



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

BIOSÍNTESIS, PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE LA TOXINA M2TX1

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Q U I M I C A

P R E S E N T A

ANDREA ANTHAR CABRERA PERALTA



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Profesor:	Rogelio Rodríguez Sotres
VOCAL:	Profesor:	José Federico del Río Portilla
SECRETARIO:	Profesor:	Luz del Carmen Castellanos Román
1er. SUPLENTE:	Profesor:	Luis Tonatihut Sánchez Linares
2° SUPLENTE:	Profesor:	Perla Deyanira Maldonado Jiménez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 1 DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DE BIOMACROMOLÉCULAS Y LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR, INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA: DR. JOSÉ FEDERICO DEL RÍO PORTILLA

SUSTENTANTE: ANDREA ANTHAR CABRERA PERALTA

Agradecimientos

Antes que a nadie quisiera agradecer a Dios por la vida y, sobre todo, por sus enseñanzas. Gracias a ti soy un mejor ser humano y una persona plenamente feliz.

Agradezco de la forma más profunda y sincera a mi mamá. Eres la persona más fuerte y valiente que conozco, admiro inmensamente tu bondad, tu alegría y tus ganas de vivir. Gracias por acompañarme durante todos estos años.

Agradezco también a mi papá, quien me procuró la buena educación escolar que me permitió salir adelante y sin la cual no me encontraría donde estoy.

Una persona cuyo juicio siempre valoro y cuya buena opinión me parece indispensable es Jeros. Has estado en los mejores y en los peores momentos, gracias por tu incondicionalidad. Te quiero y siempre te querré.

Otras cuatro personas que no pueden faltarme son Pepi, Tany, Benja y Michel. Hemos pasado momentos inolvidables juntos, agradezco infinitamente su cariño, preocupación, compañía, risa, consejo y, en conjunto, hermandad.

Agradezco también a la mujer más dulce que conozco, Abui. Te agradezco ilimitadamente por preocuparte tanto por mi bienestar y por estar siempre a mi lado. Agradezco también a mis abuelos Cocó y Toño y a mis tíos Yolita y Sergio por su cariño, interés y apoyo incondicional.

Mi persona favorita de entre toda la gente que conozco es Dany. Eres para mí una combinación perfecta de responsabilidad, buen humor, rectitud y desenfado. Agradezco y valoro infinitamente tu amor, apoyo e incondicionalidad, aún cuando la situación parecía imposible de superar. Te amo muchísimo.

Agradezco también a Fede, en quien he encontrado un enorme apoyo académico y humano en todo momento. Gracias por permitirme formar parte de este proyecto, por confiar en mí, por enseñarme, por guiarme y por apoyarme.

Es popularmente dicho que nuestros amigos son la familia que nosotros elegimos, pero cuando uno llega a trabajar en un laboratorio no puede propiamente elegir a tales amigos. Así, me siento enormemente afortunada por haber encontrado un amigo en cada uno de mis compañeros de laboratorio: Ángeles, Belén, David, Lau, Iza y Nat. Gracias por su amistad, por su constante ayuda, por compartir su conocimiento conmigo y por su paciencia.

Hay una persona que merece de mí inconmensurable admiración y respeto: Naye. Gracias por ser amiga y mamá, por alimentarme cuando tuve hambre, por cuidarme y aconsejarme, por siempre acordarte de mí y gracias porque, a pesar de todos los momentos difíciles que pasamos, aún puedo llamarte mamá.

Tres personas que han estado conmigo desde que aprendí a multiplicar y quienes merecen todo mi cariño y mi más sincera amistad son Clau, Diana y Herrera. Gracias por ser mis amigos y por seguir caminando a mi lado.

También quiero agradecer a Juan, Vero, Érica, Lau, Kari, Lili, Víctor y, claro está, a mis amigos Químicos de la generación 2008: Thalís, Abel, Lili, Otho, Armando, Sam, Ray, Lalo, Nayt, Ross, Bruce, Gerardo, David, Oz, Danae, Neto, Salvador, Óscar V., Colin, Montané y Carmen (si olvidé a alguien no fue intencional). Ustedes hicieron que la carrera fuera una etapa increíble e inolvidable en mi vida y por eso les agradezco enormemente.

Agradezco también a la Dra. Paty por su consejo, paciencia, buen juicio, comentarios y aportaciones para la realización de este trabajo.

Uno de los agradecimientos más importantes es a la UNAM. Agradezco inmensurablemente la educación y formación, tanto académica como humana, que de ella recibí y sigo recibiendo.

Finalmente agradezco la beca otorgada a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM vía el proyecto IN205110 y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo a través del proyecto 166472.

Índice

1. Introducción	9
2. Marco teórico	10
2.1 Aminoácidos, péptidos y proteínas	10
2.1.1 Clasificación de toxinas de veneno de alacrán	12
2.1.2 Toxinas κ -BUTX-Tt2b y Ts16	14
2.2 Resonancia Magnética Nuclear	16
2.2.1 Bases de la Resonancia Magnética Nuclear	17
2.2.2 Apantallamiento, desplazamiento y acoplamiento	21
2.2.3 Experimentos en dos dimensiones	22
3. Diseño experimental y metodología	24
3.1 Transformación de M2Tx1	24
3.2 Expresión de M2Tx1	25
3.3 Lisis celular	25
3.4 Primera purificación por CAMQ	25
3.5 Diálisis y reacción de corte	26
3.6 Segunda purificación por CAMQ	26
3.7 Purificación por HPLC	27
3.8 Determinación de la masa de M2Tx1	27
3.9 Obtención de los espectros TOCSY y NOESY	27
3.10 Procesamiento y análisis de los espectros	28
4. Resultados y discusión	29
4.1 Transformación	29
4.2 Expresión de M2Tx1	29
4.3 Primera purificación por CAMQ	31
4.4 Reacción de corte	32
4.5 Segunda purificación por CAMQ	34

4.6 Purificación por HPLC	35
4.7 Determinación de la masa de M2Tx1	36
4.8 RMN y procesamiento de los espectros obtenidos	37
4.9 Refinamiento de la estructura por dinámica molecular	45
5. Conclusiones	47
6. Referencias y bibliografía	48
Apéndice A. Disoluciones amortiguadoras	52
Apéndice B. Patrones TOCSY	53

Abreviaturas

κ -BUTX-Tt2b	κ -Buthitoxin-Tt2b, toxina del veneno de <i>Tityus trivitatus</i>
Ts16	Toxina proveniente del veneno del alacrán <i>Tityus serrulatus</i>
M2Tx1	Mutante P4K, N23H, R25K de la toxina κ -BUTX-Tt2b
C _n	Cys que ocupa la posición <i>n</i> entre las Cys de la proteína
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
<i>l</i>	Número cuántico de momento angular o espín nuclear
μ	Número cuántico magnético
γ	Constante giromagnética
B_0	Intensidad del campo magnético
M_0	Vector de magnetización macroscópica
ω, ν	Frecuencia en radianes/segundo y hertz, respectivamente
ppm	Partes por millón
ν_L	Frecuencia de Larmor
σ	Constante de apantallamiento
δ	Desplazamiento químico
NOE	Efecto Nuclear Overhauser
CAMQ	Cromatografía de Afinidad Metal-Quelato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranososa

RMSD	Root Mean Square Deviation
TCEP	Clorhidrato de tris-(2-carboxietil) fosfina

1. Introducción

En 2012 se determinó la estructura tridimensional de la κ -BUTX-Tt2b y de la Ts16, dos toxinas de veneno de alacrán (de *Tityus trivitattus*, originario de Argentina, y de *Tityus serrulatus*, de Brasil, respectivamente) cuyas secuencias de aminoácidos se diferencian en tan sólo cuatro aminoácidos (el 4, el 23, el 25 y el 28) y cuyas estructuras tridimensionales son superponibles. Originalmente estas dos toxinas habían sido clasificadas en la subfamilia 20 de las α -KTx y, por tanto, se esperaba que ambos péptidos presentaran el motivo CS α / β característico de la familia. No obstante se encontró que ambas adoptan un plegamiento hélice-asa-hélice (también llamada α/α) estabilizado por seis cisteínas, quienes forman puentes disulfuro no convencionales (C2-C4, C1-C5, C3-C6, mientras que los convencionales son C1-C4, C2-C5, C3-C6), revelando una inesperada versatilidad estructural de las toxinas de alacrán.

Del nacimiento de la familia de toxinas formada por κ -BUTX-Tt2b y Ts16 derivó el interés en obtener las mutantes intermedias entre ellas, lo cual serviría para comprobar la presencia del motivo CS α / α en la nueva familia. Para iniciar se planteó la obtención de la mutante P4K, N23H y R25K de κ -BUTX-Tt2b, llamada simplemente M2Tx1, y su caracterización vía Resonancia Magnética Nuclear y espectrometría de masas. Se espera que esta toxina adopte el mismo plegamiento α/α y que posea el mismo patrón de puentes disulfuro que fueron recientemente hallados en las toxinas κ -BUTX-Tt2b y Ts16.

2. Marco teórico

2.1 Aminoácidos, péptidos y proteínas

Los péptidos y las proteínas son polímeros de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos (enlaces amida sustituidos); 20 son los aminoácidos comúnmente encontrados en péptidos y proteínas [1, 2, 3].

Los 20 aminoácidos estándar encontrados en las proteínas son α -aminoácidos, tienen todos un grupo carboxilo y un grupo amino unidos al mismo átomo de carbono (el carbono α), el cual está unido también a un hidrógeno y un grupo R; por tanto, el carbono α es un centro quiral (excepto en el caso de la glicina, pues R es otro hidrógeno); los carbonos α de las proteínas sólo presentan la estereoisomería L. Los aminoácidos difieren unos de los otros en sus cadenas laterales (grupos R), que varían en estructura, tamaño y carga eléctrica, y que influyen en la solubilidad en agua de los aminoácidos. Los grupos R de algunos aminoácidos pueden ionizarse y contribuyen en un péptido a las propiedades ácido-base globales de la molécula. Los carbonos adicionales de la cadena lateral de los aminoácidos se designan comúnmente β , γ , δ , ϵ , etc., empezando a partir del carbono α [3].

Se diferencia entre péptido y proteína por el tamaño de la cadena de monómeros: mientras que las proteínas suelen contener de 50 a más aminoácidos, los péptidos son cadenas de menos de 50; si bien esta clasificación es subjetiva ya que muchos autores consideran a las proteínas de menos de 100 aminoácidos como péptidos, se trabajará con la primera clasificación aquí planteada [1, 2].

Las unidades de aminoácido de un péptido se denominan *residuos* porque los aminoácidos pierden un átomo de hidrógeno del grupo amino y el grupo hidroxilo del carboxilo al unirse a otros aminoácidos; como consecuencia, los aminoácidos pierden la función ácida y su grupo amino no queda libre. El residuo aminoácido del extremo de un péptido que tiene un grupo α -amino libre es el residuo amino-

terminal; el residuo del otro extremo, que tiene un carboxilo libre, es el residuo carboxilo-terminal [3].

Para macromoléculas grandes como las proteínas se definen cuatro niveles para describir y comprender su estructura. La descripción de los enlaces covalentes que unen a los residuos, donde el elemento más importante es la secuencia de los diferentes aminoácidos en una proteína, es su *estructura primaria*. La *estructura secundaria* de la cadena polipeptídica se refiere a disposiciones particularmente estables de los aminoácidos que dan lugar a hélices- α , láminas- β , giros, asas y regiones inestructuradas. En el caso de las hélices- α y las láminas- β , la estructura secundaria surge de patrones repetitivos de ángulos diedros (Φ y Ψ) entre residuos sucesivos. Las hélices- α y las láminas- β se forman gracias a puentes de hidrógeno regulares entre los grupos N-H y C=O de las partes invariables de los aminoácidos en la cadena polipeptídica principal. La *estructura terciaria* describe todos los aspectos del plegamiento tridimensional de un polipéptido. Finalmente, cuando una proteína posee dos o más subunidades polipeptídicas (cadenas de aminoácidos asociadas entre sí), su disposición en el espacio se denomina *estructura cuaternaria* [2, 3].

Las células contienen generalmente miles de proteínas diferentes, cada una de ellas con una actividad biológica distinta [3]. Ejemplos importantes de las funciones bioquímicas de las proteínas incluyen ligandos, catálisis, función como interruptores moleculares y como componentes estructurales de las células y los organismos. Las proteínas pueden unirse a otras macromoléculas, como el ADN en el caso de las ADN polimerasas, o a otras proteínas en el caso de transportadores y receptores que se unen a una molécula de señalización. Esta función evidencia la habilidad de las proteínas de presentar superficies estructural y químicamente diferentes que pueden interaccionar con otras moléculas con una alta especificidad. La extraordinaria versatilidad funcional de las proteínas se deriva de la diversidad química de las cadenas secundarias de los aminoácidos que las conforman, de la flexibilidad de la cadena polipeptídica y del enorme

número de formas en las cuales las cadenas polipeptídicas con diferentes aminoácidos se pueden plegar [2].

2.1.1 Clasificación de toxinas de veneno de alacrán

Las toxinas son proteínas producidas por algunos organismos como bacterias, arañas, alacranes, algunos organismos marinos, etc. y que son tóxicas para otras especies determinadas [3, 4].

Los venenos de alacrán son mezclas que contienen, entre otras sustancias, diversos péptido-toxinas (péptidos provenientes de venenos y que poseen una masa molecular menor que 10 kDa) que son dañinos para muchos organismos, incluyendo a los seres humanos, y que son capaces de interactuar específicamente con canales de K^+ , Na^+ , Ca^{2+} y Cl^- [5, 6].

A la fecha, se han descrito cuatro familias de toxinas [7, 8], las cuales interactúan específicamente con los canales iónicos de la membrana celular antes mencionados [6]. Las cuatro familias de toxinas son numeradas con base en criterios como el tamaño de los péptidos, su toxicidad o su especificidad hacia canales iónicos.

La familia uno está compuesta por péptidos de 60 a 70 aminoácidos unidos por cuatro puentes disulfuro y que modulan la actividad de canales de Na^+ . La familia dos, de las KTx, engloba péptidos que inhiben canales de K^+ . La familia tres contiene péptidos de cadena corta de aproximadamente 36 aminoácidos de longitud con cuatro puentes disulfuro y que, supuestamente, inhiben canales de Cl^- . Finalmente, la familia cuatro incluye péptidos que modulan canales de Ca^{2+} sensibles a rianodina [7].

Las toxinas de la familia dos pueden presentar cadenas cortas (30-40 aminoácidos) y largas (60-64 aminoácidos) con motivos α/β (un hélice- α y una lámina- β formada por dos hebras antiparalelas) estabilizados por tres o cuatro puentes disulfuro [6,7,9]. Las toxinas de cadena corta suelen hallarse presentes en concentraciones bajas en los venenos (de 0.01 a 1% en peso) y son sólo levemente tóxicas [10].

En 1995 Miller [8] propuso la clasificación de las toxinas de la familia dos cuya longitud fuera de 37 a 39 residuos y que tuvieran seis residuos de cisteína en posiciones determinadas; las últimas dos cisteínas debían participar en la secuencia determinada $C_{33}-(Z)_{34}-C_{35}$, donde $(Z)_{34}$ es un residuo cargado. Miller sugirió que estos péptidos fueran llamados “ α -K-toxinas”, abreviadas “ α -KTxm.n”, donde m y n son la familia y subfamilia, respectivamente, y α denota el tipo de péptidos descritos por primera vez en esta familia. Así, los siguientes péptidos descubiertos habrían de llamarse β -KTx, γ -KTx, etc., donde α , β , y γ hacen referencia a la actividad de la toxina. Esta clasificación está basada en la secuencia de aminoácidos y en la posición de los residuos de cisteína en la cadena que establecen el plegamiento tridimensional de las toxinas. Las tres subfamilias moleculares propuestas por Miller, todas pertenecientes a las α -KTx, son las toxinas tipo caribdotoxina, las tipo noxiustoxina y las tipo kaliotoxina. [8] La presencia de una cuarta subfamilia molecular, la de toxinas tipo tityustoxina, fue incierta (dada la presencia de un único miembro, TsII-9) hasta 1996, cuando Legros [11] caracterizó al péptido Tsk, perteneciente a la misma subfamilia que TsII-9.

En 1999, Tytgat [7] propuso la existencia de las subfamilias β -KTx, formada por péptidos de 60-64 aminoácidos de largo y con seis cisteínas, y γ -KTx, que contendría un único péptido de 42 aminoácidos, sin homología alguna con otro péptido de la subfamilia α -KTx. En 2004 Rodríguez de la Vega [12] confirmó la existencia de ambas subfamilias al hacer un resumen de las toxinas de alacrán específicas para canales de K^+ conocidas al momento. Además de clasificar a diversos péptidos en las familias α , β y γ -KTx, añadió a la familia a las κ -hefutoxinas. El resumen comprende también cinco péptidos que presumiblemente serían clorotoxinas y ocho inclasificables péptidos de cadena corta con motivos α/β estabilizados por cisteínas.

En 2008, King [13] propuso un nuevo esquema para nombrar a las toxinas que permite tener información importante respecto a su actividad, su fuente biológica y su relación con otros péptidos con solamente conocer el nombre de la toxina en

cuestión. Esto facilita el análisis de las toxinas usando bases de datos electrónicas, evita ambigüedades en los nombres y provee una visión general de la naturaleza de la toxina que los métodos anteriores para nombrar toxinas no habían previsto hasta entonces.

Actualmente, la subfamilia de las α -KTx abarca péptidos con 23 a 43 aminoácidos estabilizados por 2 a 4 puentes disulfuro, dos de los cuales se hallan estrictamente conservados y unen covalentemente un segmento de la hélice- α a una hebra lámina- β , formando un motivo α/β estabilizado por cisteínas [12].

2.1.2 Toxinas κ -BUTX-Tt2b y Ts16

La toxina κ -BUTX-Tt2b proviene del veneno del alacrán argentino *Tityus trivittatus*. Su secuencia de aminoácidos presenta una gran identidad con péptidos clasificados en la subfamilia 20 de las α -KTx, incluyendo a las seis cisteínas características del motivo CS α/β . Aún así, el péptido adopta un plegamiento CS α/α en disolución [5]. Su secuencia de aminoácidos es la siguiente [14]:

```
      5      10      15      20      25      30
GSGCM PEYCA GQCRG KVSQD YCLKN CRCIR
```

Por su parte, la toxina Ts16 proviene del alacrán brasileño *Tityus serrulatus*. Su secuencia de aminoácidos posee una identidad del 89% con la toxina κ -BUTX-Tt2b, por lo que también presenta gran identidad con los péptidos de la subfamilia 20 de las α -KTx, subfamilia en el cual había sido originalmente clasificada. Esta toxina también adopta el motivo CS α/α en disolución [5], siendo su secuencia de aminoácidos la siguiente [15]:

```
      5      10      15      20      25      30
GSGCM KEYCA GQCRG KVSQD YCLKH CKCIP R
```

Se esperaba que estos dos péptidos presentaran el motivo CS α/β dado el espaciamiento entre cisteínas, común de tal motivo; sin embargo, ambos péptidos exhiben el inesperado motivo CS α/α . También se preveía que los puentes disulfuro que ambos péptidos forman fueran convencionales (C1-C4, C2-C5, C3-

C6), pero hay evidencia que indica que no lo son (C2-C4, C1-C5, C3-C6). El motivo CS α / α y el patrón de puentes disulfuro hallado en estos dos péptidos ofrecen nuevas perspectivas de la versatilidad estructural de los péptidos de veneno de alacrán [5].

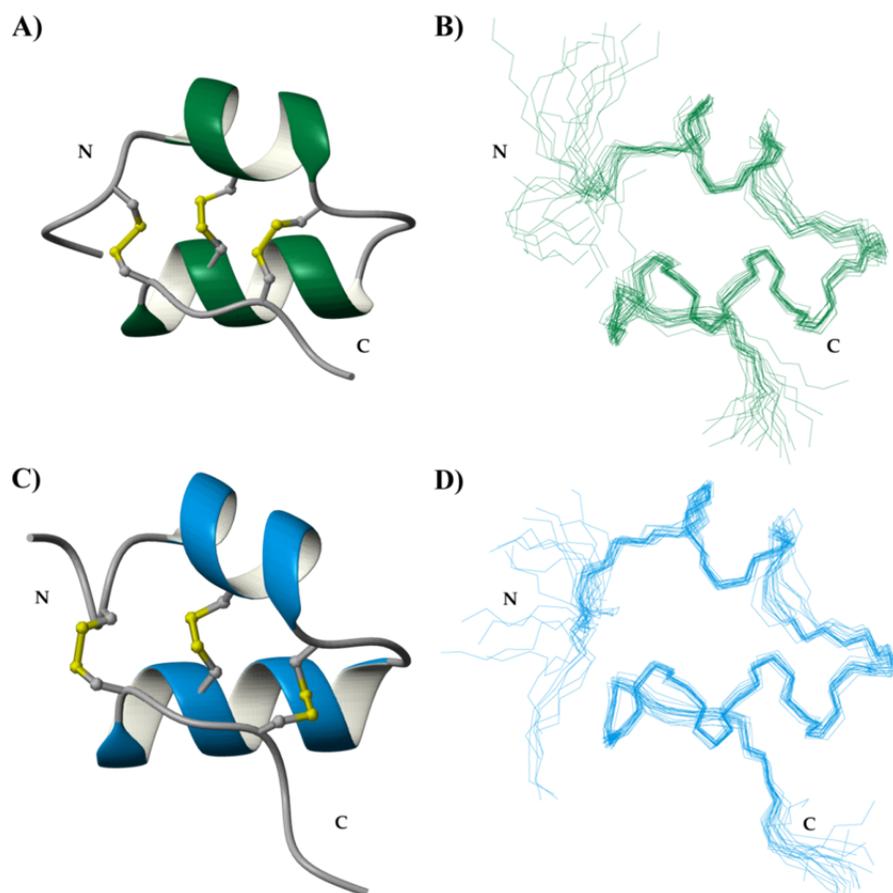


Figura 1. Estructuras obtenidas por RMN de κ -BUTX-Tt2b (A y B) y Ts16 (C y D). En B y D se presentan superpuestas las veinte estructuras de menor energía; en A y C se muestran las representaciones de listón y los puentes disulfuro de ambas estructuras minimizadas.

Por su parte M2Tx1, la toxina que se desea biosintetizar, purificar y caracterizar, posee la siguiente secuencia de aminoácidos:

5 10 15 20 25 30
 GSGCM KEYCA GQCRG KVSQD YCLKH CKCIR

Como se observa, la secuencia de aminoácidos de M2Tx1 guarda una gran homología con la de κ -BUTX-Tt2b y sobre todo con la de Ts16. Es por esta razón que se espera que su estructura tridimensional adoptase el mismo motivo α / α

estabilizado por cisteínas que forman puentes disulfuro no convencionales hallado en las toxinas κ -BUTX-Tt2b y Ts16.

2.2 Resonancia Magnética Nuclear

En 1946 dos grupos de investigación, el de F. Bloch, W. W. Hansen y M. E. Packard [16, 17] y el de E. M. Purcell, H. C. Torrey y R. V. Pound [18], observaron por su cuenta señales de resonancia magnética nuclear por primera vez. Bloch y Purcell fueron premiados en conjunto con el Premio Nobel de Física en 1952 por su descubrimiento. Desde entonces la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se ha convertido en una herramienta indispensable para los químicos, físicos y, más recientemente, para los bioquímicos y científicos médicos [19]. Durante las tres primeras décadas de la espectroscopía RMN todas las mediciones se basaban en modos de observación en una dimensión; esto significa que los espectros poseían una coordenada de frecuencia, y la segunda coordenada era usada para mostrar la intensidad de las señales. El desarrollo de los experimentos de RMN en dos dimensiones durante los 1970s significó el comienzo de una nueva era para la espectroscopía RMN [20]. Los espectros realizados con tales métodos tienen dos coordenadas de frecuencia, mientras las intensidades de las señales son mostradas en una tercera dimensión [19]. Recientemente, ha sido posible realizar experimentos con tres o más dimensiones [21, 22]. La importancia de la posición que la RMN ocupa hoy día se ilustra con los premios Nobel de Química de 1991 para R. R. Ernst [23], en 2002 para K. Wüthrich [24] y con el premio Nobel de Medicina en 2003 para P. Lauterbur y P. Mansfield [25, 26] por su investigación pionera en métodos de RMN en Química, Bioquímica y Medicina. Las nuevas técnicas que han surgido en los últimos años muestran que los avances en RMN están aún lejos de llegar a su fin.

Actualmente los principales campos de aplicación de la RMN son la determinación de la estructura de las moléculas y el estudio de la dinámica molecular en disolución de las mismas. La información necesaria se obtiene midiendo, analizando e interpretando espectros de alta resolución de RMN obtenidos en

líquidos de baja viscosidad. El núcleo de interés en este caso es el de ^1H , ya que su resonancia es la más intensa en la determinación de las estructuras de las moléculas orgánicas [19].

2.2.1 Bases de la Resonancia Magnética Nuclear

La espectroscopía RMN es una manifestación del momento angular de espín nuclear, una propiedad mecánico-cuántica que no tiene un análogo clásico, y que es representada por el número cuántico de espín nuclear, I . Dado que el fenómeno de RMN está basado en la existencia del espín nuclear, los núcleos con número cuántico de espín igual a cero son inactivos o no observables en esta espectroscopía. Los núcleos más importantes estudiados por la RMN con $I = \frac{1}{2}$ son ^1H , ^{13}C , ^{15}N y ^{31}P ; el núcleo más importante con $I = 1$ es el deuterio (^2H) [19, 27].

En la presencia de un campo magnético externo, el momento angular toma una orientación tal que su componente P_z a lo largo de la dirección del campo magnético es un entero ó medio entero múltiplo de \hbar :

$$P_z = \hbar m$$

donde m es el número cuántico magnético y tiene valores de $m = (-I, -I + 1, \dots, I - 1, I)$. Así, m tiene $2I + 1$ valores posibles y, consecuentemente, hay un igual número de orientaciones posibles para el momento angular y para el momento magnético en presencia del campo magnético. Este comportamiento de los núcleos en presencia de un campo magnético es llamado *cuantización direccional*. Para núcleos como ^1H que tienen $I = \frac{1}{2}$, esto significa que hay dos valores de m ($+\frac{1}{2}$ y $-\frac{1}{2}$). Es importante mencionar que para un espín aislado y en ausencia de campos magnéticos externos, los estados cuánticos correspondientes a los $2I + 1$ valores de m tienen la misma energía pero el momento angular de espín no tiene una orientación preferida [19, 27].

Los núcleos que tienen un momento angular de espín diferente de cero también poseen un momento magnético nuclear (μ). Esta propiedad es directamente

proporcional al vector que representa al momento angular de espín nuclear y está dada por:

$$\mu = \gamma P; \quad \mu_z = \gamma P_z = \gamma \hbar m,$$

donde la constante giromagnética γ es una constante característica de cada núcleo. La sensibilidad de detección de un núcleo en el experimento de RMN depende de γ [19, 27]. Dado que el momento angular es una propiedad cuantizada, el momento magnético nuclear también lo es [27].

En la representación clásica los dipolos nucleares precesan alrededor del eje z , que es el eje sobre el cual se halla el campo magnético. La frecuencia de precesión o frecuencia de Larmor, ν_L , es proporcional a la intensidad del campo magnético B_0 :

$$\nu_L = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| B_0$$

La energía del dipolo magnético en presencia de un campo magnético con una intensidad de campo magnético B_0 es:

$$E = -\mu_z B_0,$$

Así, para un núcleo con $2I + 1$ posibles orientaciones también hay $2I + 1$ estados energéticos, que son llamados niveles Zeeman. En un espectrómetro de RMN de alto campo, la intensidad del campo magnético es dirigida a lo largo del eje z ; para esta geometría, $E = -\mu_z B_0$ se reduce a:

$$E = -\gamma I_z B_0 = -m \hbar \gamma B_0,$$

Para el protón, que tiene $I = 1/2$, hay dos valores de energía en el campo magnético, que corresponden a los dos valores de m . Si $m = +1/2$, μ_z es paralelo a la dirección del campo, que es la orientación preferida energéticamente; si $m = -1/2$, μ_z es antiparalelo. Así, los diferentes estados de energía no están igualmente poblados puesto que las orientaciones de menor energía del vector del dipolo magnético son más probables; la población relativa de un estado está dada

por la distribución de Boltzmann. Las poblaciones en los estados dependen del tipo de núcleo y de la fuerza del campo aplicado: conforme aumenta la fuerza del campo externo, la diferencia de energías entre los niveles de energía del espín nuclear se vuelve más grande y la diferencia poblacional entre los estados se incrementa; no obstante, el exceso poblacional en el nivel energético inferior está en la región de partes por millón (ppm). Es importante marcar que la sensibilidad de la espectroscopía RMN depende de la diferencia poblacional entre los niveles Zeeman [19, 27].

De acuerdo con el modelo clásico, un núcleo con $I = \frac{1}{2}$ precesa alrededor del eje z del campo en la superficie de un doble cono. Si se suman las componentes en z de todos los momentos magnéticos nucleares en una muestra se obtiene un vector de magnetización macroscópica M_0 a lo largo de la dirección del campo (eje z) [19].

Pueden ser estimuladas transiciones entre los niveles Zeeman al aplicar radiación electromagnética de la frecuencia adecuada; se debe satisfacer la ecuación $\Delta E = h\nu_1$. La regla de selección que gobierna a las transiciones de dipolo magnético es $\Delta m = \pm 1$. Así, la energía requerida para excitar una transición entre los estados Zeeman m y $m + 1$ es:

$$\Delta E = \hbar\gamma B_0,$$

que es directamente proporcional a la intensidad del campo magnético. La frecuencia de la radiación electromagnética requerida está dada por:

$$\omega_0 = \gamma B_0$$
$$\nu_0 = \frac{\omega_0}{2\pi} = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$$

Donde las unidades de ω_0 son radianes por segundo y las unidades de ν_0 son hertz (Hz) [27].

Las transiciones del nivel energético inferior al superior corresponden a absorción de energía y las que se dan en sentido contrario corresponden a emisión de la

misma. Ambas transiciones son igualmente probables y son asociadas con la inversión de la orientación del espín. Dado el exceso poblacional en el nivel inferior, la absorción de energía es el proceso dominante; esto es observado como una señal cuya intensidad es proporcional a la diferencia poblacional y, por tanto, es también proporcional al número total de espines de la muestra, es decir, a la concentración.

La condición de resonancia se deduce de las ecuaciones antes mencionadas $\Delta E = h\nu_1$ y $\Delta E = \hbar\gamma B_0$:

$$\nu_L = \nu_1 = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| B_0$$

El término “resonancia” se refiere a la interpretación clásica del fenómeno, dado que las transiciones sólo pueden ocurrir cuando la frecuencia ν_1 de la radiación electromagnética es igual a la frecuencia de Larmor ν_L [19].

Para que las transiciones entre niveles Zeeman en una muestra produzcan una señal en el receptor del aparato de RMN se debe satisfacer la condición de resonancia. El método más usado actualmente para llegar a tal condición y así obtener un espectro es el método de pulsos ó de transformada de Fourier. En éste, todos los núcleos de una especie de la muestra son excitados simultáneamente por un pulso de radiofrecuencia que opera a una frecuencia ν_1 y que ocasiona que el vector de magnetización M_0 salga del eje z. En el instante en el cual el pulso termina, el vector de magnetización M_0 precesa alrededor del eje z con la frecuencia de Larmor; el sistema regresa a su estado de equilibrio sobre el eje z vía relajación con M_z regresando a su valor original M_0 , mientras M_x y M_y tienden a cero. Este decaimiento de la magnetización transversal (es decir, el decaimiento en la magnetización en M_x y M_y) es observado por el detector y lleva el nombre de FID por sus siglas en inglés, *free induction decay*. Vía aplicación de la operación matemática llamada *transformada de Fourier* al FID, que está en función del tiempo, $f(t)$, se obtiene el espectro en función de la frecuencia, $g(\omega)$ [19].

2.2.2 Apantallamiento, desplazamiento y acoplamiento

Las señales en el espectro de resonancia se ven influenciadas en formas características por el ambiente químico del núcleo en observación. Así, los núcleos que no son químicamente equivalentes son apantallados en diferentes grados por su ambiente electrónico y magnético y, como consecuencia, dan diferentes señales de resonancia en el espectro. De esta forma, la condición de resonancia se reescribe como:

$$\nu_1 = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| (1 - \sigma) B_0,$$

donde σ es la constante de apantallamiento, una magnitud adimensional que es del orden de 10^{-5} para protones y que depende solamente de los ambientes magnético y electrónico del núcleo en observación.

En la espectroscopía RMN no hay una escala absoluta porque la frecuencia de excitación y la intensidad del campo magnético son interdependientes como consecuencia de la condición de resonancia. Se usa una escala relativa donde se mide la diferencia de frecuencia $\Delta\nu$ entre las señales de resonancia de la muestra y la señal de un compuesto referencia. Los valores de $\Delta\nu$ dependen de B_0 , por lo que se define una magnitud, δ , el desplazamiento químico, como sigue:

$$\delta_{muestra} = \frac{\nu_{muestra} - \nu_{referencia}}{\nu_{referencia}}$$

El valor de δ suele ser muy pequeño, por lo que suele ser dado en ppm.

Los dipolos magnéticos vecinos no-equivalentes en una molécula interactúan entre ellos, a lo cual se llama *acoplamiento*. Este acoplamiento espín-espín afecta al campo magnético en las posiciones de los núcleos en observación: el campo efectivo es más fuerte o más débil de lo que sería en ausencia del acoplamiento y, de acuerdo con la condición de resonancia, esto altera las frecuencias de resonancia. El acoplamiento espín-espín indirecto se da a través de los enlaces químicos, pero los dipolos nucleares también se pueden acoplar entre ellos a través del espacio; a esto se le llama acoplamiento espín-espín directo [19].

2.2.3 Experimentos en dos dimensiones

Un espectro de RMN en dos dimensiones es aquel en el cual dos coordenadas ortogonales, las ordenadas y las abscisas, son coordenadas de frecuencia, mientras que las intensidades de las señales se suelen graficar en una tercera dimensión. Los experimentos en dos dimensiones más útiles son aquellos en los cuales la posición de la señal indica correlación entre dos desplazamientos químicos. Los métodos en dos dimensiones están basados en los acoplamientos entre dipolos nucleares, los cuales no necesariamente son acoplamientos escalares (a través de los enlaces), sino que también pueden ser dipolares (a través del espacio, por ejemplo). Esto abre la posibilidad de elucidar la estructura tridimensional de las moléculas [19, 28].

Es posible esquematizar de una forma general todos los experimentos de dos dimensiones en cuatro periodos: preparación, evolución, mezclado y detección. En el periodo de preparación se adecúa la magnetización transversal; en el periodo de evolución se modula la coherencia en un tiempo t_1 que no es fijo, sino que incrementa sistemáticamente en una serie de experimentos. En el tiempo de mezclado la coherencia presente tras t_1 es convertida en una señal observable que es observada en el periodo de detección, t_2 [28].

El experimento TOCSY (Total COrrelation SpectroscopY) consiste en excitar selectivamente la resonancia de un único protón a la vez en la molécula para identificar las resonancias de los demás protones que pertenezcan al mismo sistema de espín (acoplamiento espín-espín indirecto). En este espectro de dos dimensiones los picos en la diagonal corresponden aquellos en el espectro en una dimensión, mientras que los picos fuera de la diagonal muestran las correlaciones entre los protones que pertenecen al mismo sistema de espín.

Las interacciones dipolo-dipolo a través del espacio son también llamadas *efecto nuclear Overhauser*, NOE, y se trata de acoplamientos espín-espín directos. El experimento que corresponde a tales interacciones lleva por nombre NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) y consiste en la transferencia de una

pequeña proporción de la polarización de un núcleo A a otro X y viceversa. En el espectro se muestran señales en la diagonal en (ν_A, ν_A) y (ν_X, ν_X) , así como señales en (ν_A, ν_X) y (ν_X, ν_A) , que son picos de correlación e indican proximidad espacial entre los núcleos A y X . La intensidad de una señal NOE depende en proporción inversa a la distancia elevada a la sexta potencia entre los núcleos bajo estudio [19].

3. Diseño experimental y metodología

3.1 Transformación de M2Tx1

El plásmido pET32-a-M2Tx1 contiene la secuencia de bases nitrogenadas que, al ser expresada, codifica para la proteína de fusión. Tal proteína está formada por cuatro partes principales: tiorredoxina, una proteína chaperona cuya función es favorecer el plegamiento de otras proteínas (en este caso el de M2Tx1), una cadena de seis histidinas que es útil para purificar a la proteína, un sitio de reconocimiento de trombina y la proteína objetivo, que es la M2Tx1.



Figura 2. Representación de la proteína de fusión donde se indican los cuatro dominios de ésta. La tiorredoxina favorece el plegamiento de M2Tx1, las seis histidinas son necesarias en la etapa de purificación y LVPRGS es el sitio de reconocimiento de trombina.

Se llevó a cabo la transformación con el plásmido pET32-a-M2Tx1 en la cepa Rosetta de *E. coli*. Las células competentes de Rosetta son conservadas con CaCl_2 a -70°C y se hallan a una concentración de 5×10^{-7} células/mL en un volumen de $100 \mu\text{L}$. El procedimiento consiste en agregar de 3 a $5 \mu\text{L}$ del plásmido, cuya concentración oscila entre los 50 y $80 \text{ ng}/\mu\text{L}$, al tubo de microfuga en el cual se hallan las células. Se mantiene el tubo con las células durante media hora en hielo, tras lo cual se da un choque térmico de 45 segundos a 42°C . Se dejan reposar por cinco minutos en hielo, se les agrega $450 \mu\text{L}$ de medio LB y posteriormente se cultivan por una hora a 37°C sin agitación. Una vez transcurrido este tiempo se siembran las células en una caja Petri que contiene ampicilina, el antibiótico al cual es resistente la cepa Rosetta, y cloranfenicol, al cual deben ser resistentes las células transformadas dado que el plásmido pET32-a confiere resistencia a tal antibiótico. Las cajas se dejan reposar durante 12 horas a 37°C y, posteriormente, son almacenadas a 4°C .

3.2 Expresión de M2Tx1

Se prepararon 6.2L de medio LB (medio Luria Bertani, 10g de Bacto Triptona, 5g de extracto de levadura y 15g de NaCl por litro de medio) distribuidos en cuatro matraces Fernbach con 1.5L cada uno y 200mL en un matraz Erlenmeyer de 500mL. Se esterilizó el medio LB en autoclave a 120°C y 16 PSI. Se agregaron ampicilina (0.1mg/mL) y cloranfenicol (0.034mg/mL) previamente esterilizados por filtración con membrana de 0.22µm al matraz Erlenmeyer de 500mL, se tomó una colonia de la cepa transformada y se cultivó durante 14 horas a 37°C; éste es el preinóculo.

Después de que el preinóculo creció por 14 horas, se agregó ampicilina previamente esterilizada por filtración a cada uno de los matraces Fernbach y se añadió a cada uno 50mL del preinóculo. Se incubó a 37° hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento, que se monitorea midiendo la densidad óptica a 600nm, y se indujo una vez que ésta fue de aproximadamente 0.700 unidades de absorbancia. La inducción se llevó a cabo con IPTG 0.5mM, tras lo cual continuó la incubación pero a una temperatura de 30°C por 14 horas más.

3.3 Lisis celular

Pasadas las 14 horas de incubación se centrifugó el cultivo a 6500xG a 4°C por 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en aproximadamente 250mL de disolución amortiguadora de lisis (150mM de NaCl, 50mM de Tris/HCl pH=8). Se colocó en hielo la suspensión y se lisaron las células con un sonicador Misonix 3000. Los pulsos fueron de 15 segundos a 40W más 30 segundos de descanso hasta completar un tiempo de 10 minutos de pulsaciones. Después se centrifugó la suspensión a 39000xG a 4°C durante media hora; se descartó el botón y se filtró el sobrenadante con filtros de tamaño de poro de 22 µm.

3.4 Primera purificación por CAMQ

La purificación se llevó a cabo por cromatografía de afinidad metal-quelato (CAMQ) usando una columna HiTrap de Ni²⁺; el flujo al pasar por la columna fue

de 5mL/min y todas las disoluciones que pasaron a través de la columna CAMQ fueron previamente filtradas (tamaño de poro: 22µm). Se pasaron 10mL de agua por la columna, seguidos de 10mL de EDTA 0.1M, posteriormente 10mL de agua, 5mL de una disolución de Ni²⁺ 0.1M y finalmente 40mL de agua; a esto se le llama *regenerar la columna*. Posteriormente, se pasaron 60mL de disolución amortiguadora de lisis a través de la columna para equilibrarla, seguidos del sobrenadante del paso anterior; se colectó la fracción obtenida durante el paso del sobrenadante por la columna de afinidad, que es el lavado de la columna. Finalmente, se hizo pasar disolución amortiguadora de lisis con 500mM de imidazol, se colectó la fracción eluída por separado del lavado de la columna y se etiquetó como “eluato”. Para guardar la columna se lavó con 50mL de agua y 50mL de EtOH.

3.5 Diálisis y reacción de corte

La diálisis se llevó a cabo colocando dentro de membranas de diálisis 8000MW la fracción etiquetada como “proteína de fusión”. Las membranas, una vez llenas, fueron puestas en agitación en un litro de disolución amortiguadora de diálisis (75mM de NaCl, 50mM de Tris/HCl pH=8). Se cambió la disolución amortiguadora cada media hora hasta haber usado tres litros de ésta.

La reacción de corte se realizó con la proteasa trombina, que se encuentra inmovilizada en agarosa. Se agregaron 200µL de trombina a la disolución dializada más suficiente CaCl₂ 500mM para que quedara 5mM en la reacción de corte. Se dejó en agitación por 12 horas a temperatura ambiente, tras lo cual se separó la trombina inmovilizada en agarosa del resto de la mezcla de reacción vía centrifugación a 500xG. La trombina se guardó en una disolución de glicerol al 50% y 20mM de Tris pH=8.0 a 4°C.

3.6 Segunda purificación por CAMQ

Se repitió el proceso realizado durante la primera purificación por CAMQ, colectándose por separado las fracciones correspondientes al lavado de la columna y al eluato.

Se comprobó el estado de la purificación de M2Tx1 en diferentes etapas de la purificación mediante geles de poliacrilamida-SDS de electroforesis. Éstos separan a las proteínas dependiendo de su tamaño en un intervalo desde 5 a 2000kDa, permitiendo así observar el tamaño de las proteínas que se encuentran en una determinada muestra.

3.7 Purificación por HPLC

El último paso de la purificación se llevó a cabo vía Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés, High Performance Liquid Chromatography) de fase reversa en un aparato Pro-Star Varian equipado con un sistema de disolventes con gradiente binario y en una columna Júpiter Proteo (250mm por 4.6mm, Phenomenex) usando un gradiente lineal de 13 a 19% de acetonitrilo-agua con 0.05% de TFA (ácido trifluoroacético) en 20 minutos a un flujo de 1mL/min.

3.8 Determinación de la masa de M2Tx1

Se determinó la masa de la toxina purificada mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. La matriz empleada para preparar la muestra fue ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en proporción 1:5 y el experimento se llevó a cabo en un aparato Bruker Daltonics MALDI-TOF.

3.9 Obtención de los espectros TOCSY y NOESY

Se preparó la muestra disolviendo la proteína obtenida en 95% H₂O y 5% D₂O. Los espectros de RMN fueron obtenidos a 25°C en un espectrómetro Varian de 500MHz. Los espectros TOCSY fueron obtenidos con tiempos de mezclado de 27ms, mientras que los espectros NOESY se adquirieron usando tiempos de mezclado de 100 y 300ms. Se usó la supresión de agua DPGSE durante la obtención de ambos espectros. Ambos experimentos fueron adquiridos usando 2048 y 1024 puntos complejos en las dimensiones directa e indirecta, respectivamente.

3.10 Procesamiento y análisis de los espectros

Se utilizó el software NMRDraw y NMRpipe para el procesamiento de los espectros. Para la asignación de los espectros se utilizó el programa CARA1.5. Con las restricciones obtenidas del espectro NOESY se calcularon tres estructuras en CYANA 2.1, asumiendo: puentes disulfuro convencionales, puentes disulfuro como lo indica la nueva familia de toxinas [5] y sin tomar en cuenta su existencia. Se seleccionó el ensamble de estructuras que cumple con el mayor número de restricciones dadas por los NOEs.

Finalmente se realizó el afinamiento de las estructuras por dinámica molecular con el programa AMBER 9 [29]; tal afinamiento consta de dos pasos. El primero fue una simulación en vacío, que consiste en una minimización energética (1,000 pasos), dos ciclos de recocido (“annealing”) y una segunda minimización (2,000 pasos). Cada ciclo de recocido consta de 30,000 pasos con un tiempo total de dinámica de 30ps a temperatura constante y con el algoritmo de Berendsen [30]. El segundo paso del afinamiento, que es una minimización con agua como disolvente explícito, se llevó a cabo en cuatro etapas, antes de las cuales fue necesario nulificar la carga de la proteína añadiendo los contraiones Cl^- necesarios y colocar una caja de agua (TIP3P) dejando 10Å de separación entre los bordes de ésta y los átomos más externos de la proteína. La primera etapa fueron tres ciclos de calentamiento lento (de 0 a 50K, de 50 a 100K y de 100 a 300K) a volumen constante. Cada ciclo consta de 20,000 pasos con un tiempo de dinámica de 40ps cada uno. La segunda etapa constó de dos ciclos a 300K y presión de 1atm (NPT). Cada ciclo consta de 20,000 pasos con un tiempo de dinámica de 40ps cada uno. La tercera etapa fueron tres ciclos a volumen constante y 300K (NVT). Los ciclos constan de 20,000, 30,000 y 100,000 pasos con tiempos de dinámica de 40, 60 y 100ps, respectivamente. La última etapa consistió en una minimización de energía (2,000 pasos) con disolvente explícito. El tiempo total de cómputo fue de 60h y el campo de fuerza utilizado fue ff99SB.

4. Resultados y discusión

4.1 Transformación

Se sembraron dos cajas Petri con ampicilina y cloranfenicol: una con las células a las cuales se transformó y otra con un blanco negativo, que son células a las cuales no se les agregó el plásmido pET32-a-M2Tx1. Es importante notar que la cepa Rosetta de *E. coli* es resistente sólo a ampicilina. En la caja Petri del blanco negativo no crecieron colonias, lo cual confirma que las células sin transformar no son resistentes a cloranfenicol. Por su parte, en la caja de células transformadas sí se hallaron colonias, lo cual indica que éstas adquirieron el plásmido pET32-a-M2Tx1 y éste a su vez les confirió la resistencia a cloranfenicol.

4.2 Expresión de M2Tx1

La cepa Rosetta de *E. coli* contiene un promotor llamado lacUV5, que forma parte del operón lac y que es inducible con IPTG. El promotor lacUV5 promueve la transcripción directa del gen de la T7 RNA polimerasa, quien a su vez transcribe el DNA objetivo en el plásmido, en este caso el mensaje para la proteína de fusión. De esta forma, el IPTG favorece la producción de la proteína de fusión por parte de la célula [31].

Una vez transformadas las células con el plásmido pET32-a-M2Tx1 se llevó a cabo una cinética de expresión para determinar el tiempo en el cual se recupera la mayor cantidad de proteína. Se tomaron muestras de 1mL cada hora a partir del tiempo cero (inducción con IPTG) y cada dos horas a partir de las 10 horas hasta llegar a 24 horas. Las muestras fueron centrifugadas a 6500xG por un minuto, se descartó el sobrenadante, se resuspendieron los botones en 60µL en disolución amortiguadora de lisis y se lisó. Se centrifugó una segunda vez para separar las partículas insolubles de las solubles y se realizaron dos geles poliacrilamida-SDS para evaluar la cantidad de M2Tx1 presente en las fracciones soluble e insoluble.

La proteína de fusión, que pesa 20.22kDa, fue sobreexpresada al inducir su producción con IPTG 0.5mM, por lo que se halla en una concentración mayor a la

de las demás proteínas de la disolución y es fácilmente identificable en el gel. La banda más intensa entre los marcadores de pesos moleculares 26.6 y 17.0 es la correspondiente a ésta y su intensidad está directamente relacionada con la concentración de proteína en la muestra.

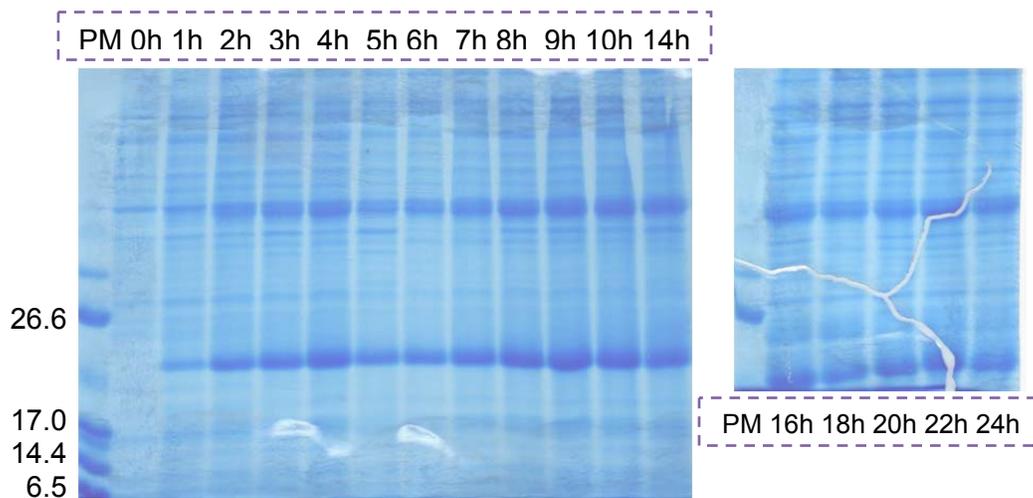


Figura 3. Geles de poliacrilamida-SDS de la fracción soluble (sobrenadante) obtenida tras la lisis celular. Los carriles etiquetados como “PM” corresponden a marcadores de pesos moleculares en kDa; sus valores están indicados a la izquierda del primer gel. Los demás carriles indican el tiempo tras el cual fue tomada la muestra de células, donde 0h corresponde al momento de la inducción de la producción de M2TX1 con IPTG.

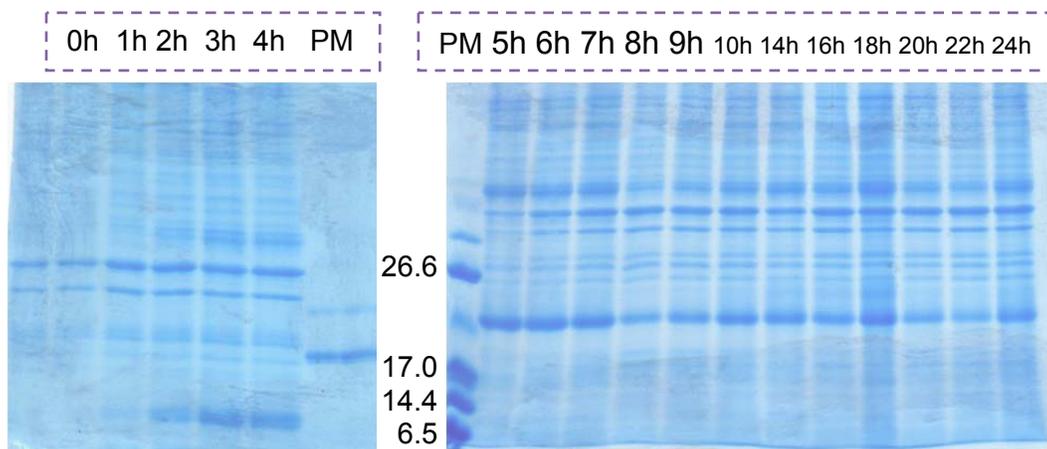


Figura 4. Geles de poliacrilamida-SDS de la fracción insoluble (botones) obtenida tras la lisis celular. Los valores de los marcadores de pesos moleculares en kDa están indicados entre los geles. Los demás carriles indican el tiempo tras el cual fue tomada la muestra de células, con 0h correspondiendo al momento de la inducción con IPTG.

En los geles, se observa que 14 horas después de la inducción de la producción de M2Tx1 no hay aumento en la cantidad de proteína producida, por lo que se seleccionó éste como tiempo adecuado para la producción de M2Tx1.

Se aprecia que, a pesar de haber una cantidad considerable de proteína de fusión en los botones (fracción insoluble), la mayor parte de ésta se halla en el sobrenadante o fracción soluble, por lo que se decidió trabajar con esta fracción. No obstante, se volvió a lisar la fracción insoluble en espera de obtener más de proteína soluble. Los resultados fueron positivos y se encuentran en la figura 5, gel en el cual se observa que aún había proteína de fusión en el botón que se obtuvo tras la centrifugación del producto de la primera lisis, lo cual es indicativo de una lisis celular incompleta. En posteriores expresiones y con el objetivo de mejorar la lisis se realizaron pulsos hasta completar 20 minutos en lugar de 10.

4.3 Primera purificación por CAMQ

En este paso se hizo pasar el sobrenadante del paso anterior a través de una columna de afinidad metal-quelato. Conforme el sobrenadante pasa a través de la columna, algunas de las proteínas que éste contiene se coordinan con el Ni^{2+} que está dentro de la columna y, por tanto, son retenidas por ésta. Las proteínas que no se coordinan con el Ni^{2+} simplemente pasan y salen de la columna. La proteína de fusión está especialmente diseñada para interactuar con la columna CAMQ porque tiene una cadena de seis histidinas que se coordinan al Ni^{2+} ; así, se espera que la proteína de fusión quede retenida en la columna.

Se colectó la fracción correspondiente a la disolución de proteínas que no interaccionan con la columna, llamada lavado de la columna. Posteriormente, se hizo pasar una disolución con imidazol por la columna. Éste se coordina muy fuertemente con el Ni^{2+} y desplaza a las proteínas que habían quedado retenidas, por lo que éstas son eluidas; se colecta la segunda fracción, llamada eluato. Se realizó un gel de electroforesis para comprobar la eficiencia de este paso (figura 5).

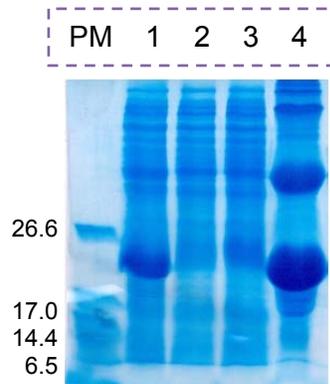


Figura 5. Gel de poliacrilamida-SDS realizado tras la primera purificación por CAMQ. El carril PM son los marcadores de pesos moleculares en kDa, cuyo valor está indicado a la izquierda del gel. En el carril 1 se encuentra el relisado de la fracción insoluble. Los carriles 2 y 3 corresponden al lavado de la columna. En el carril 4 se halla el eluato.

En los carriles 2 y 3, que corresponden al lavado de la columna, no se observa presencia de proteína de fusión (que debería estar entre los marcadores de 26.6 y 17.0), lo cual permite concluir que la columna CAMQ retuvo eficientemente a la proteína de fusión. En el carril 4 se observa la banda que corresponde a la proteína de fusión, que fue eluída de la columna eficientemente con imidazol. Así, se procedió a trabajar con el eluato y se descartó el lavado de la columna.

4.4 Reacción de corte

Tras el paso por la CAMQ la disolución de proteínas entre las cuales se encuentra la proteína de fusión tiene imidazol, que inhibe la reacción de corte con trombina. Por esta razón, se llevó a cabo una diálisis, que tiene como objetivo retirar el imidazol de la disolución para proceder a la reacción de corte.

La proteína de fusión tiene un sitio de reconocimiento de trombina, que no es sino una secuencia de cinco aminoácidos (LVPRGS). Así, se lleva a cabo una reacción en la cual la trombina reconoce tal secuencia de aminoácidos y la hidroliza entre los aminoácidos R y G, dejando por una parte a la tiorredoxina, la cadena de histidinas y la secuencia LVPR y por la otra a la proteína de interés, en este caso

la M2Tx1, con el GS del sitio de reconocimiento de trombina en el extremo amino terminal.

Antes de llevar a cabo la reacción de corte es necesario realizar una cinética de corte para determinar el tiempo en el cual la trombina corta a la proteína de fusión. Las condiciones de corte fueron: 1mL de reacción de corte (en disolución amortiguadora de lisis, pH=8) con 3mg de proteína de fusión, 300 μ L de trombina (tomados de una suspensión de trombina-agarosa al 50%) y CaCl₂ 5mM a temperatura ambiente y con agitación. Se tomaron muestras cada hora hasta completar seis horas. Los resultados se muestran en la figura 6.

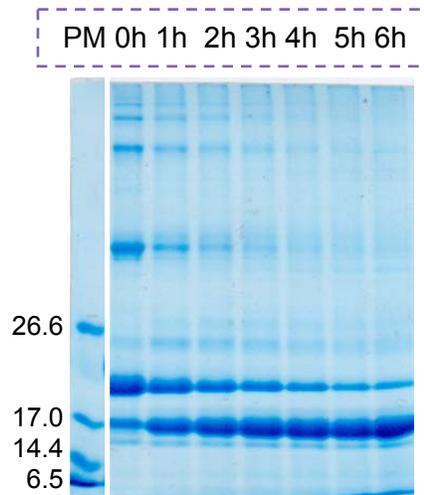


Figura 6. Gel de poliacrilamida-SDS de la cinética de corte de la proteína de fusión con trombina. Están indicados los valores de los marcadores de PM en kDa.

En el gel de la cinética de corte con trombina se observó la desaparición de la banda que corresponde a la proteína de fusión (20.22kDa) dado que está siendo cortada en dos partes: el fragmento Trx-HHHHHH-LVPR, cuya banda está en 17.02kDa y el fragmento GSM2Tx1, cuya banda no se ve en el gel dada su pequeña masa (3.35kDa).

Después de cinco horas de reacción de corte con trombina se observó que la reacción no avanzaba más puesto que se dejó de apreciar un cambio en la cantidad de proteína de fusión en la muestra; se tomó tal tiempo para llevar a cabo la reacción dado que ya se había obtenido suficiente proteína.

Pero es muy diferente realizar el corte de 3mg de proteína de fusión con 300µL de trombina que realizarlo para 246mg de proteína de fusión con la misma cantidad de trombina. Ya que no se disponía de una mayor cantidad de trombina, se decidió dejar por más tiempo la reacción de corte (por 14 horas), en espera de que se cortara la mayor cantidad de proteína de fusión posible. El gel realizado para evaluar la eficiencia del corte se encuentra en la siguiente sección.

4.5 Segunda purificación por CAMQ

Se realizó una segunda purificación por CAMQ para separar los residuos del corte (TrxHHHHHHLVPR y la proteína de fusión que no fue cortada) del producto del corte, la GSM2Tx1. En la columna se retuvieron los residuos de corte mientras que la GSM2Tx1, al no coordinarse con el Ni²⁺ dentro de la columna, salió de la columna inmediatamente. Finalmente los residuos del corte fueron eluidos con imidazol.

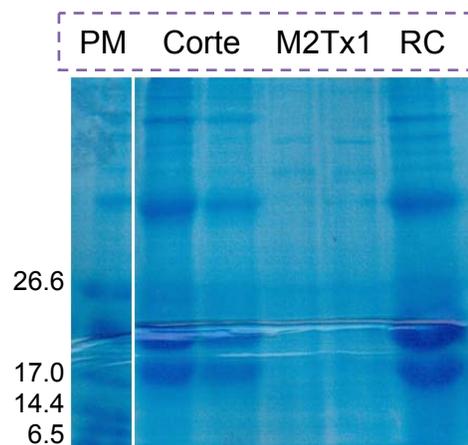


Figura 7. Gel de poli-acrilamida-SDS, los marcadores de PM están indicados en kDa. En los carriles “corte” se muestran los productos del corte con trombina. En los carriles M2Tx1 se muestra el lavado de la columna tras la segunda purificación por CAMQ. En el carril RC se muestran los residuos del corte (eluato de la segunda purificación por CAMQ).

En los carriles etiquetados “corte” se observa que la reacción de corte con trombina llegó a ≈50% de eficiencia tras 14 horas. En los carriles de la M2Tx1 no se observa la banda esperada puesto que la toxina pesa muy poco y por tanto salió del gel. El carril etiquetado “RC” muestra los residuos del corte. Se ven las

bandas correspondientes a la proteína de fusión que no se cortó (20.22kDa) y al residuo de corte (Trx-HHHHHH-LVPR), cuya banda está en 17.02kDa.

4.6 Purificación por HPLC

Se optimizó un gradiente (tabla 1) con el cual M2Tx1 eluye a los 15 minutos.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	%H ₂ O	%ACN
0.0	1	90.00	10.00
3.0	1	90.00	10.00
5.0	1	87.00	13.00
25.0	1	81.00	19.00
26.5	1	90.00	10.00
31.5	1	90.00	10.00

Tabla 1. Gradiente empleado en la purificación por HPLC de M2Tx1.

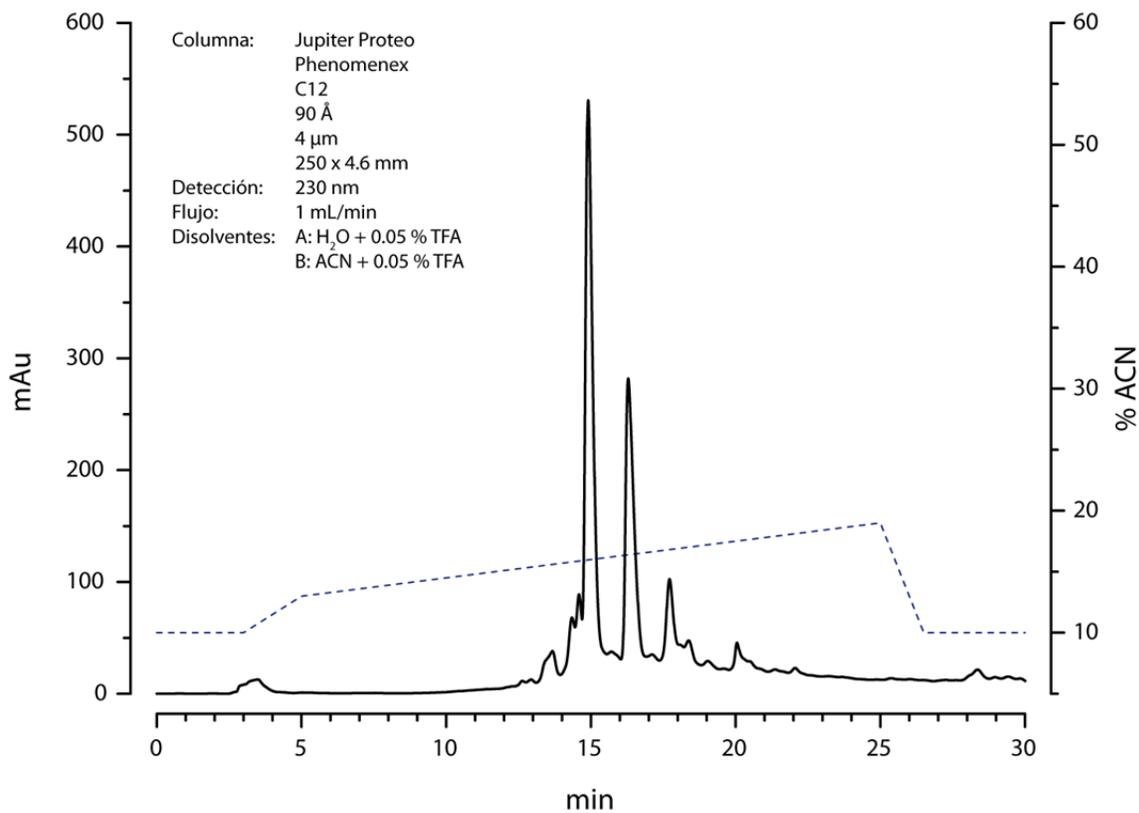


Figura 8. Cromatograma de la separación por HPLC de M2Tx1, que eluye a los 15 minutos.

En la figura 8 se muestra uno de los cromatogramas obtenidos al inyectar 1mL de la fracción “M2Tx1” en el HPLC. Se observa un pico principal de intensidad mucho mayor al resto de los picos. Este pico fue colectado y liofilizado.

4.7 Determinación de la masa de M2Tx1

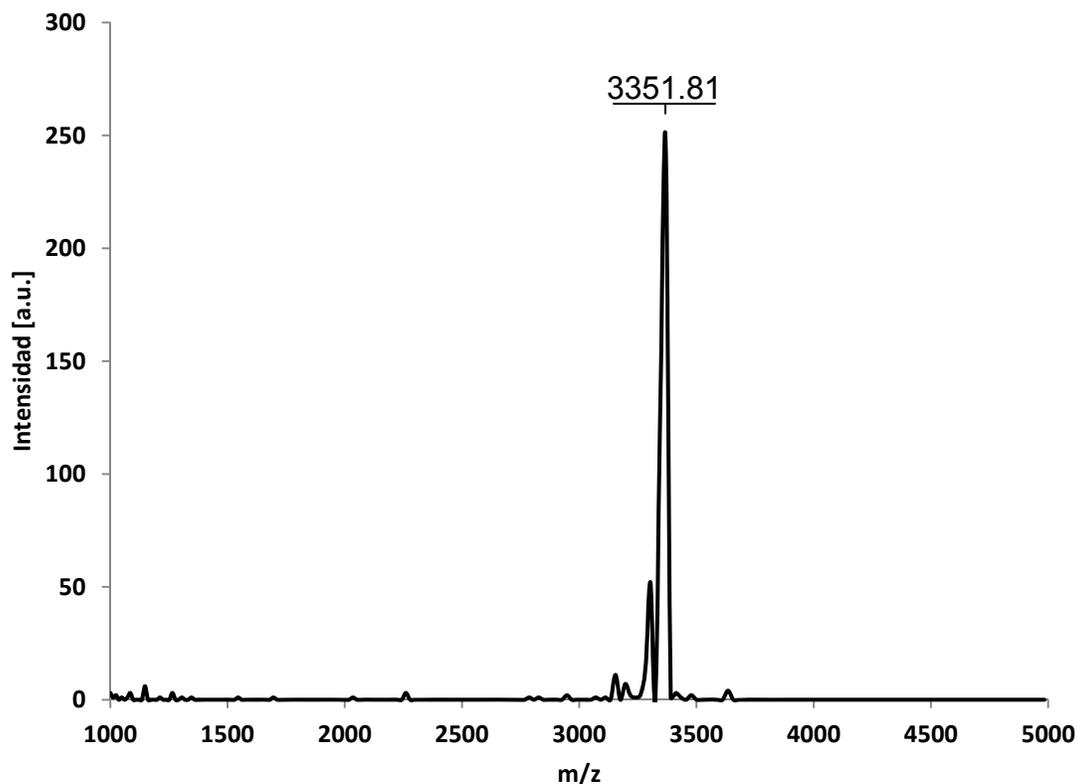


Figura 9. Espectro de masas MALDI-TOF de M2Tx1.

La figura 9 muestra el espectro de masas. Se determinó una masa MALDI-TOF de 3351.8Da para el pico observado en el cromatograma, la cual concuerda con la masa teórica calculada de 3349.97Da. Así, se confirmó que este pico corresponde a M2Tx1 y, por tanto, se procedió a obtener sus espectros de RMN.

4.8 RMN y procesamiento de los espectros obtenidos

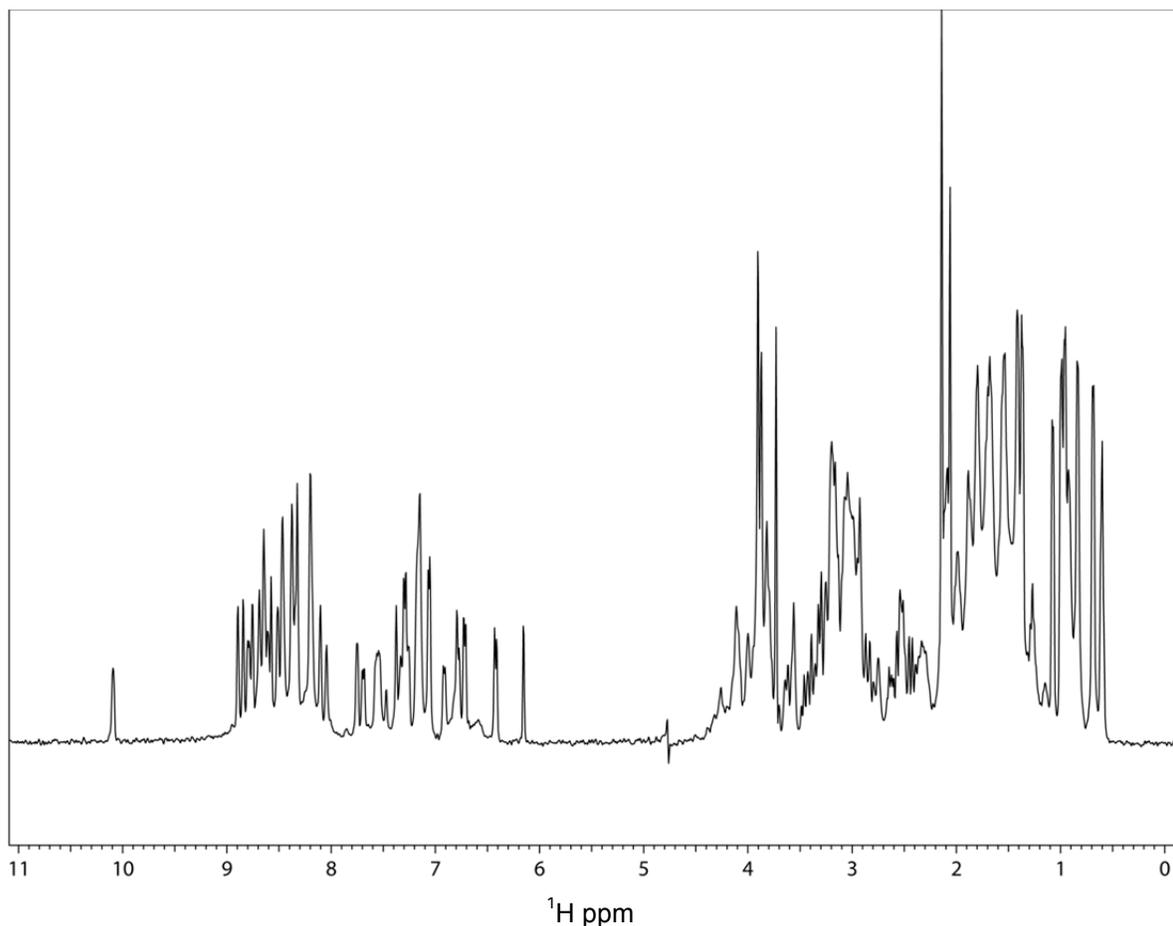


Figura 10. Espectro de ^1H de M2Tx1. La obtención se llevó a cabo a 25°C y se usó la supresión de agua DPGSE.

La dispersión de señales que se observa desde 6 hasta 9ppm y que corresponde a los NH de las amidas de la cadena principal evidencia que M2Tx1 se encuentra plegada. Sabiendo esto se procedió a obtener los espectros en 2D TOCSY y NOESY, que se muestran en las figuras 11 y 12, respectivamente.

Una vez obtenidos los espectros TOCSY y NOESY el primer paso para obtener la estructura tridimensional de M2Tx1 fue asignar los sistemas de espín que se observan en ambos espectros. En este caso, un sistema de espín es un patrón de señales característico para cada aminoácido, aunque hay sistemas de espín muy

similares pertenecientes a diferentes aminoácidos (ver apéndice B). También se realizó la asignación de las señales que indican la secuencia entre los aminoácidos; tales señales se observan solamente en el espectro NOESY. Es indispensable conocer previamente la secuencia de aminoácidos del péptido puesto que ésta y las correlaciones NOE permiten una correcta asignación de señales de aminoácidos secuenciales.

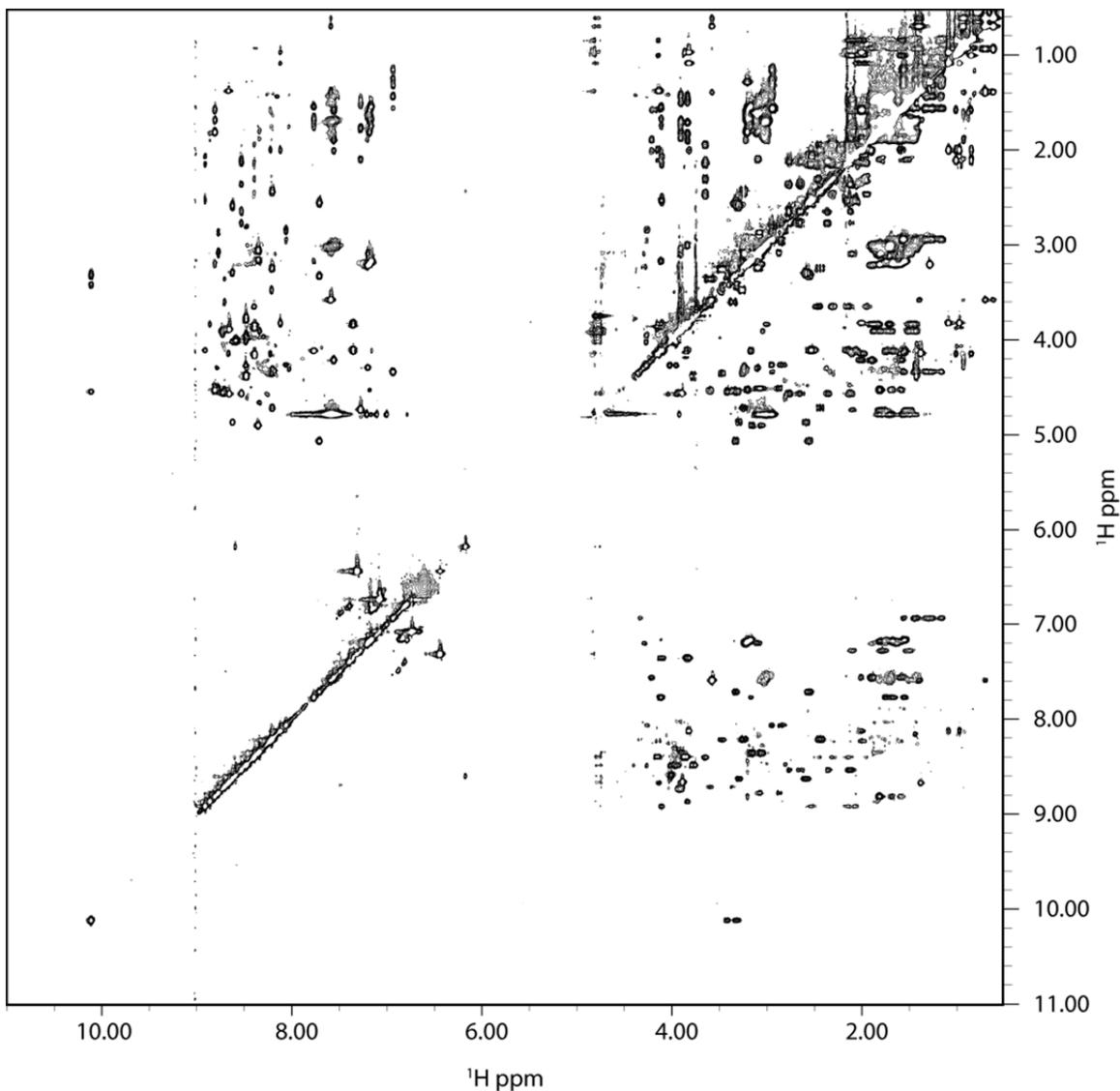


Figura 11. Espectro TOCSY de M2Tx1 obtenido a 25°C en un aparato Varian de 500MHz. La supresión de agua usada fue DPGSE.

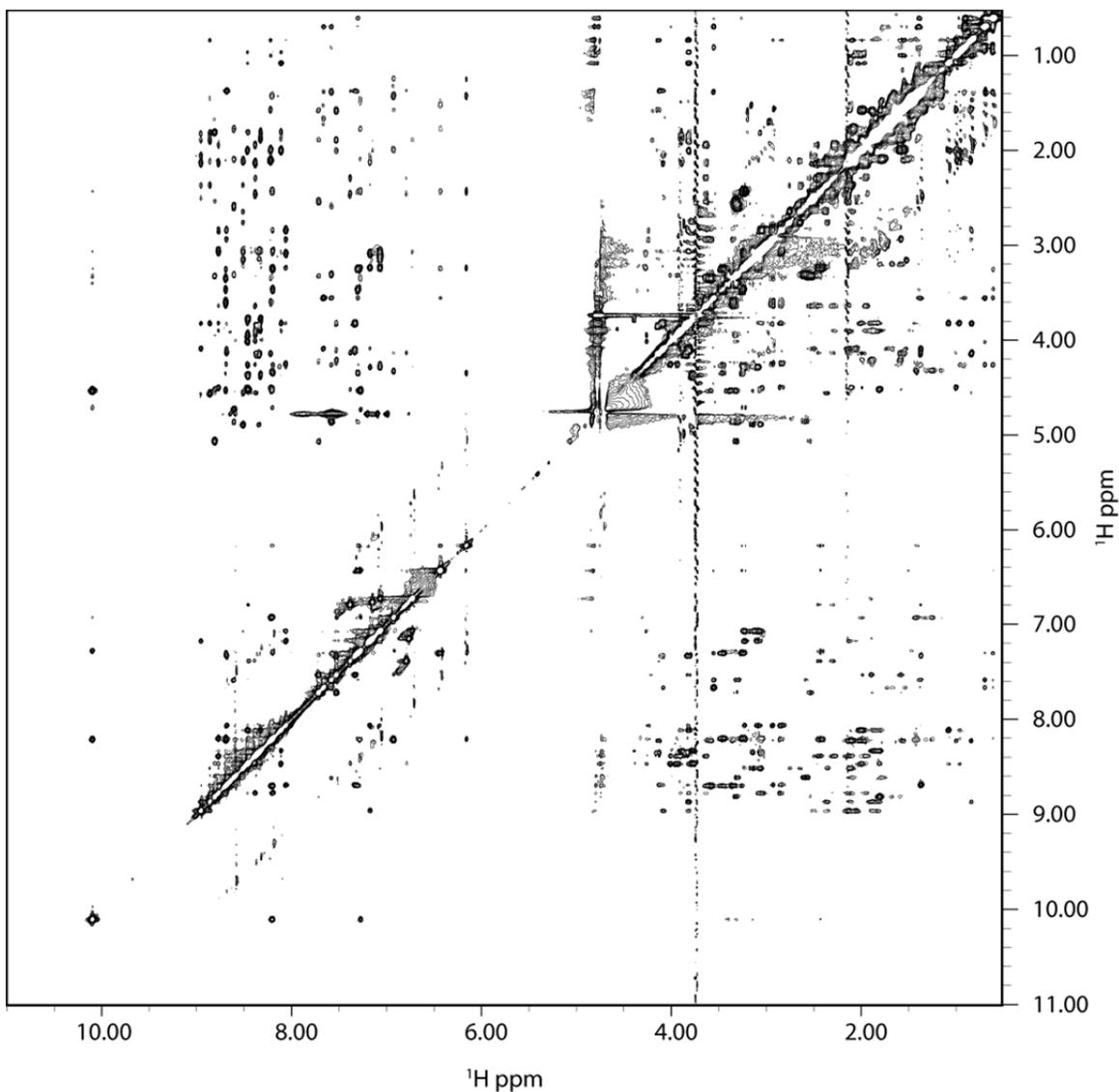


Figura 12. Espectro NOESY de M2Tx1 obtenido a 25°C en un aparato Varian de 500MHz. La supresión de agua usada fue DPGSE.

El procedimiento para asignar los sistemas de espín fue desarrollado por Wüthrich [24]. Primero se localizaron las señales TOCSY del ^1H de amida con los ^1H de la cadena lateral del mismo aminoácido; todas éstas aparecen en el desplazamiento químico del ^1H de amida. A partir de esas señales se hallaron las de correlación de los ^1H de la cadena lateral entre sí, es decir, todo el sistema de espín. Las señales NOE, quienes permiten establecer la correlación entre aminoácidos secuenciales, se buscaron en una dimensión en el desplazamiento químico del ^1H de amida del aminoácido n y en la otra dimensión en el desplazamiento químico

del $^1\text{H}\alpha$ y/o del $^1\text{H}\beta$ del aminoácido n-1. Estas señales sirven también para correlacionar a los aminoácidos que forman estructuras secundarias, lo cual es muy importante para obtener la estructura tridimensional de la toxina.

Se asignaron 27 de los 30 sistemas de espín y sus respectivos NOEs, lo cual corresponde a un 90% de la asignación. Se identificaron NOEs en el desplazamiento químico del ^1HN de la cisteína 26 en una dimensión y en el desplazamiento de los $^1\text{H}\beta$ y del ^1HN de la cisteína 4 en la otra dimensión, lo cual evidencia la existencia de un puente disulfuro entre estos dos aminoácidos.

La intensidad de la señal NOE es proporcional al inverso de la distancia entre los núcleos observados a la sexta. Sabiendo esto y teniendo asignado el espectro NOESY se obtuvieron las restricciones de distancia vía integración de los NOEs.

Posteriormente, se realizó el cálculo de ángulos de torsión, la evaluación de la asignación y el cálculo de la estructura de la proteína con el software CYANA2.0 bajo tres condiciones: 1) imponiendo puentes disulfuro convencionales como restricciones, 2) imponiéndolos como los esperados para la nueva familia [5] y 3) sin restringir la existencia de puentes disulfuro. Al final del proceso se obtuvieron las 20 mejores estructuras calculadas sin violaciones y con la menor energía.

Una forma clara de evaluar el tipo y número de señales NOE usadas para determinar la estructura secundaria y terciaria del péptido es emplear los gráficos que se presentan en la figura 13. En los gráficos de la izquierda se muestran cuántas restricciones NOE fueron usadas para cada rango de distancias; se ve claramente que hay muchas más restricciones a corta distancia que a larga. Las figuras de la derecha despliegan la longitud de las interacciones entre los aminoácidos de M2Tx1. Este análisis es muy valioso ya que son las restricciones NOE de mediano y largo alcance quienes establecen la estructura tridimensional de la toxina.

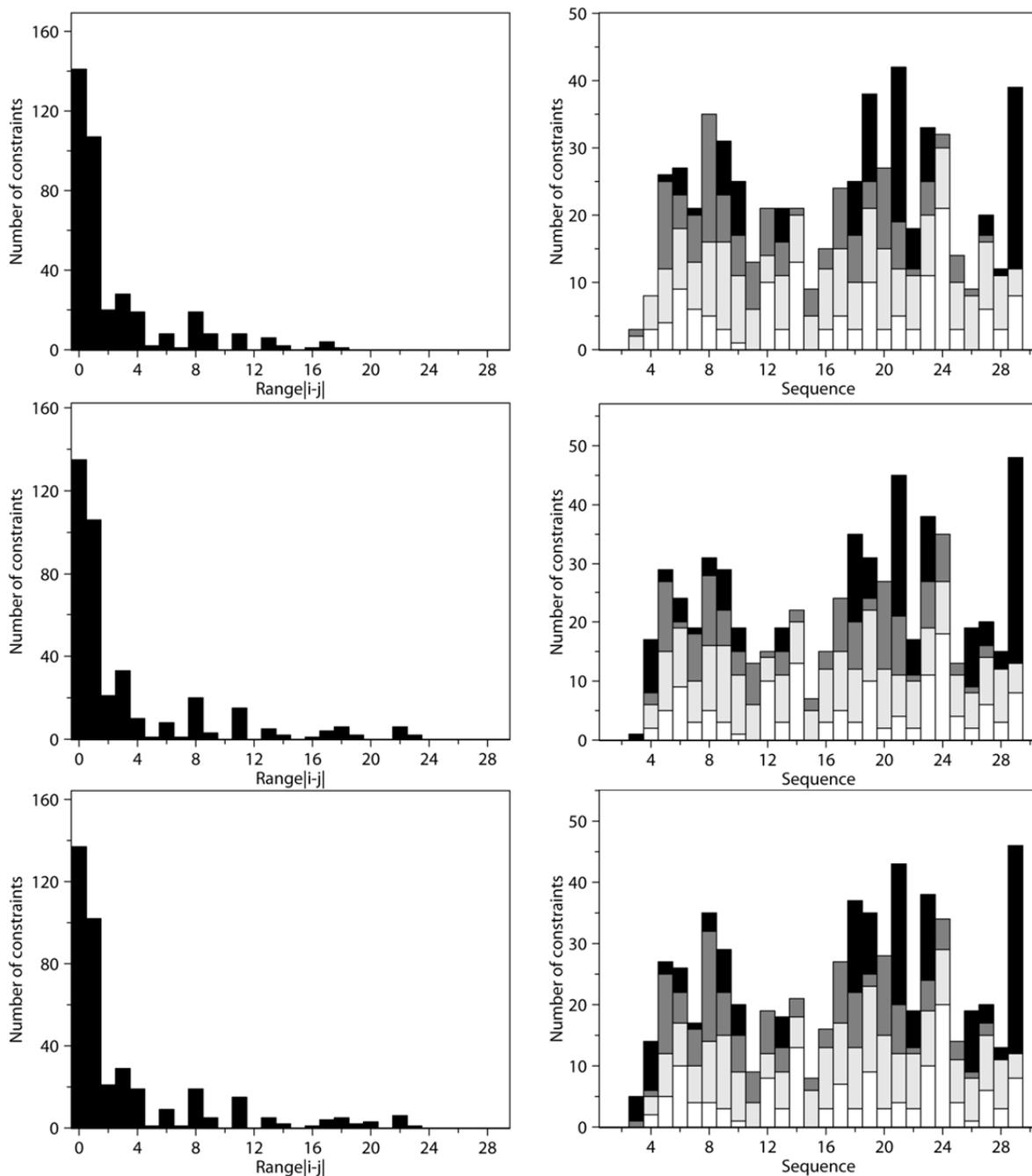


Figura 13. Restricciones de distancias de M2Tx1. En las gráficas de la izquierda se muestra el número de restricciones contra la diferencia entre el índice de los aminoácidos. En las de la derecha se desglosan los tipos de interacción de los residuos: el blanco indica interacciones NOE intrarresiduales ($|i-j|=0$), el gris claro de corto alcance (entre protones de aminoácidos secuenciales, $|i-j|=1$), el gris oscuro de mediano alcance ($1 < |i-j| < 5$) y el negro de largo alcance ($|i-j| \geq 5$). Las gráficas superiores corresponden al ensamble de estructuras calculadas sin puentes disulfuro, las de en medio a las estructuras con puentes convencionales y las de abajo a las estructuras con puentes no convencionales.



Figura 14. Asignación de las señales NOE que evidencian la secuencia de aminoácidos. En las filas $d_{NN}(i, i+1)$, $d_{\alpha N}(i, i+1)$ y $d_{\beta N}(i, i+1)$ la altura de las barras es proporcional a la intensidad de la señal NOE. En las demás filas se indica la presencia de una señal NOE entre los ^1H de los aminoácidos en los extremos de la barra. La figura de arriba corresponde al ensamble de estructuras sin restricción de puentes disulfuro, la de en medio a aquellas con puentes convencionales y la de abajo a las que tienen puentes no convencionales.

El RMSD, quien indica la divergencia entre las coordenadas atómicas de las estructuras comparadas de cada conjunto de 20 estructuras, fue 0.23Å de la estructura con puentes convencionales, 0.33Å con puentes no convencionales y 1.47Å sin puentes disulfuro. El ensamble cuyas estructuras menos divergen entre sí es el que tiene como restricción puentes convencionales, seguido de cerca por aquel con puentes no convencionales.

Posteriormente se realizó un cálculo para determinar la factibilidad de la existencia de los puentes disulfuro. El conjunto de estructuras con puentes convencionales exhiben distancias entre $^1\text{H}\beta$ de las cisteínas de entre 4.05 y 4.35Å para el primer puente, 4.76 y 5.21Å para el segundo y 3.87 a 5.28Å para el tercero; todas estas distancias caen en el rango de lo permitido para un puente disulfuro. Es importante mencionar que las distancias entre los $^1\text{H}\beta$ de las cisteínas 9 y 22, que corresponden a un puente disulfuro no convencional, son mucho menores (2.52-2.68 Å) que aquellas entre los $^1\text{H}\beta$ de las cisteínas 9 y 26, que corresponden al puente disulfuro convencional, aún cuando el conjunto de estas 20 estructuras fue calculado usando como restricción puentes disulfuro convencionales.

El conjunto de estructuras con puentes no convencionales (es decir, los exhibidos por la nueva familia de toxinas [5] y, por tanto, los esperados) presentó distancias entre los $^1\text{H}\beta$ de las cisteínas de 3.46-5.31 para el primer puente, 2.30-3.71 para el segundo y 4.22-5.34 para el tercero. La diferencia de las distancias entre los $^1\text{H}\beta$ de las cisteínas que forman el puente uno convencional contra las que forman el no convencional no es significativa, pero sí es notable que no hay interacción a menos de 5.5Å entre los $^1\text{H}\beta$ de la cisteína 9 y los de la 26, quienes formarían el puente convencional. Así, en la estructura que tiene como restricción los puentes convencionales parece más factible un puente no convencional, mientras que las estructuras cuya restricción son puentes no convencionales son aceptables.

Finalmente, 6 de las 20 estructuras obtenidas sin restringir puentes disulfuro exhiben distancias que van de 3.60 a 5.49Å entre los $^1\text{H}\beta$ de las cisteínas 9 y 22, sugiriendo la existencia de un puente disulfuro no convencional.

Por otra parte, los resultados obtenidos por CYANA muestran que las 20 estructuras sin puentes disulfuro violan más restricciones (que son dadas por la asignación de los NOEs) que aquellas con puentes convencionales, quienes a su vez violan más restricciones que aquellas con puentes no convencionales. Esto significa que las estructuras calculadas con puentes disulfuro no convencionales están más apegadas a la realidad por respetar a un mayor número de asignaciones NOE del espectro; ésta es la evidencia más fuerte de la presencia de puentes disulfuro no convencionales en M2Tx1.

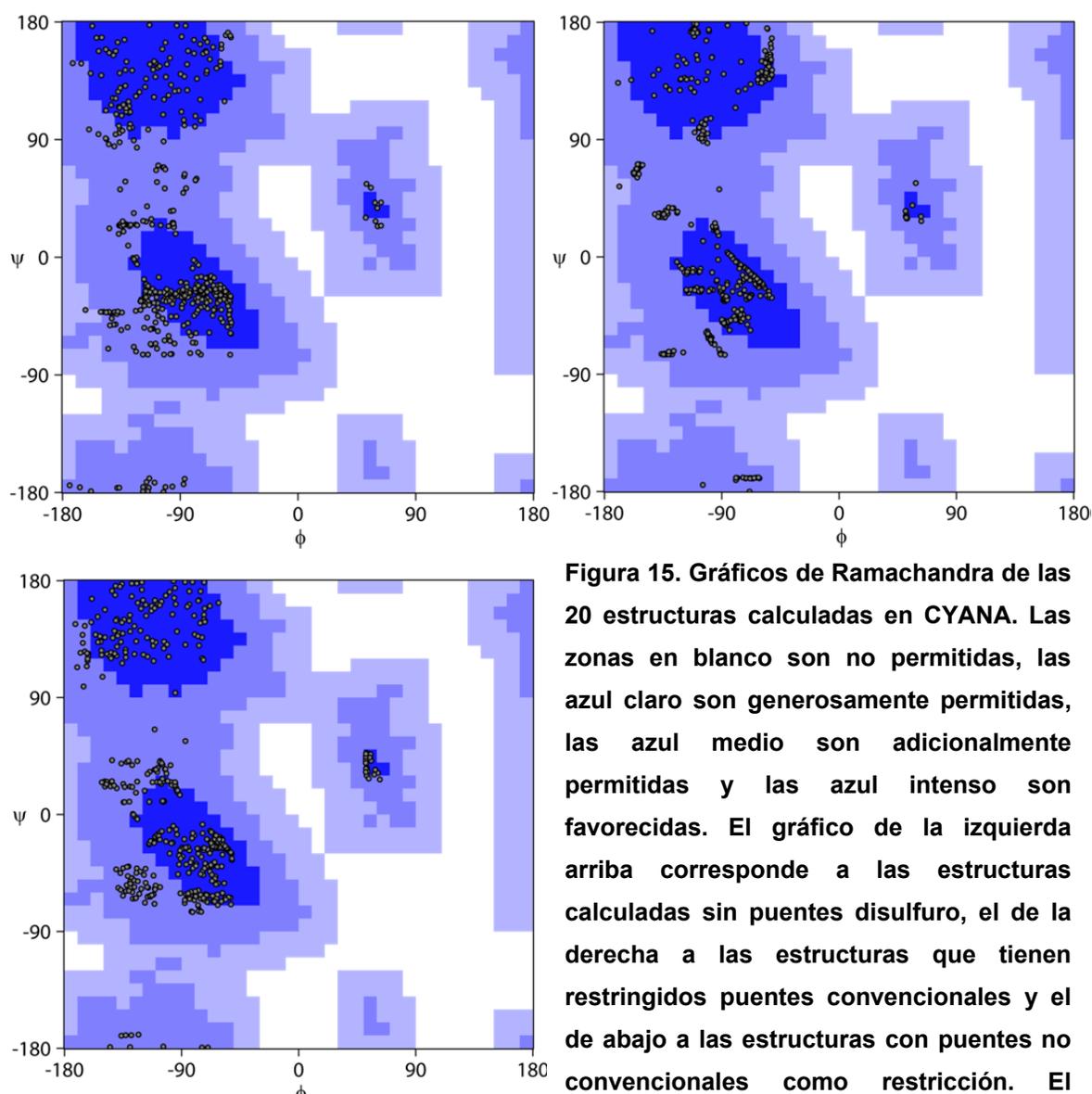


Figura 15. Gráficos de Ramachandra de las 20 estructuras calculadas en CYANA. Las zonas en blanco son no permitidas, las azul claro son generosamente permitidas, las azul medio son adicionalmente permitidas y las azul intenso son favorecidas. El gráfico de la izquierda arriba corresponde a las estructuras calculadas sin puentes disulfuro, el de la derecha a las estructuras que tienen restringidos puentes convencionales y el de abajo a las estructuras con puentes no convencionales como restricción. El

64.8%, el 67.8% y 68.2% respectivamente de las combinaciones de ángulos ψ y ϕ están dentro de la región más favorecida.

En los gráficos de Ramachandra de los tres cálculos realizados en CYANA (figura 15) se observa que en las estructuras que tienen puentes disulfuro no convencionales como restricciones hay un mayor número de combinaciones de ángulos ψ y ϕ que están dentro de la región más favorecida, lo cual termina de confirmar la presencia de puentes disulfuro no convencionales en M2Tx1. En estos gráficos, la combinación de ángulos ψ y ϕ de las Gly no fueron graficados ya que tales ángulos presentan menos restricciones que las del resto de los aminoácidos y, por ende, su gráfico de Ramachandra de regiones permitidas presenta una región favorecida de mayor tamaño. Los valores de los ángulos ψ y ϕ de las Gly de M2Tx1 se encuentran en la tabla 2; todas las combinaciones de ángulos están en la región favorecida del gráfico de Ramachandra para la glicina.

Aminoácido	Φ	Ψ
Gly 3	174.32	-144.34
Gly 11	-99.77	-23.16
Gly 15	127.46	-177.27

Tabla 2. Valores de Φ y Ψ de las glicinas de M2Tx1. Todas las combinaciones de ángulos se encuentran en la región favorecida del gráfico de Ramachandra correspondiente a la glicina.

Finalmente la evidencia que corrobora la existencia de tres puentes disulfuro se halla vía reducción de los mismos. La reducción se llevó a cabo utilizando una disolución amortiguadora de citratos de pH=3.0 y usando como agente reductor TCEP. Tras ser reducido, el péptido ganó seis unidades de masa, lo cual corresponde a la formación de seis grupos tiol. Por cada puente disulfuro existente se forman dos grupos tiol, por lo que se concluye la presencia de tres puentes disulfuro en el péptido.

4.9 Refinamiento de la estructura por dinámica molecular

Conociendo el patrón de puentes disulfuro de M2Tx1 el último paso para obtener su estructura tridimensional fue el refinamiento por dinámica molecular con el programa AMBER 9. Éste devuelve las estructuras cuya energía sea mínima, efectuando cálculos que permitan obtener la estructura más realista posible y que

tome en cuenta la interacción del péptido con el disolvente, que en este caso es agua. La estructura de mínima energía se muestra en la figura 16. Se observa que la representación de listones exhibe las mismas características de estructura secundaria halladas en κ -BUTX-Tt2b y Ts16, que se muestran en la figura 17.

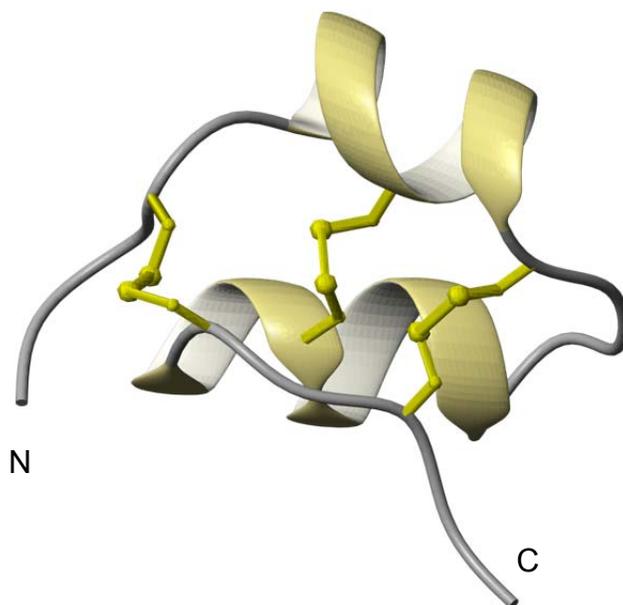


Figura 16. Representación de listones de M2Tx1, se muestran con amarillo los puentes disulfuro. Esta toxina exhibe el motivo estructural α/α estabilizado por cisteínas.

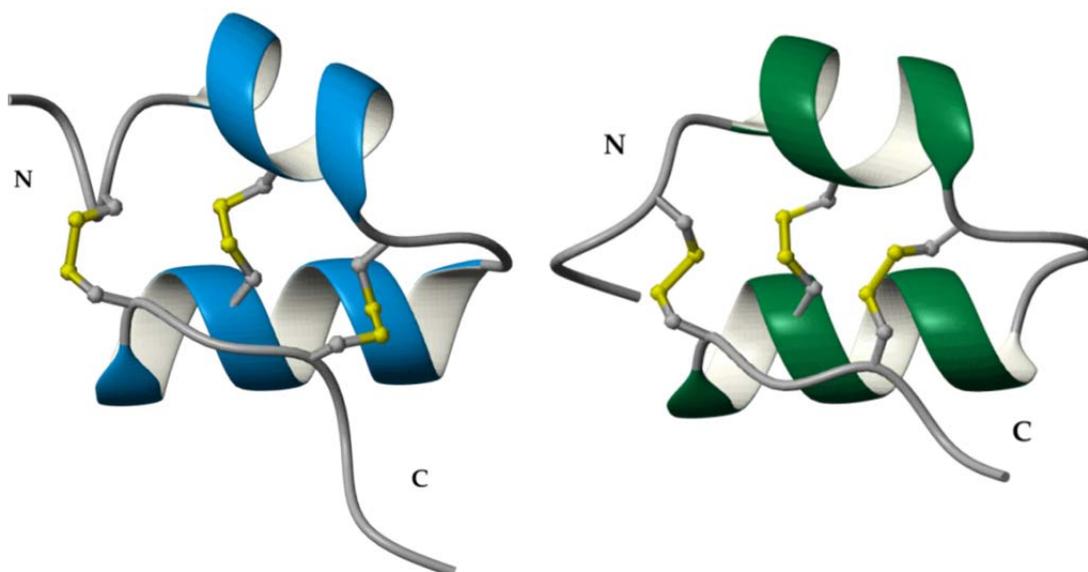


Figura 17. Representación de listones de κ -BUTX-Tt2b (izquierda) y Ts16 (derecha), dos toxinas provenientes de venenos de alacrán y que exhiben el motivo estructural α/α estabilizado por cisteínas. Los puentes disulfuro que forman son no convencionales (C2-C4, C1-C5, C3-C6) para la familia en la cual habían sido originalmente clasificadas.

5. Conclusiones

La estructura tridimensional de M2Tx1 exhibe un motivo α/α estabilizado por cisteínas tal como el de las toxinas κ -BUTX-Tt2b y Ts16, con quienes guarda una gran similitud en cuanto a estructura primaria se refiere. Además los puentes disulfuro de M2Tx1 no son convencionales (C1-C4, C2-C5, C3-C6), sino los hallados para la nueva familia de toxinas a la cual pertenecen κ -BUTX-Tt2b y Ts16 (C2-C4, C1-C5, C3-C6). Esto confirma la existencia de un nuevo motivo estructural en el cual una de las hebras- β del plegamiento encontrado normalmente es sustituida por una hélice- α .

6. Referencias y bibliografía

- [1] **H. S. Soker.** *General, Organic and Biological Chemistry*. Cuarta edición (2007), Houghton Mifflin, págs. 604, 605, 614, 616, 635, 636.
- [2] **Gregory A. Petsko, Dagmar Ringe.** *Protein structure and function*. Primera edición (2004), New Science Press, pág. 3.
- [3] **Albert L. Lehninger, David L. Nelson, Michael M. Cox.** *Principios de Bioquímica*. Cuarta edición, Omega, págs. 75-77, 85-89.
- [4] **Alistair J. Lax.** *Toxin: the cunning of bacterial poisons*. Primera edición (1953), Oxford University Press, pág. 4.
- [5] *New tricks of an old pattern: structural versatility of scorpion toxins with common cysteine spacing.* **Alma Leticia Saucedo, David Flores-Solís, Ricardo C. Rodríguez de la Vega, Belén Ramírez-Cordero, Rogelio Hernández-López, Patricia Cano-Sánchez, Roxana Noriega Navarro, Jesús García-Valdés, Fredy Coronas-Valderrama, Adolfo de Roodt, Luis G. Briebe, Lourival Domingos Possani, Federico del Río-Portilla.** 2012, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 287, págs. 12321-12330.
- [6] *Toxins and genes isolated from scorpions of the genus Tityus.* **Baltazar Becerril, Sergio Marangoni, Lourival D. Possani.** 1997, *Toxicon*, Vol. 35, págs. 821-835.
- [7] *A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: α -KTx molecular subfamilies.* **Jan Tytgat, K. George Chandy, Maria L. García, George A. Gutman, Marie-France Martin-Eauclaire, Jurg J. van der Walt, Lourival D. Possani.** 1999, *Trends in Pharmacological Sciences*. Vol. 20, págs. 444-447.
- [8] *The charybdotoxin family of K^+ channel-blocking peptides.* **Christopher Miller.** 1995, *Neuron*, Vol. 15, págs. 5-10.

- [9] *A novel structural class of K⁺-channel blocking toxin from the scorpion Pandinus imperator.* **Timoteo Olamendi-Portugal, Froylan Gómez-Lagunas, Georgina B. Gurrola, Lourival D. Possani.** 1996, *Biochemical Journal*, Vol. 315, págs.. 977-981.
- [10] *Molecular Biology of scorpion toxins active on potassium channels.* **Christian Legros, Pierre E. Bougis, Marie-France Martin-Eauclaire.** 1999, *Perspectives in Drug Discovery and Desing*, Vol. 15/16, págs. 1-14.
- [11] *Characterization of a new peptide from Tityus serrulatus scorpion venom which is a ligand of the apamin-binding site.* **Christian Legros, Razika Oughuideni, Hervé Darbon, Hervé Rochat, Pierre E. Bougis, Marie-France Martin-Eauclaire.** 1996, *FEBS Letters*, Vol. 390, págs. 81-84.
- [12] *Current views on scorpion toxins specific for K⁺ channels.* **Ricardo C. Rodríguez de la Vega, Lourival D. Possani.** 2004, *Toxicon*, Vol. 43, págs. 865-875.
- [13] *A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals.* **Glenn F. King, Margaret C. Gentz, Pierre Escoubas, Graham M. Nicholson.** 2008, *Toxicon*, Vol. 52, págs. 264-276.
- [14] Uniprot Protein Knowledgebase. [En línea, citado el 19 de junio de 2012.] <http://www.uniprot.org/uniprot/B3A0L5>
- [15] Uniprot Protein Knowledgebase. [En línea, citado el 19 de junio de 2012.] <http://www.uniprot.org/uniprot/P86271>
- [16] *The nuclear induction experiment.* **F. Bloch, W. W. Hansen, M. Packard.** 1946, *Physical review*, Vol. 70, págs. 474-485.
- [17] *Nuclear Induction,* **F. Bloch.** 1946, *Physical Review*, Vol. 70, págs. 460-474.
- [18] *Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid.* **E. M. Purcell, H. C. Torrey, R. V. Pound.** 1946, *Physical Review*, Vol. 69, págs. 37-38.

- [19] **Horst Friebolin.** *Basic one- and two-dimensional NMR spectroscopy.* Cuarta edición (2005), Wiley-VCH, págs. 1-9, 14-18, 22, 23, 43, 231-236, 246-247, 273-280.
- [20] **J. Jeener.** 1971, Ampere Summer School, Basko Polje, Yugoslavia (sin publicar).
- [21] *Three-dimensional Fourier spectroscopy. Application to High-Resolution NMR.* **C. Griesinger, O. W. Sorensen, R. R. Ernst.** 1988, Journal of Magnetic Resonance, Vol. 84, págs. 14-63.
- [22] *A novel approach for sequential assignment of ^1H , ^{13}C and ^{15}N spectra of larger proteins: heteronuclear triple-resonance three-dimensional NMR spectroscopy. Application to calmodulin.* **Mitsuhiko Ikura, Lewis E. Kay, Ad Bax.** 1990, Biochemistry, Vol. 29, págs. 4659-4667.
- [23] *Application of Fourier transform spectroscopy to magnetic resonance.* **R. R. Ernst.** 1966, Review of Scientific Instruments, Vol. 37, págs. 93-102.
- [24] *NMR studies of structure and function of biological macromolecules (Nobel lecture).* **Kurt Wüthrich.** 2003, Angewandte Chemie, Vol. 42, págs. 3340-3363.
- [25] *Medical imaging by NMR.* **P. Mansfield, A. A. Maudsley.** 1977, British Journal of Radiology, Vol. 50, págs. 188-194.
- [26] *In vivo NMR imaging in medicine: the Aberdeen approach, both physical and biological.* **J. Mallard, J. M. S. Hutchison, W. A. Edelstein, C. R. Ling, M. A. Foster, G. Johnson, S. F. J. Cox, P. C. Lauterbur, P. Mansfield, D. R. Wilkie and W. S. Moore.** 1980, Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, Vol. 289, págs. 519-530.
- [27] **John Cavanagh y otros.** *Protein NMR Spectroscopy.* Primera edición (1996), Elsevier Academic Press, págs. 1-6, 14-20.
- [28] **James Keeler.** *Understanding NMR spectroscopy.* Segunda edición (2010), Wiley, págs. 181-186, 190-196, 221-226, 241-242.

[29] *Comparison of protein solution structures refined by molecular dynamics simulation in vacuum, with a generalized Born model, and with explicit water.* **Bin Xia, Vickie Tsui, David A. Case, H. Jane Dyson, Peter E. Wright.** 2002, Journal of Biomolecular NMR, Vol. 22, págs. 317-331.

[30] *Molecular dynamics with coupling to an external bath.* **H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, J. R. Haak.** 1984, Journal of Chemical Physics, Vol. 81, págs. 3684-3690.

[31] Novagen pET System Manual [en línea, citado el 20 de junio de 2012.] http://pef.aibn.uq.edu.au/support/material/download/Novagen_pET_system_manual_2003.pdf

Apéndice A. Disoluciones amortiguadoras

Disolución amortiguadora de lisis
NaCl 150mM
Tris/HCl 50mM
pH=8

Disolución amortiguadora de elución
NaCl 150mM
Imidazol 500mM
Tris/HCl 50mM
pH=8

Disolución amortiguadora de diálisis
NaCl 75mM
Tris/HCl 50mM
pH=8

Apéndice B. Patrones TOCSY

