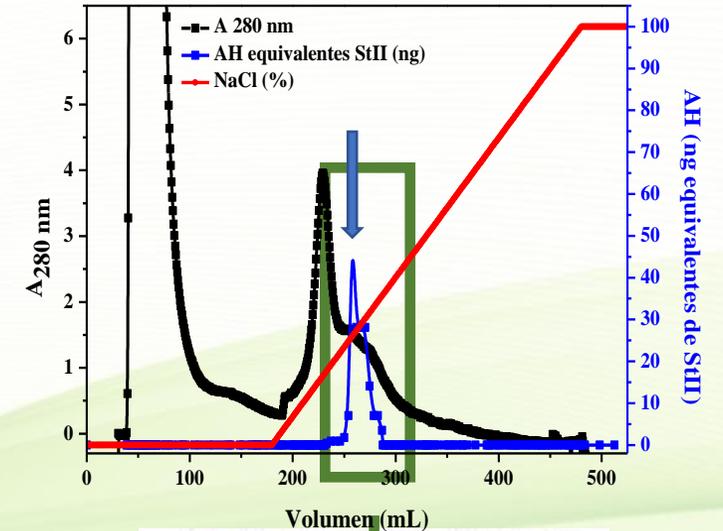
Kem y Dunn, 1988
Lanio et al., 2001

Exclusión molecular en Sephadex G-50



Alvarado et al., 2014

IC-CM Sephadex de FII



SDS-
PAGE
(4-12%)



ARNtotal

GenBank
Secuencias de
actinoporinas

Diseño de oligos
degenerados

oligos
degenerados

ARNm

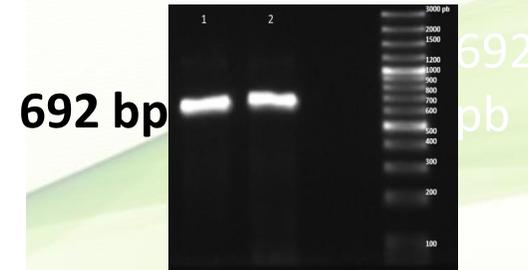
Secuenciación

ADN plasmídico
de seis colonias

E. coli (TOP10)

3 secuencias
completas
codificantes
para actinoporina

pCR2-TOPO



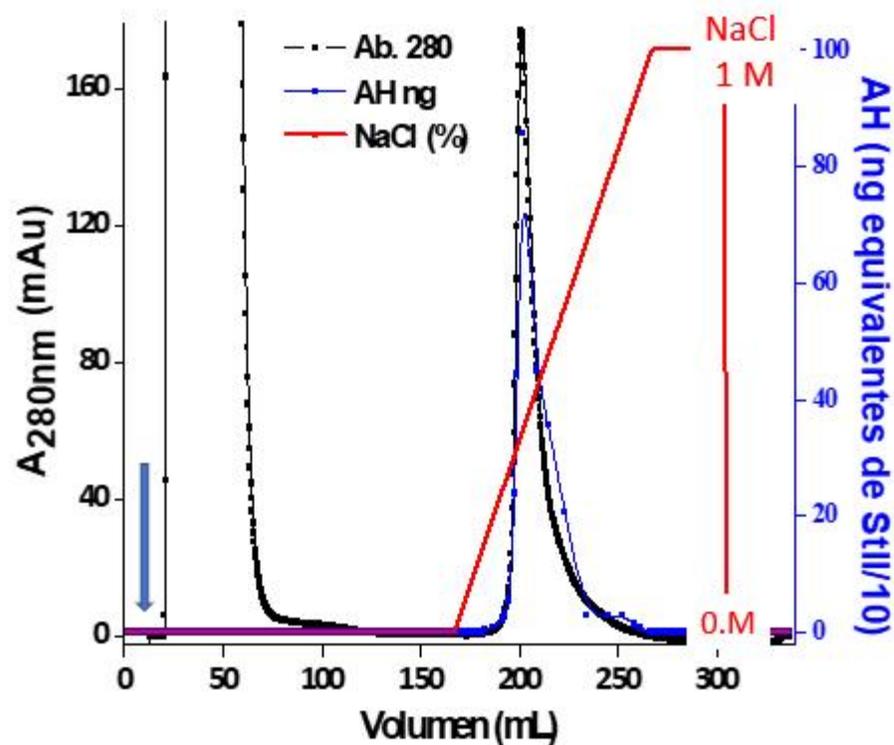
-2 para 215 residuos de
aa con una **Pro2** en la
proteína madura y
-una para 214 residuos
de aa carente de este
residuo

RACE-PCR



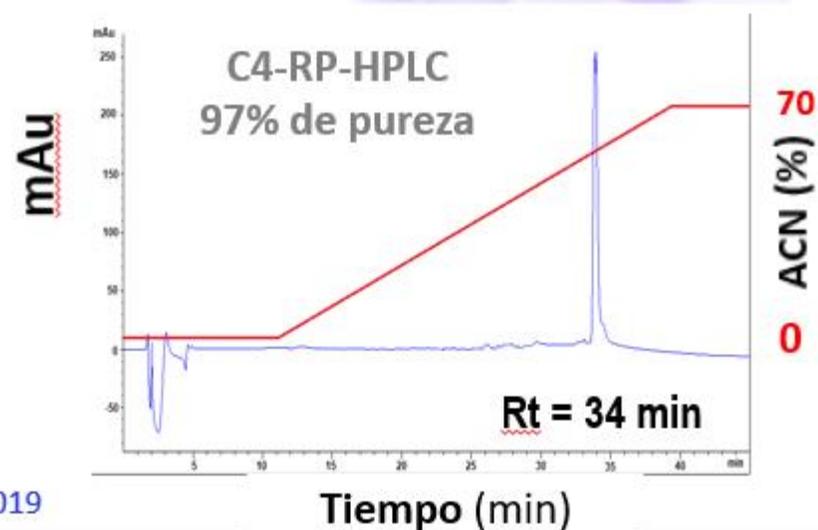
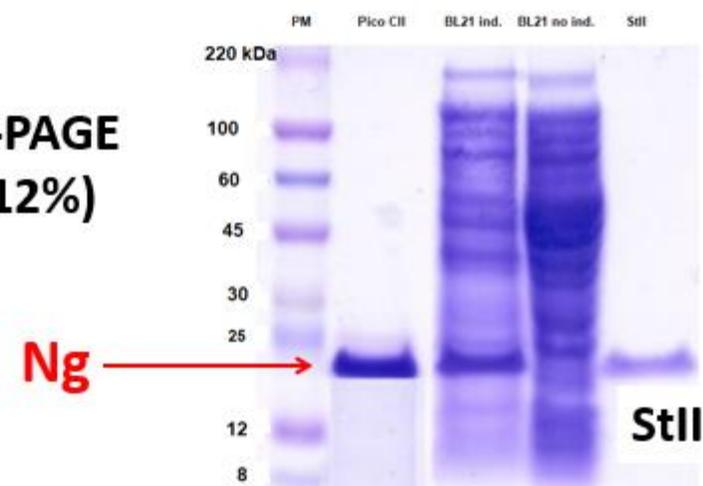
- Síntesis de la secuencia de ADN codificante para la proteína madura de 179 aa en el vector de expresión pET-21 (a+)
- Obtención de la proteína heteróloga –**Nigrelisina (Ng)**- en células de *E. coli* BL21 Star (DE3) por el método de autoinducción (*Studier, 2005; Valle et al, 2018*)
Elevado rendimiento: 15 mg. L⁻¹ de cultivo

Purificación de Ng en CM Sephadex C-25



Alvarado-Mesén et al., 2019

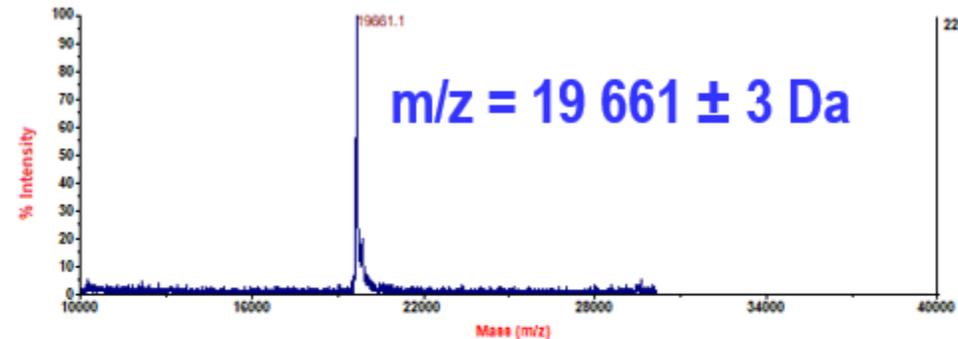
SDS-PAGE (4-12%)



Se procedió a la caracterización molecular y funcional de nigrelisina (Ng) en comparación con Sticholisina II (StII), la actinoporina más potente conocida

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Espectro MALDI-TOF de Ng



Alvarado-Mesén *et al.*, 2019

Secuenciación mediante MALDI-TOF TOF de Ngr

SLEVAGAVMEGANLGMSVLQTILQAI GDVSRKIAVGVDNESGRSWTAQNAYFRSGTSDVIL

PHTVPSGKALLYDGQKNRGPVATGVVGVITYTMGDGNTLAVMFSVPYDYNWYSNWWWVKIY

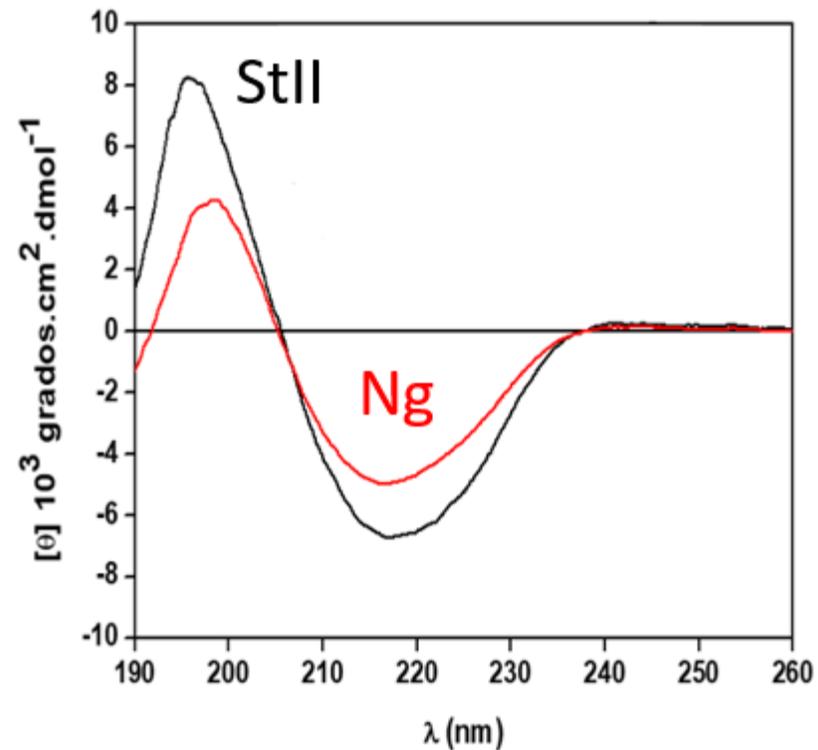
HGKVRASQKMYEDLYYYRSPFKGDNGWHERNLGYGLKSKGFMNSSGAALLQIKVMKA

Ng contiene 179 aa - PM de 19 661 ± 3 Da y un pI teórico de 9,68

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Determinación del contenido de estructura secundaria

Espectros típicos CD - UV lejano



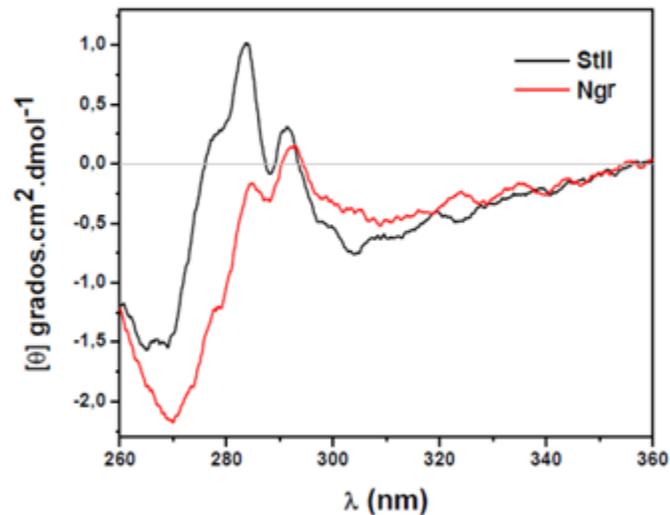
Alvarado-Mesén et al., 2019

Proteína	Hélice α (%)	Hoja β	Aleatoria
Ng	5,5	58,5	35,0
StII	8,2	60,0	31,4

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Caracterización conformacional de Ng

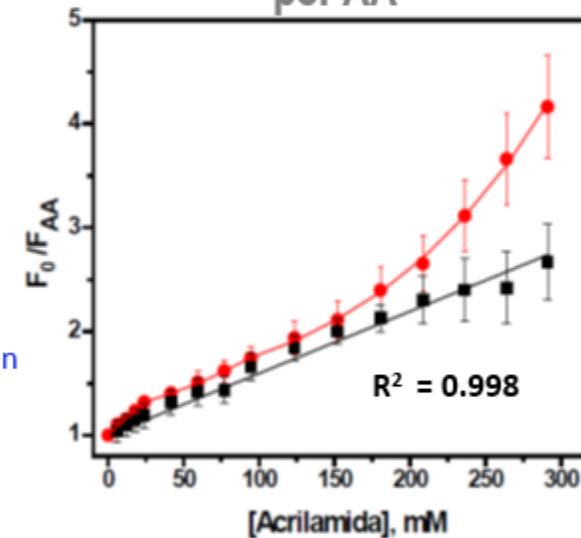
Espectros típicos de **Ngr** y **StII**
CD UV cercano



Alvarado-Mesén
et al., 2019

- Ng**: ligero desplazamiento hacia la región roja del espectro respecto a **StII**, y
- la relación entre las intensidades de su bandas a 290/282 nm es mayor para **Ng** en comparación con **StII**

Atenuación de la F de **Ng** y **StII**
por AA



- Comportamiento no lineal en **Ng**
→ Más de una población de Trp expuestos en **Ng**
- Mayor exposición de Trp en **Ng**

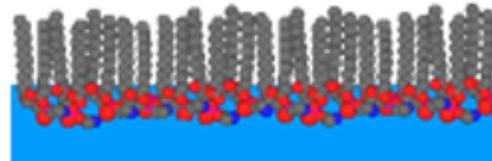
CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL

Unión de Ng y StII a monocapas de PC:SM (1:1)

Tejuca et al., 1996, 2001; Álvarez-Valcárcel et al., 2001; Pedrera et al., 2014

Determinación de la presión crítica (π_c) como medida de la afinidad de las toxinas por la monocapa

	π_c (mN.m ⁻¹)
Ng	47.1 ± 1.4
StII	43.8 ± 1.3



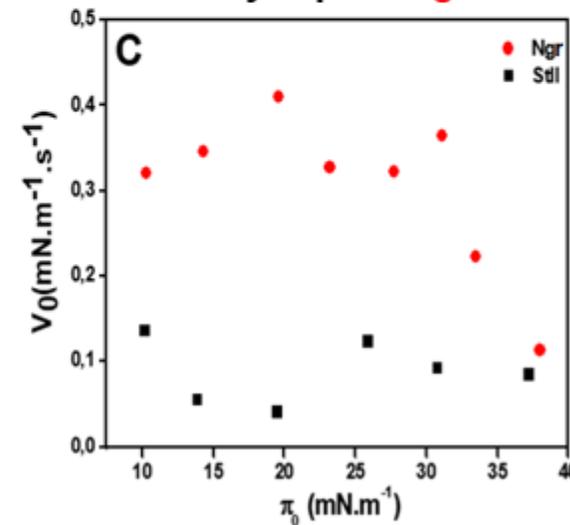
-Ambas toxinas se asocian en igual extensión la monocapa

-Como $\pi_c > 35$ mN.m⁻¹ ambas proteínas no solo se asocian sino que se insertan en la membrana

Alvarado-Mesén et al., 2019

Maget-Dana, 1999; Gutiérrez-Aguirre et al., 2004.

Pero la V inicial (V_0) de incorporación a las monocapas es mayor para **Ng**

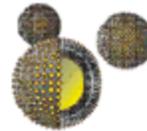


CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL

Unión de Ng y StII a bicapas (SUV de PC:SM, 1:1)

[Tejuca et al., 1996, 2001](#); [Álvarez-Valcárcel et al., 2001](#)

Afinidad de las toxinas por la bicapa mediante la determinación del Lip_{50}



Lip_{50} ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)

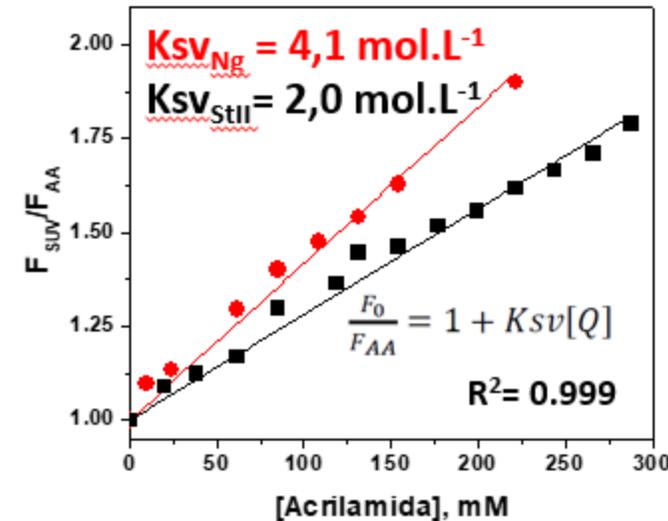
Ng: 2.5 ± 0.1

StII: 2.1 ± 0.3

[Alvarado-Mesén et al., 2019](#)

Lip_{50} son muy similares entre ambas toxinas = igual afinidad

Atenuación de la fluorescencia de Ng y StII unidas a SUV PC:SM (1:1) por adición de AA

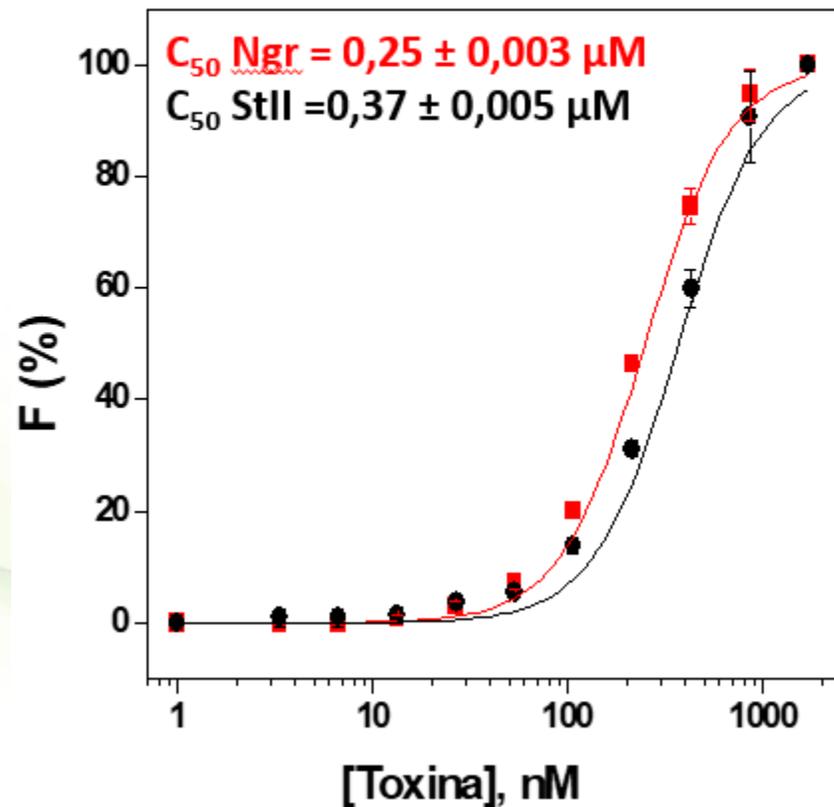


Relación lineal de la fluorescencia en presencia y ausencia de AA en función de su concentración sugiere la presencia de una única población de Trp. $K_{sv,Ng} > K_{sv,StII}$ en membranas
[Lakowicz y Masters, 2006](#)

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL

Ng y StII permeabilizan vesículas de PC:SM (1:1)

(Tejuca *et al.*, 1996; Álvarez *et al.*, 2001)



C_{50} : concentración de proteína necesaria para promover la liberación del 50% de la sonda atrapada en las vesículas.

Ambas actinoporinas no difirieron apreciablemente en su actividad permeabilizante

Alvarado-Mesén *et al.*, 2019

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL

Ng despliega una elevada actividad hemolítica
en eritrocitos humanos

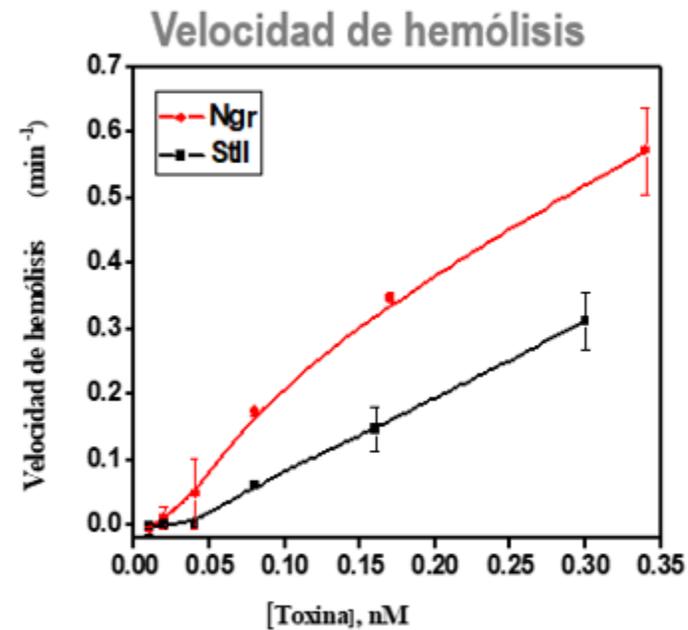
Eficacia de la hemólisis

HC_{50} (nM)

Ng $0,09 \pm 0.01$

StII 0.13 ± 0.01

La eficacia de la hemólisis es similar
para ambas actinoporinas.



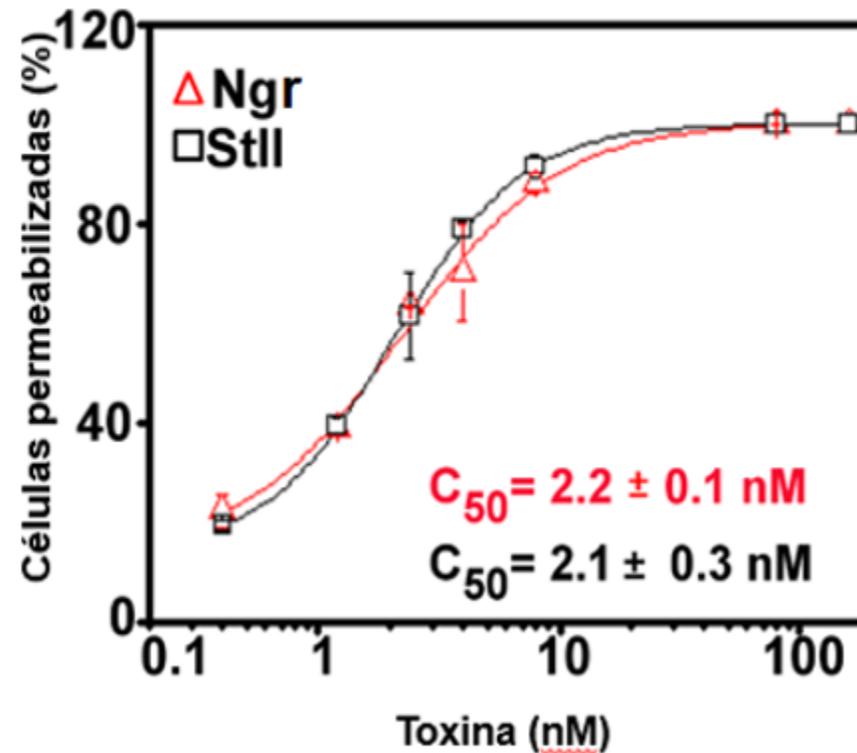
Ng muestra una velocidad de
hemólisis superior a la de StII

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL

Ng y StII también muestran similar actividad permeabilizante en células de linfoma murino L1210

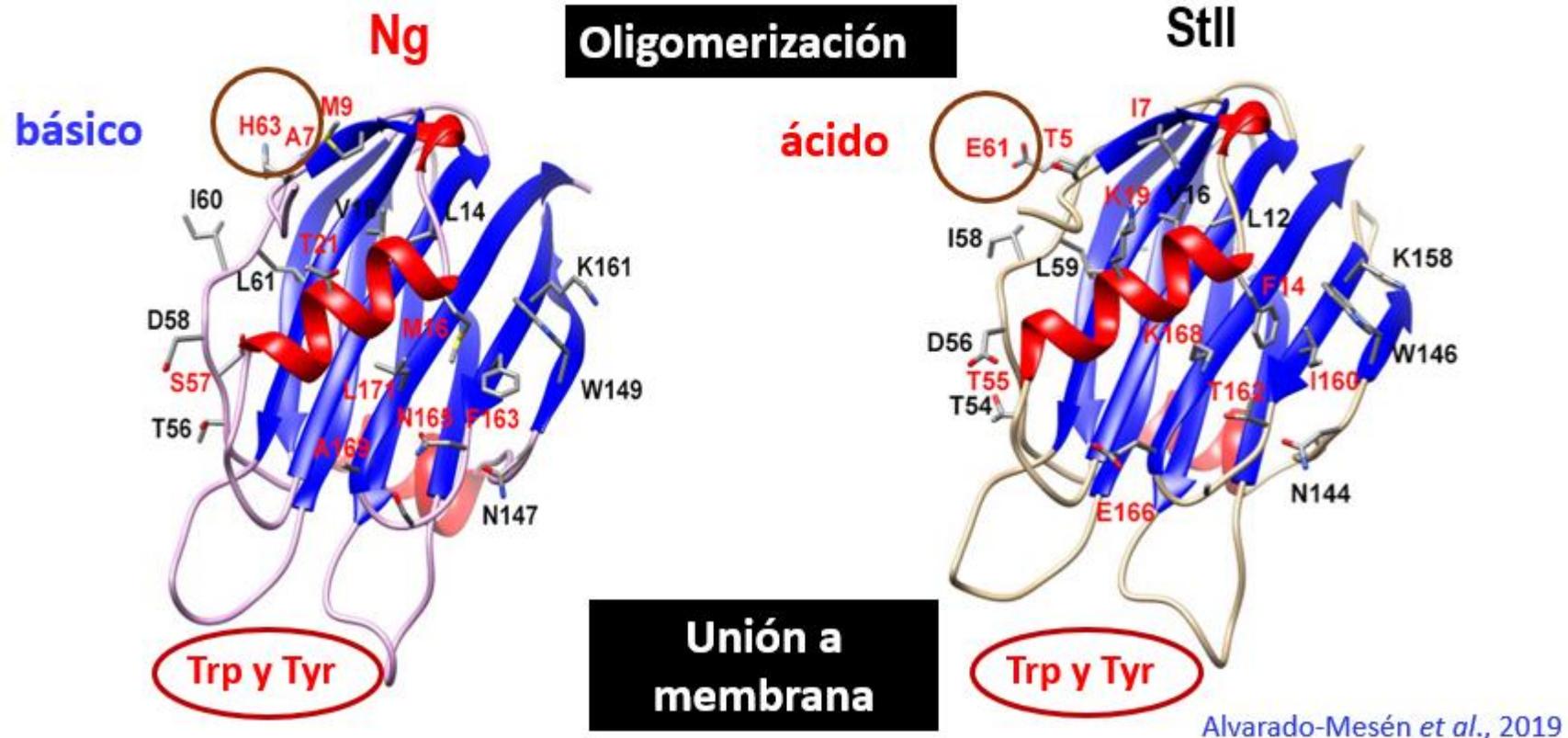
Citometría de flujo
con PI

Ng y StII muestran la misma eficacia de permeabilización de células L1210 en [nM] al igual que en eritrocitos.



CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL

Modelación por homología de Ng



Alvarado-Mesén *et al.*, 2019

Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi

ELSEVIER



Research paper

Cloning, purification and characterization of nigrelysin, a novel actinoporin from the sea anemone *Anthopleura nigrescens*

Javier Alvarado-Mesén^a, Frank Solano-Campos^a, Liem Canet^{b, c}, Lohans Pedrera^b,
Yadira P. Hervis^b, Carmen Soto^b, Henry Borbón^d, María E. Lanio^b, Bruno Lomonte^e,
Aisel Valle^{b, c}, Carlos Alvarez^{b, *}

^a Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional, Costa Rica

^b Centro de Estudio de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba

^c Laboratory of Molecular Biophysics, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brazil

^d Escuela de Química, Universidad Nacional, Costa Rica

^e Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Costa Rica

Actualmente nuestro grupo trabaja en el clonaje, expresión y caracterización molecular y funcional de las dos isoformas de nigrelisina con un residuo de Pro2 (Proyecto SIA 0640-19)

CONCLUSIONES

Ng es una actinoporina con una actividad funcional similar a la de **StII**, pero con peculiaridades que la hacen tener **una velocidad de inserción en membranas y de hemólisis superior a StII**. Por lo tanto, es una PFP con potencial para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas y biomédicas.

Es posible el desarrollo de una **BIOECONOMÍA AVANZADA** mediante el uso de herramientas biotecnológicas que permitan el aprovechamiento económico de los recursos genéticos y bioquímicos de nuestra biodiversidad en condiciones *ex situ*, sin tener que estar accediendo a la fuente natural de la cual proviene la información genética.

MUCHAS GRACIAS