



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

INSTITUTO DE QUÍMICA

FACULTAD DE QUÍMICA

ÁREA DE CONOCIMIENTO: BIOQUÍMICA Y RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

**BIOSÍNTESIS, PURIFICACIÓN, REPLEGAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN  
POR RMN DE UNA MUTANTE DE DEF1, CON POSIBLE ACTIVIDAD  
BLOQUEADORA DE CANALES IÓNICOS DE POTASIO.**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

**Q. LAURA ANDREA RODRÍGUEZ SOLANO**

TUTOR

DR. FEDERICO DEL RÍO PORTILLA

INSTITUTO DE QUÍMICA

MÉXICO D.F ENERO DE 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**BIOSÍNTESIS, PURIFICACIÓN, REPLEGAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN POR RMN  
DE UNA MUTANTE DE DEF1, CON POSIBLE ACTIVIDAD BLOQUEADORA DE  
CANALES IÓNICOS DE POTASIO.**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

**Q. LAURA ANDREA RODRÍGUEZ SOLANO**



TUTOR: Dr. Federico del Río Portilla

AÑO: 2014

*He aquí mi secreto, que no puede ser más simple:  
solo con el corazón se puede ver bien;  
lo esencial es invisible a los ojos.*

El principito



## AGRADECIMIENTOS

- A la UNAM.
- A CONACyT por la beca otorgada. Número de becario: 259656.
- A los proyectos de CONACyT CB2011/166472 y PAPIIT IN207713.
- Al Dr. José Federico del Río Portilla, por su asesoría, amistad y apoyo a lo largo de la realización del proyecto.
- A la Dra. Patricia Cano, del Instituto de Química, por la asesoría, paciencia y ayuda brindada en biología molecular.
- A mis compañeros de laboratorio: David Flores, Fátima Escobedo y Daniela Franco, por los aportes al trabajo de manera directa o indirecta.
- A los integrantes del laboratorio de biomacromolécula 1.
- A el grupo de seminario de resonancia y todos sus participantes, gracias por compartir sus conocimientos.
- A los investigadores del departamento de biomecromoléculas y alumnos, por las contribuciones en la mejora del trabajo.
- Al Dr. Victor Manuel Ugalde Saldívar, Facultad de Química, por su amistad y asesoría en mi formación como docente.
- A Q. Eréndira García y M. en C. Carmen Márquez, Instituto de Química, por el apoyo técnico brindado.
- A mis compañeras de casa Maribel Montiel, Noemí Núñez y Mireya Núñez, compartir el día a día con ustedes ha sido muy divertido.
- A mi familia y amigos que me han brindado su apoyo, algunos lejos, todos cada vez más cerquita del corazón.
- A Javier Rodríguez y Sarah Abelen por uno de los mejores regalos de la vida: Fabián.
- A mis padres por su apoyo incondicional, el cariño y el buen humor.

## LUGAR DE TRABAJO

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biomacromoléculas 1 y Laboratorio de Biología molecular. Instituto de Química. Ciudad Universitaria, Universidad Nacional Autónoma de México.

El presente trabajo se presentó en forma de cartel en QUIMIUNAM 2012.

## INDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>9</b>
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>11</b>
DEFENSINAS .....	12
TOXINAS BLOQUEADORAS DE CANALES IÓNICOS .....	13
<i>Toxinas bloqueadoras de canales iónicos de potasio .....</i>	<i>13</i>
RELACIÓN EVOLUTIVA ENTRE TOXINAS Y DEFENSINAS .....	15
DEFENSINA 1 Y MUTANTES.....	15
ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LAS PROTEÍNAS .....	17
ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	19
<i>Desplazamiento químico .....</i>	<i>20</i>
<i>Acoplamiento .....</i>	<i>21</i>
<i>Experimentos de resonancia magnética nuclear.....</i>	<i>22</i>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS PARTICULARES .....	27
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>28</b>
<b>PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>30</b>
<i>Biosíntesis .....</i>	<i>32</i>
<i>Purificación .....</i>	<i>34</i>
<i>Replegamiento.....</i>	<i>36</i>
<i>Caracterización.....</i>	<i>36</i>
<i>Resonancia magnética nuclear .....</i>	<i>36</i>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>37</b>
BIOSÍNTESIS.....	38
<i>Mutaciones con PCR.....</i>	<i>38</i>
<i>Transformación de células competentes .....</i>	<i>38</i>
<i>Expresión.....</i>	<i>38</i>
<i>Lisis.....</i>	<i>40</i>
PURIFICACIÓN .....	40
<i>Cromatografía de afinidad metal-quelato .....</i>	<i>40</i>
<i>Reacción de corte con trombina .....</i>	<i>41</i>
<i>Preparación de la muestra.....</i>	<i>44</i>
<i>Cromatografía de líquidos de alta eficiencia.....</i>	<i>44</i>

<i>Corte con bromuro de cianógeno</i> .....	45
REPLEGAMIENTO .....	46
CARACTERIZACIÓN .....	47
RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	48
<i>Preparación de la muestra</i> .....	48
<i>Experimentos de RMN <sup>1</sup>H</i> .....	49
<i>Experimentos de RMN en 2D</i> .....	50
<i>Cálculos de la estructura terciara</i> .....	51
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>56</b>
PERSPECTIVAS.....	57
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>58</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>61</b>
ANEXO I. OBTENCIÓN DE LOS PÉPTIDOS. ....	62
ANEXO II. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA TERCIARIA POR RMN. ....	65

# RESUMEN

En este trabajo se describe la biosíntesis, purificación, replegamiento y caracterización de una mutante de la defensina 1. Las mutaciones realizadas sobre defensina 1 fueron pensadas para modificar la actividad sobre membrana celular de la defensina por un péptido con actividad selectiva sobre canales iónicos de potasio. Lo cual nos permitiría establecer una relación evolutiva entre defensinas y toxinas bloqueadoras de canales iónicos.

La mutante se obtuvo por métodos de biología molecular de manera recombinante en *E. coli*. Se logró purificar tanto de la fracción soluble, como plegada de manera *in vitro* (la mayor cantidad de proteína se obtiene de forma insoluble en cuerpos de inclusión), la proteína fue purificada por diferentes técnicas cromatográficas, como son cromatografía de afinidad metal-quelato y cromatografía de líquidos de alta eficiencia; una vez pura se corroboró la obtención del péptido deseado por espectrometría de masas.

La caracterización del péptido se llevó a cabo por la técnica de resonancia magnética nuclear, la cual nos permitió determinar la existencia de estructura terciaria con RMN de protón y con técnicas de RMN en dos dimensiones se logró elucidar la estructura secundaria y terciaria de la proteína, basado en la asignación de sistemas de espín y posteriormente el cálculo de la estructura (método desarrollado por el Dr. Wüthrich y colaboradores).

La estructura terciaria de la proteína sintetizada (mutante 3) obtenida presenta el mismo motivo estructural que la defensina 1, con lo cual podemos decir que la estructura se conserva a pesar de las mutaciones realizadas.

# INTRODUCCIÓN

Los alacranes son artrópodos que llevan millones de años en la tierra, tienen una gran capacidad de adaptación y habitan diferentes tipos de ecosistemas. Están en contacto con gran diversidad de microorganismos patógenos por lo cual su sistema inmune ha evolucionado para ser altamente efectivo.<sup>1</sup>

El veneno es una mezcla de diferentes péptidos con actividad neurotóxica, dentro de los péptidos que componen el veneno de alacrán se encuentran las toxinas y las defensinas.

La importancia biológica de las toxinas aun no se conoce; sin embargo, es claro que contribuyen a la neurotoxicidad del veneno. A pesar de que las toxinas se encuentran tanto en alacranes del nuevo mundo como del viejo mundo representan una fracción minoritaria dentro del veneno (0.01-0.05 %).<sup>2</sup>

Las toxinas bloqueadoras de canales iónicos se caracterizan por tener una alta selectividad por estas proteínas de membrana. Por otra parte, las defensinas se encuentran distribuidas a lo largo del reino animal y vegetal, se clasifican dentro de los péptidos microbianos, actúan despolarizando la membrana del agente patógeno, produciendo la muerte celular; pero no existe ningún tipo de selectividad de estos péptidos por alguna proteína de membrana.<sup>3</sup>

Diversos autores sugieren que existe una relación evolutiva entre defensinas y toxinas, dicho de otro manera las defensinas evolucionaron en toxinas, teniendo así una actividad selectiva. Esta hipótesis está sustentada en la abundancia de las defensinas con respecto a las toxinas y en que la estructura terciaria de las defensinas de diferentes especies es muy parecida a la de las toxinas de veneno de alacrán, presentando el mismo motivo estructural.<sup>1</sup>

Un paso clave para determinar si existe una relación entre estos dos tipos de péptidos es poder obtener una defensina con actividad de toxina mutando residuos específicos. Uno de los requisitos que debe cumplir el péptido sintético es que el motivo estructural se conserve.

La resonancia magnética nuclear es una técnica espectroscópica muy poderosa que se ha utilizado en los últimos años para la elucidación de la estructura de moléculas con importancia biológica. Los experimentos se pueden realizar en disolución, forma en la cual se llevan a cabo muchas reacciones en los organismos vivos.<sup>4</sup> Para péptidos pequeños y toxinas es la técnica más utilizada en la determinación de su estructura ya que estas moléculas no son fáciles de cristalizar.

# ANTECEDENTES



## Defensinas

Las defensinas son péptidos antimicrobianos ricos en cisteínas<sup>1</sup> que constan de una estructura semirrígida formada por una hoja beta en el C-terminal y una hélice alfa de tamaño variable en el N-terminal conectadas por tres puentes disulfuro, a lo cual se conoce como motivo estructural CS- $\alpha/\beta$ . La estructura primaria de las defensinas está normalmente formada de residuos catiónicos e hidrofóbicos.<sup>5</sup>

Existen dos familias principales de defensinas,  $\alpha$ -defensinas y  $\beta$ -defensinas, ambas presentan el motivo estructural CS- $\alpha/\beta$ , difieren tanto en la longitud de la cadena polipeptídica, así como en la conectividad de los residuos de cisteínas para la formación de puentes disulfuro. Otra familia de la cual se conoce menos es  $\theta$ -defensinas, las cuales presentan una estructura cíclica, este tipo de defensinas sólo se han podido aislar de primates, ilustración 1.<sup>5</sup>

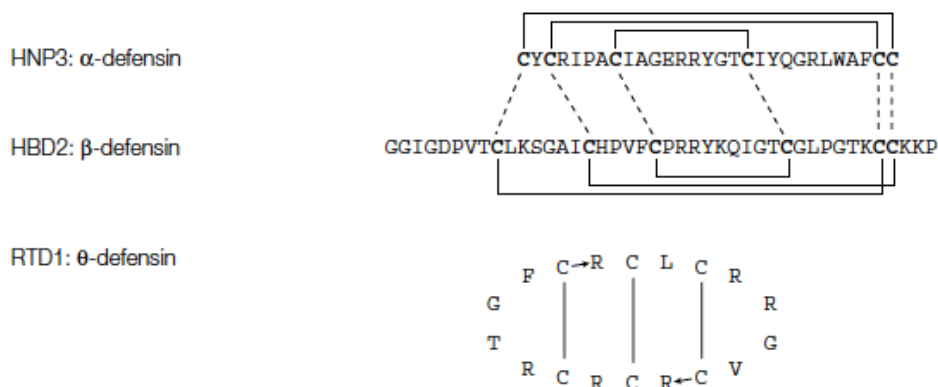


Ilustración 1. Tipos de defensinas. Ilustración tomada de referencia 4.

Las defensinas interactúan de manera electrostática con la membrana celular de los agentes patógenos, provocando una alteración en la estructura de la membrana y posteriormente la muerte celular. El mecanismo no es del todo conocido por lo que se proponen varios: 1) despolarización fatal de la membrana, 2) creación de huecos físicos por donde se puede drenar el contenido de la célula, 3) activación de procesos de muerte celular, 4) modificación del acomodo de los lípidos resultando en una perturbación de las funciones de la membrana y 5) daño de blancos específicos. Se ha observado que la presencia de colesterol en la membrana blanco reduce la actividad del péptido antimicrobiano.<sup>3</sup>

El estudio de las defensinas se ha incrementado en los últimos años dado que se pueden utilizar como posibles antibióticos, en preservativos químicos contra enfermedades de transmisión sexual o para mantener estéril el material quirúrgico.<sup>3</sup>

### *Toxinas bloqueadoras de canales iónicos*

Una toxina (del griego clásico: τοξικόν toxikon, que significa "flecha") es una sustancia venenosa producida por células vivas u organismos, como animales, insectos, plantas y bacterias.

Los canales iónicos son proteínas que funcionan como poros, a través de los cuales los iones pueden atravesar la membrana, impulsados por sus gradientes electroquímicos. Se conocen canales iónicos específicos para diferentes iones:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$ .<sup>6</sup>

### *Toxinas bloqueadoras de canales iónicos de potasio*

Por mucho años no se conocieron toxinas afines a canales iónicos de potasio, siendo el mejor bloqueador disponible el tetraetilamonio, mientras que para los canales iónicos de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  se conocían ligantes de alta afinidad con una gran importancia bioquímica y fisiológica.<sup>2</sup> En 1982 el Dr. Lourival Possani y colaboradores aislaron la primer toxina selectiva para canales iónicos de  $\text{K}^+$ , a partir de veneno de alacrán.<sup>2</sup>

En cuanto a los canales iónicos de potasio se han logrado aislar diferentes tipos de canales, entre los más estudiados han sido los dependientes de voltaje ( $\text{Kv}$ ), los dependientes de calcio ( $\text{KCa}$ ) y los rectificadores de entrada que permiten la entrada de iones potasio, pero no la salida.<sup>6</sup> La estructura de un canal fue elucidada con rayos x por el grupo de MacKinnon, lo cual lo hizo merecedor del premio nobel en 2003.<sup>7</sup>

Existen más de 100 tipos de canales de potasio y sólo para unos pocos hay péptidos específicos que los afectan.<sup>8</sup> Se han encontrado una gran cantidad de toxinas que bloquean dos tipos de canales de potasio  $\text{Kv}$  y  $\text{KCa}$ . Las toxinas pueden inhibir en concentraciones de 1 pM a 10  $\mu\text{M}$  y son selectivas a los canales de potasio, lo cual ha permitido el estudio y entendimiento de estos canales.<sup>2</sup>

Las toxinas bloqueadoras de canales iónicos de potasio (ilustración 2) pueden ser clasificadas en 5 familias de acuerdo a la nomenclatura aceptada:<sup>9</sup>

- Alfa-Ktx: son péptidos de 23 a 43 aminoácidos estabilizados por 2-4 puentes disulfuro, dos de los cuales están altamente conservados, presentan un motivo estructural CS- $\alpha/\beta$ , el más común dentro de las toxinas de alacrán.
- Beta-Ktx: péptidos de cadena larga alrededor de 60 aminoácidos, al igual presentan puentes disulfuro, se cree que presenta el motivo estructural CS  $\alpha/\beta$ ; sin embargo, no se conoce la estructura de ninguna.
- Gama-Ktx: son bloqueadoras de *ether-a-go-go* una familia de canales de potasio. De 37 a 47 aminoácidos con 3-4 puentes disulfuro, las cuales adoptan el motivo estructural CS  $\alpha/\beta$ .
- Kappa-Ktx: es la familia más pequeña, presenta únicamente hélices alfa y un motivo estructural CS  $\alpha/\alpha$ , con dos puentes disulfuro, hasta el momento han sido aisladas de solo dos tipos de alacranes y son pobres bloqueadora de canales iónicos de potasio.
- Un quinto tipo de toxinas se ha caracterizado, pero aun no es claro si se trata de una familia, Ts16 y Tt2b presentan un motivo estructural CS  $\alpha/\alpha$ , con tres puentes disulfuro conectados de manera no convencional. Son buenos bloqueadores de canales iónicos de potasio.<sup>10</sup>

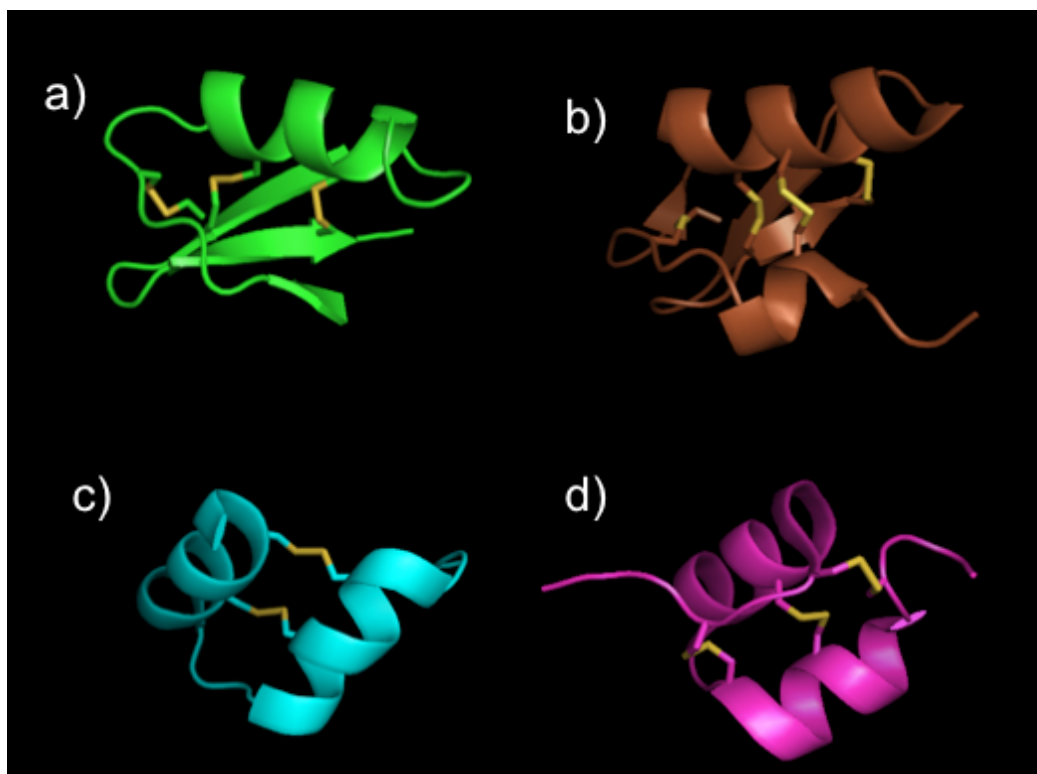


Ilustración 2. Estructuras obtenidas por RMN de toxina bloqueadoras de canales iónicos. a) Alfa Ktx 1.1,<sup>2</sup> b) Gamaktx1.1<sup>11</sup>, c) Kappa Ktx 2.2<sup>12</sup>, d) Ts16.<sup>10</sup>

Las primeras tres familias presentan puentes disulfuro con conectividad clásica esto es C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> y C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, en dos de los pares se cumplen que C<sub>i</sub>-C<sub>j</sub> C<sub>i+4</sub>-C<sub>j+2</sub>.<sup>8</sup> Para la familia kappa, sólo presentan dos puentes disulfuro C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> y C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>, la quinta familia mencionada tienen tres puentes disulfuro con una conectividad no clásica de C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>.<sup>9</sup> Las toxinas bloqueadoras de canales iónicos de potasio son capaces de unirse tanto a el canal abierto como cerrado, provocando una despolarización de la membrana. Las evidencias sugieren que el bloqueo se lleva a cabo por un mecanismo de unión en el cual la toxina encuentra un sitio específico de unión en el vestíbulo externo del canal de potasio y, por lo tanto, ocluye la parte externa del canal impidiendo que el ión entre en la cavidad.<sup>2</sup>

La interacción de los canales de potasio con las toxinas depende de varios residuos que se encuentran en la hoja beta. Esta teoría se conoce como teoría de la diada funcional, en la cual es necesario un aminoácido cargado y otro aromático para formar el sitio de reconocimiento del canal; sin embargo, hay otras toxinas que no cumplen con esta teoría, principalmente las que bloquean canales de potasio activados por calcio.<sup>8</sup>

### ***Relación evolutiva entre toxinas y defensinas***

Los estudios han demostrado que, independientemente del tamaño, tanto las defensinas como las toxinas de alacrán presentan el mismo motivo estructural CS- $\alpha/\beta$  (hélice alfa sobre hoja beta estabilizado por cisteínas)<sup>13</sup>. Normalmente difieren en la secuencia de aminoácidos aunque la posición de las cisteínas se encuentra conservada. El motivo estructural común sugiere que tanto toxinas como defensinas provienen de un ancestro en común; la amplia distribución filogenética de las defensinas y la organización del gen sugieren una relación evolutiva donde probablemente las defensinas son los ancestros de las toxinas.<sup>1</sup>

### ***Defensina 1 y mutantes***

El nombre Defensina 1, acortado como DEF1, identifica al péptido aislado del alacrán *Centruroides limpidus limpidus*. También, identificada como CII-dlp (*Centruroides limpidus limpidus-defensine like peptide*), está registrada con el número de secuencia Q6GU94 en la base de datos de UniProt, también se

puede encontrar con su código secundario P83738. Esta defensina fue reportada por primera vez en 2004, por el grupo de investigación del Dr. Lourival Possani.

El *Centruroides limpidus limpidus* (Buthidae, Scorpiones, Arachnida, Artropoda, Animalia) es un alacrán nativo de México que habita principalmente en el estado de Guerrero. La DEF1 (cuya secuencia se muestra en ilustración 3) se extrajo de la hemolinfa de dicho alacrán, se encontró que su secuencia madura contiene 6 cisteínas que forman tres puentes disulfuro del tipo C1-C4, C2-C5, C3-C6. Este péptido se produce de manera inducida, lo que significa que no se encuentra siempre en la hemolinfa.<sup>1</sup>

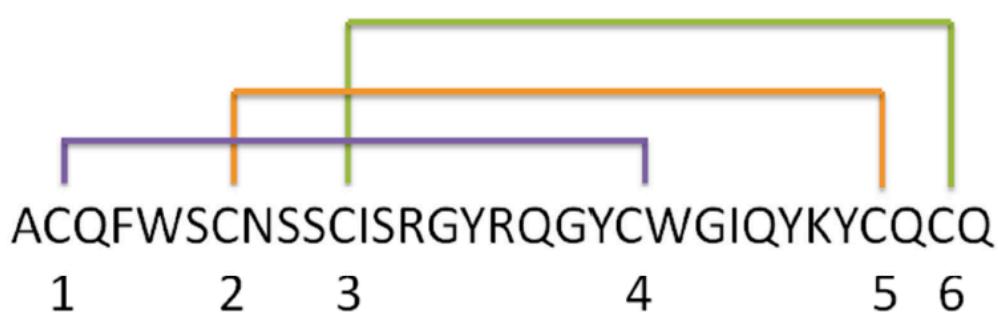


Ilustración 3. Secuencia Def1 con la conectividad de los puentes disulfuro.<sup>14</sup>

La estructura de la GS-DEF1 (ilustración 4) fue obtenida mediante técnicas de biología molecular y su estructura fue elucidada por resonancia magnética nuclear en el grupo de investigación del Dr. Federico del Río.<sup>14</sup> La estructura tridimensional presenta un motivo estructural CS- $\alpha/\beta$ , este es el primer paso para saber si DEF1 es candidata a mutaciones pertinentes que permitan tener un péptido con actividad tipo toxina bloqueadora de canales iónicos.

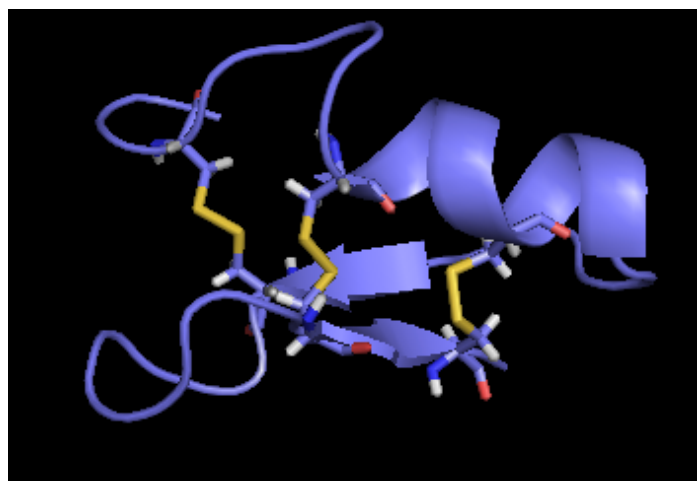


Ilustración 4. Estructura obtenida por RMN para GS-Def1. RMSD mayor a 1.<sup>14</sup>

Las mutaciones específicas para lograr dicho péptido fueron sugeridas por el Dr. Ricardo Rodríguez de la Vega (tabla 1). Se utilizó la defensina 1 ya que la estructura primaria presenta conservación de puentes disulfuro con respecto a las toxinas bloqueadoras de canales iónicos de potasio de la familia  $\alpha$ -ktx y su estructura terciaria presenta un motivo estructural CS- $\alpha/\beta$ . Se propuso que realizando mutaciones puntuales sobre la secuencia de DEF 1, se puede obtener una mutante que presente característica de toxina bloqueadora de canales de potasio, la cual corresponde a mutante 3; esta mutante incluye todas las mutaciones para mutante 1 y mutante 2.

Tabla 1. Mutaciones propuestas defensina1.

Secuencia	Mutación	Clave
ACQFW SCNSS CISRG YRQGY CWGIQ YKYCQ CQ		DEF1
ACQFW SCNSS CIRSG YRQ <b>G</b> K CWGIQ YKYCQ CQ	Y20K	Mutante 1
ACQFW SCNSS CISRG YRQ <b>G</b> K CWGIQ YKYCQ <b>C</b> Y	Q32Y	Mutante 2
ACQFW SCNSS CISRG YRQ <b>G</b> K CWG <b>K</b> Y CQ <b>C</b> Y	$\Delta$ IQY24-26	Mutante 3

La primera mutación consiste en cambiar una tirosina, un aminoácido de tipo aromático que se encuentra en la posición 20, por lisina la cual es un aminoácido cargado positivamente. La segunda mutación consiste en cambiar glutamina, un aminoácido polar sin carga en la posición 32 por tirosina, un aminoácido aromático. Con dichas mutaciones se cumple lo sugerido por la teoría de la diada funcional. Una tercera mutación es necesaria ya que en la estructura de la defensina 1 se observa una horquilla, que afecta el tamaño y forma del péptido y por lo tanto, la interacción con la cavidad del canal, por lo que la última mutación consiste en la delección de esta asa.

Para verificar que las mutaciones realizadas para obtener la mutante 3 no modifiquen el motivo estructural CS- $\alpha/\beta$  presente en la DEF1, es necesario determinar la estructura terciaria.

### ***Estructura tridimensional de las proteínas***

La función de las proteínas, su eficiencia y especificidad de interacción dependen de la conformación que adoptan, es decir, de los movimientos espontáneos de la cadena lineal de aminoácidos, en lo que se conoce como estructura terciaria o conformación nativa.<sup>6</sup>

La determinación experimental de la posición relativa de los átomos de una proteína en el espacio ha requerido el desarrollo de técnicas espectroscópicas como cristalografía de rayos x y resonancia magnética nuclear.

La técnica de difracción de rayos x consiste en incidir energía electromagnética con una longitud de onda suficientemente pequeña de tal modo que los enlaces químicos funcionen como una rejilla de difracción, (ver ilustración 5). La difracción dará un patrón específico según la orientación de los átomos dentro de la molécula. Para utilizar esta técnica es necesario obtener monocristales de la molécula en estudio.

En la resonancia magnética nuclear diferentes experimentos permiten la medición de distancias entre átomos ya sea a través del espacio o a través de los enlaces químicos. Con un número suficiente de estas distancias aproximadas es posible construir modelos en los que se intente satisfacer a todas las distancias simultáneamente, más condiciones adicionales como distancia y ángulos de enlace de la cadena polipeptídica. Más adelante se ahondará en detalle sobre esta técnica.

Las ventajas y desventajas de la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear en la determinación de estructuras macromoleculares hacen que estas técnicas sean complementarias en la determinación de estructuras de proteínas. Con rayos X se han podido resolver estructuras de gran tamaño (más de 1,000 aminoácidos) mientras que la RMN se limita a biomoléculas de aproximadamente 400 aminoácidos, aunque existen reportes de un número 10 veces mayor. El detalle de una estructura cristalográfica de alta resolución se complementa con la capacidad de RMN de proveer información sobre la dinámica de las proteínas.

La identificación de estructuras secundarias y dominios, desde el punto de vista estructural, corresponde a un conjunto de condicionamientos fisicoquímicos, pero de igual importancia, denota en muchos casos un linaje evolutivo. Es evidente por la inspección de secuencias de muchas proteínas, que los dominios son verdaderas unidades evolutivas. La probabilidad de formar entidades con estructura nativa y funciones novedosas a partir de elementos preexistentes es mucho mayor que la de obtener cada actividad nueva, a partir de secuencias al azar.<sup>6</sup>

## Espectroscopia de resonancia magnética nuclear

La espectroscopia es la rama de la ciencia que estudia la interacción de la materia y energía. Usualmente, la energía se encuentra en forma de radiación electromagnética que sigue la siguiente relación (ecuación 1):

$$E = h\nu \quad \text{Ecuación 1}$$

En ausencia de perturbaciones externas los átomos presentan una serie de estados electrónicos y nucleares bien definidos, que poseen energía cuantizada (que toma valores específicos). Esto sucede también en las moléculas, para pasar de un estado cuántico a otro, la energía debe corresponder a la diferencia de energía entre los estados cuánticos. Para pasar de un estado  $i$  a uno  $j$  la energía requerida está dada por la ecuación 2.

$$\Delta E_{ij} = E_j - E_i \quad \text{Ecuación 2}$$

Esto significa que la transición del estado de  $i \rightarrow j$  es provocada por un fotón que tenga la energía  $\Delta E_{ij}$ .<sup>15</sup> Sustituyendo la ecuación 1 en la ecuación 2 obtenemos la siguiente relación (ecuación 3).

$$h\nu_{ij} = \Delta E_{ij} = E_j - E_i \quad \text{Ecuación 3}$$

En un experimento espectroscópico la absorción más eficiente de energía se da cuando se utiliza la frecuencia  $\nu_{ij}$  para excitar la transición del estado  $i$  al  $j$ , ( $\nu_{ij} = \Delta E_{ij}/h$ ) a esta condición se le conoce como resonancia. Dependiendo de la energía de los fotones estos interactuarán con diferentes partes de las moléculas dando pie a diferentes técnicas espectroscópicas, un resumen de las más importantes se encuentran en la ilustración 5.

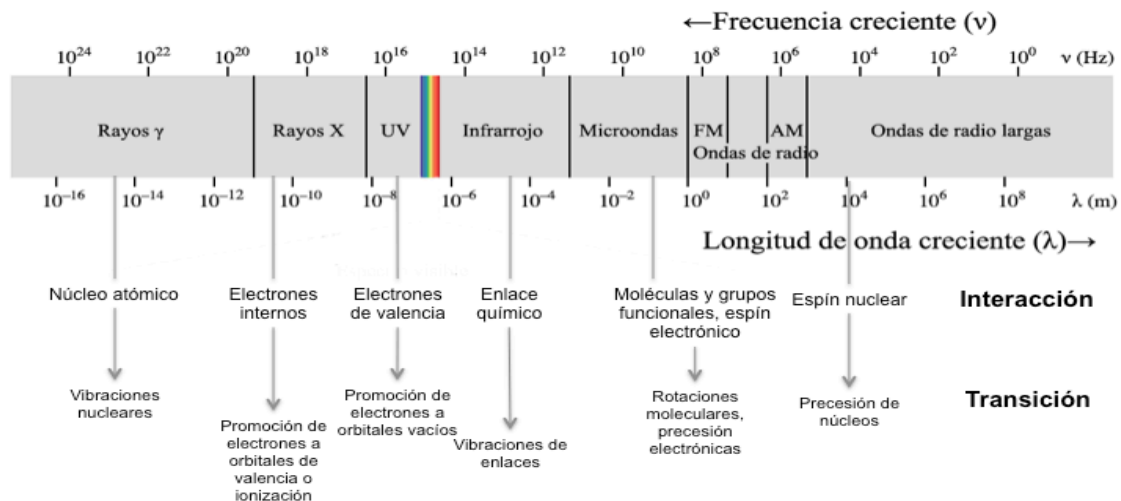


Ilustración 5. Diferentes tipos de energía electromagnética y su interacción con la materia. Imagen modificada de referencia 15 y 20.



Las partículas subatómicas presentan un momento angular intrínseco, llamado espín  $I$ , imagínese una partícula cargada que gira sobre uno de sus diámetros, podemos visualizar como se origina este momento angular intrínseco, el espín puede ser difícil de entender ya que no existe ningún símil en mecánica clásica.<sup>16</sup> Para que un núcleo pueda ser visible en resonancia es necesario que  $I \neq 0$ . El espín define el número de estados estacionarios que el núcleo puede ocupar (ecuación 4) cuando se somete a un campo magnético impuesto. Cada estado de espín se puede asociar con un número cuántico  $m$  (ecuación 5).

$$\# \text{ niveles de energía} = (2I + 1) \quad \text{Ecuación 4}$$

$$m = -I, -I + 1, \dots, I - 1, I \quad \text{Ecuación 5}$$

En los experimentos de resonancia magnética nuclear se utilizan núcleos con  $I = \frac{1}{2}$ , de esta manera solo hay dos niveles de energía posibles  $m = \frac{1}{2}, -\frac{1}{2}$  y por lo tanto, sólo habrá una transición posible, del estado de menor energía al de mayor energía. Los núcleos utilizados por esta técnica con importancia para las biomoléculas son  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  y  $^{31}\text{P}$ . La energía de los dos niveles de energía posibles para un átomo con  $I = \frac{1}{2}$  esta dado por la ecuación 6 .

$$E_m = -m\hbar\gamma B_0 \quad \text{Ecuación 6}$$

En la que  $\hbar$  es la constante de Planck dividida entre  $2\pi$ ,  $B_0$  es el campo magnético aplicado y  $\gamma$  es la constante giromagnética que depende de cada núcleo.<sup>17</sup> Esta ecuación surge de aplicar el efecto Zeeman a un núcleo con  $I = \frac{1}{2}$ .

Dado que  $m = \frac{1}{2}$  es menor que en energía que  $m = -\frac{1}{2}$ , habrá una pequeña diferencia poblacional favoreciendo el estado de menor energía, esta relación está dada por la distribución de Boltzman,<sup>18</sup> que depende del campo magnético aplicado. Por lo tanto, a mayor campo magnético mejor es la resolución de los experimentos.

### Desplazamiento químico

Sería de esperar que todos los  $^1\text{H}$  de una molécula absorbieran fotones de la misma frecuencia; sin embargo, existen pequeñas variaciones (de cientos a miles de Hz) en las posiciones exactas de excitación para cada núcleo de una misma especie química. Estas variaciones son provocadas por los campos

magnéticos locales y específicos generados por la densidad electrónica local que rodea a cada núcleo, llamado entorno químico. A la posición donde se observa la excitación de cada núcleo se le conoce como desplazamiento químico  $\delta$ .<sup>19</sup> Para determinar el desplazamiento se escoge una referencia para el núcleo, se calcula como se muestra en la ecuación 7, en la cual se indica que el desplazamiento químico es adimensional y, por lo tanto, no depende del campo magnético aplicado. Las unidades utilizadas son partes por millón  $ppm = \delta * 10^6$ .

$$\delta_i = (v_i - v_{ref})/v_{ref} \quad \text{Ecuación 7}$$

Por regla general los núcleos equivalentes tienen desplazamientos químicos iguales, los núcleos no equivalentes poseen desplazamientos químicos distintos,<sup>19</sup> aunque siempre existe la posibilidad de que haya traslape, dos núcleos que absorban a la misma frecuencia con diferente entorno químico.

### **Acoplamiento**

Si nos quedáramos sólo con la información proporcionada por el desplazamiento químico, la RMN proporcionaría la misma información que la espectroscopía de infrarrojo. El verdadero valor de la RMN reside en la capacidad del espectroscopista para detectar acoplamiento entre espín nucleares y para delinear las vías del acoplamiento; con esta técnica se pueden determinar patrones de enlace y estereoquímica, la RMN junto con la cristalografía son las únicas técnicas que se puede utilizar para determinar estructuras moleculares detalladas.<sup>15</sup>

Existen dos tipos de acoplamientos observados en RMN, uno que se transmite a través del enlace químico y otro que se transmite a través del espacio.

### *Acoplamiento escalar*

El acoplamiento escalar  $J$  es un acoplamiento a través del enlace químico que es propagado por las interacciones del espín nuclear con el espín de los electrones de enlace. Por lo tanto, cada tipo de enlace tiene una constante de acoplamiento característica que no depende de la fuerza del campo magnético  $B_0$  y es una propiedad de la estructura molecular.<sup>15</sup> Al tener dos núcleos acoplados A y B, A sufre a través del enlace químico un incremento o

decremento del campo magnético debido al espín a favor o en contra de B,<sup>19</sup> si el núcleo A puede afectar a B, de la misma manera B afectará A.

#### *Acoplamiento dipolar*

El acoplamiento que se da a través del espacio se llama dipolar, es decir sólo se requiere la proximidad espacial y depende de la orientación con respecto a  $B_0$ . En disolución no se observa este acoplamiento dado que el movimiento aleatorio de moléculas con respecto a  $B_0$  hace que el promedio del acoplamiento dipolar sea cero. El acoplamiento dipolar se manifiesta a través del efecto nuclear Overhauser (NOE, Nuclear Overhauser Effect). La intensidad de las señales debido al NOE ( $I_{NOE}$ ) guarda una relación inversa con la distancia de los núcleos  $r$  elevada a la sexta potencia, ecuación 8.

$$I_{NOE} = k/(r_{AB})^6 \quad \text{Ecuación 8}$$

#### **Experimentos de resonancia magnética nuclear.**

En la actualidad existen una gran cantidad de experimentos que proveen diferente tipo de información acerca de la molécula. El primero en desarrollarse fue el de una dimensión (se entiende por dimensión una escala de frecuencia), aunque en este tipo de experimentos podemos obtener información sobre el desplazamiento y el acoplamiento escalar de cada uno de los átomos, la complejidad de ciertas moléculas hacen que su interpretación sea imposible.

La resonancia magnética nuclear de dos dimensiones hizo posible la determinación de estructuras de biomoléculas.<sup>3,20</sup> Cuando se encuentran todos los núcleos que se acoplan entre sí, se dice que forman un sistema de espín. Para el caso de las proteínas, cada aminoácido forma al menos un sistema de espín; lo cual es relevante para la obtención de su estructura. En proteínas número de sistemas de espín es mayor que el número de aminoácidos dado que en los aminoácidos aromáticos los núcleos del anillo no se acoplan escalaramente a los de las cadenas alifáticas.<sup>19</sup>

En los experimentos de RMN en dos dimensiones la complejidad de las señales se dispersan en función de otra dimensión de frecuencia, en un espectro esto se observa como una señal que está relacionada a dos desplazamientos químicos, los cuales pueden ser independientes. La posición

de las señales dentro del espectro estarán regulares por el acoplamiento ya sea de tipo escalar o dipolar.

### Experimentos en 1D



### Experimentos en 2D

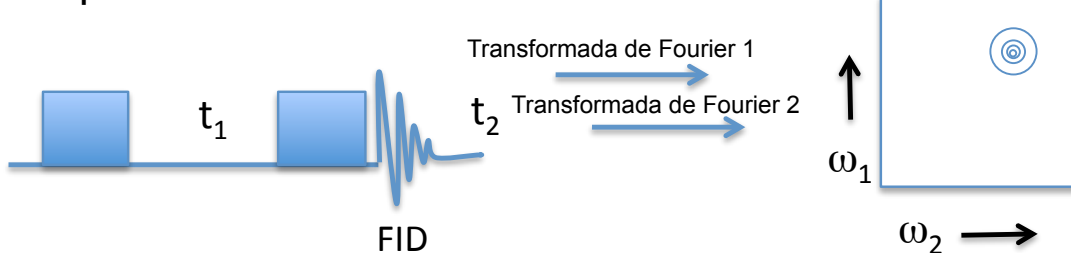


Ilustración 6. Esquema general de los experimentos de RMN en 1D y 2D. Los cuadros representan pulsos de radiofrecuencia, el FID la fuerza electromotriz que decae,  $t$ ,  $t_1$  y  $t_2$  representan tiempos,  $\omega$ ,  $\omega_1$  y  $\omega_2$  representan frecuencias. Figura modificada de referencia 20.

En la ilustración 6 se muestra un esquema general de la obtención de experimentos tanto en una dimensión como en dos dimensiones. En el experimento de una dimensión se excitan los núcleos mediante la aplicación de un pulso de radiofrecuencia (representado en el esquema como un cuadrado) seguido por la adquisición de datos como función del tiempo  $t$ . El resultado la modificación de un fuerza electromotriz en función del tiempo  $t$ , el cual se muestra como una función senoidal que decae (FID). Se realiza una transformada de Fourier para cambiar de función de tiempo a función de frecuencia ( $\omega$ ). De esta manera se obtiene el espectro de RMN interpretable.

En cuanto al experimento en dos dimensiones, la señal obtenida es función de dos tiempos. Para lograr esta dependencia es necesario obtener una colección experimentos en el cual se varía el tiempo  $t_1$  y se van obteniendo los experimentos en función de  $t_2$  de igual forma que en el experimento de una dimensión. Al realizar la primera transformada de Fourier se observa que la magnitud de las señales son moduladas por el desplazamiento químico de los

núcleos a los cuales se acopla o las constantes de acoplamiento como función del tiempo  $t_1$ . Para lograr obtener las frecuencias responsables de esta modulación es necesario realizar una segunda transformada de Fourier con respecto a  $t_1$ , manteniendo las frecuencias constantes; así es posible obtener una señal que relaciona dos frecuencias  $\omega_1$  y  $\omega_2$ .

Tres experimentos son indispensables para la determinación de estructuras de proteínas,<sup>19</sup> los primeros dos COSY y TOCSY son de correlación y permiten asignar sistemas de espín, el tercero NOESY es el más importante, ya que se correlaciona directamente con la distancia (ecuación 8):

- COSY: COrrrelation SpectroscopY. Experimento que determina la correlación entre dos protones que se encuentran acoplados escalaramente entre ellos a 2 o 3 enlaces de distancia.
- TOCSY: Total Correlation SpectroscopY. Experimento que muestra la correlación de núcleos que se encuentran formando un sistema de espín.
- NOESY: Nuclear Overhauser effect SpectroscopY. Experimento que muestra el efecto nuclear Overhauser entre dos protones. La intensidad de la señal depende de la masa molecular del compuesto. Este efecto es factible de ser observado dado que requiere un tiempo muy largo (del orden de ms) que permite el intercambio de información sobre la proximidad de los núcleos que se encuentran cercanos en el espacio. A este tiempo se le conoce como tiempo de mezclado.

Una vez obtenidos los experimentos es necesario proceder a la asignación, para lo cual es indispensable contar con la secuencia primaria. Una síntesis de los pasos para obtener la estructura de proteína se muestra en la ilustración 7.

La asignación de señales se lleva a cabo en el espectro de NOESY, una vez asignadas la mayor cantidad posible de señales se somete la estructura a cálculos. No siempre se obtiene una estructura adecuada, por lo que el afinamiento consiste en revisar cada una de las asignaciones realizadas, corroborando con la información proporcionada por el programa de cálculo.

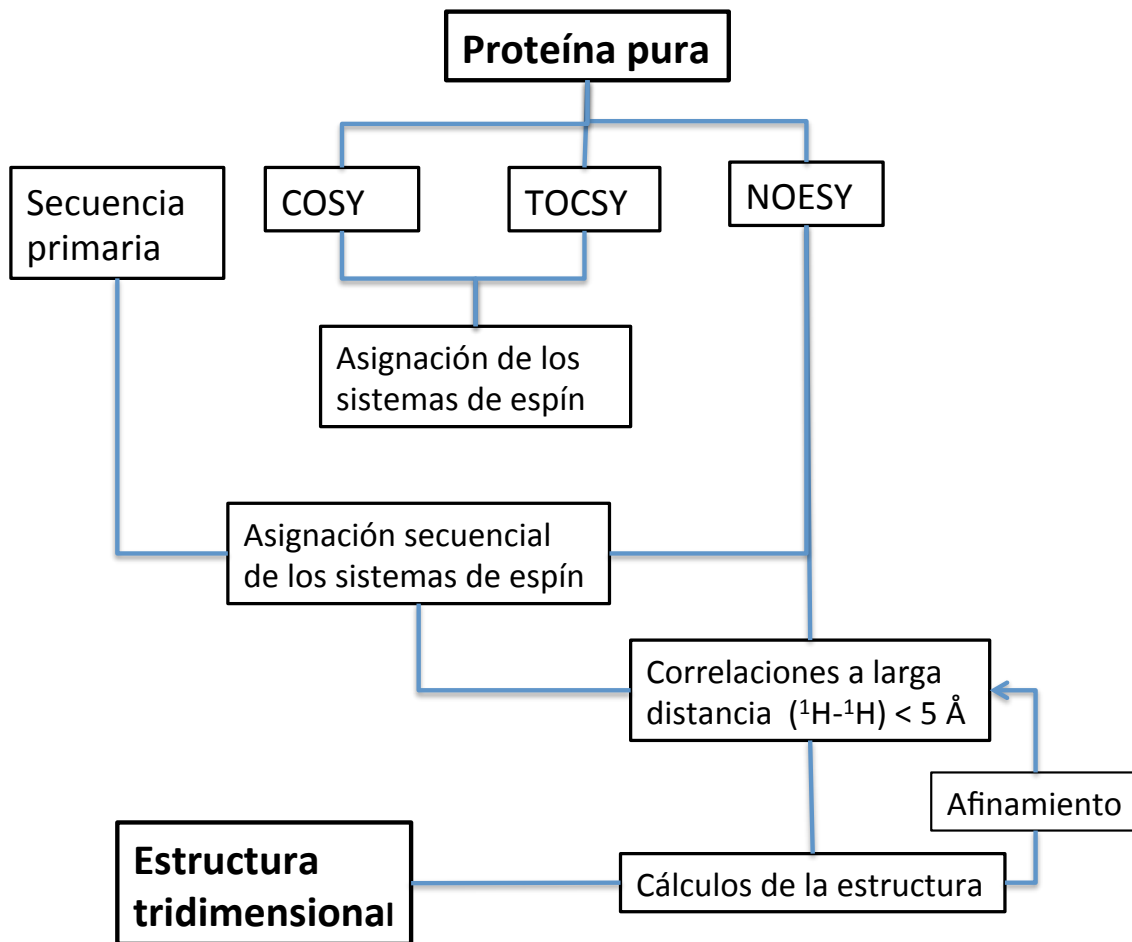


Ilustración 7. Pasos a seguir para obtener la estructura de una proteína mediante RMN. Figura modificada de referencia 19.

# OBJETIVOS

### ***Objetivo general***

Producir el péptido mutante 3 de manera recombinante y obtener la estructura tridimensional por medio de resonancia magnética nuclear para determinar el motivo estructural que presenta.

### ***Objetivos particulares***

- Realizar las mutaciones propuestas sobre el gen de DEF1.
- Biosintetizar en un sistema bacteriano la mutante 3.
- Purificar mediante cromatografía de afinidad metal-quelato y HPLC el péptido biosintetizado.
- Encontrar las condiciones óptimas en las cuales es posible replegar la mutante 3.
- Caracterización mediante espectrometría de masas y RMN  $^1\text{H}$ .
- Obtener espectros de resonancia magnética nuclear: NOESY, TOCSY y COSY, que sean interpretables de la mutante 3.
- Realizar cálculos sobre la interpretación para obtener la estructura tridimensional.



# HIPÓTESIS

La mutante 3 presentará actividad selectiva para los canales iónicos de potasio.

Las mutaciones realizadas no afectarán el motivo estructural de la mutante 3, por lo que se espera que sea el mismo que para la defensina 1 CS- $\alpha/\beta$ .

# PARTE EXPERIMENTAL

El trabajo experimental se puede dividir en 5 partes fundamentales: Mutación de los residuos propuestos, biosíntesis, purificación, caracterización y obtención de estructura por RMN. Tanto la biosíntesis como la caracterización son técnicas muy estandarizadas que no presenta mayor variación para diferentes moléculas.<sup>21</sup> Sin embargo, la purificación y la obtención de la estructura mediante resonancia magnética nuclear dependerán de la molécula y de sus características intrínsecas.

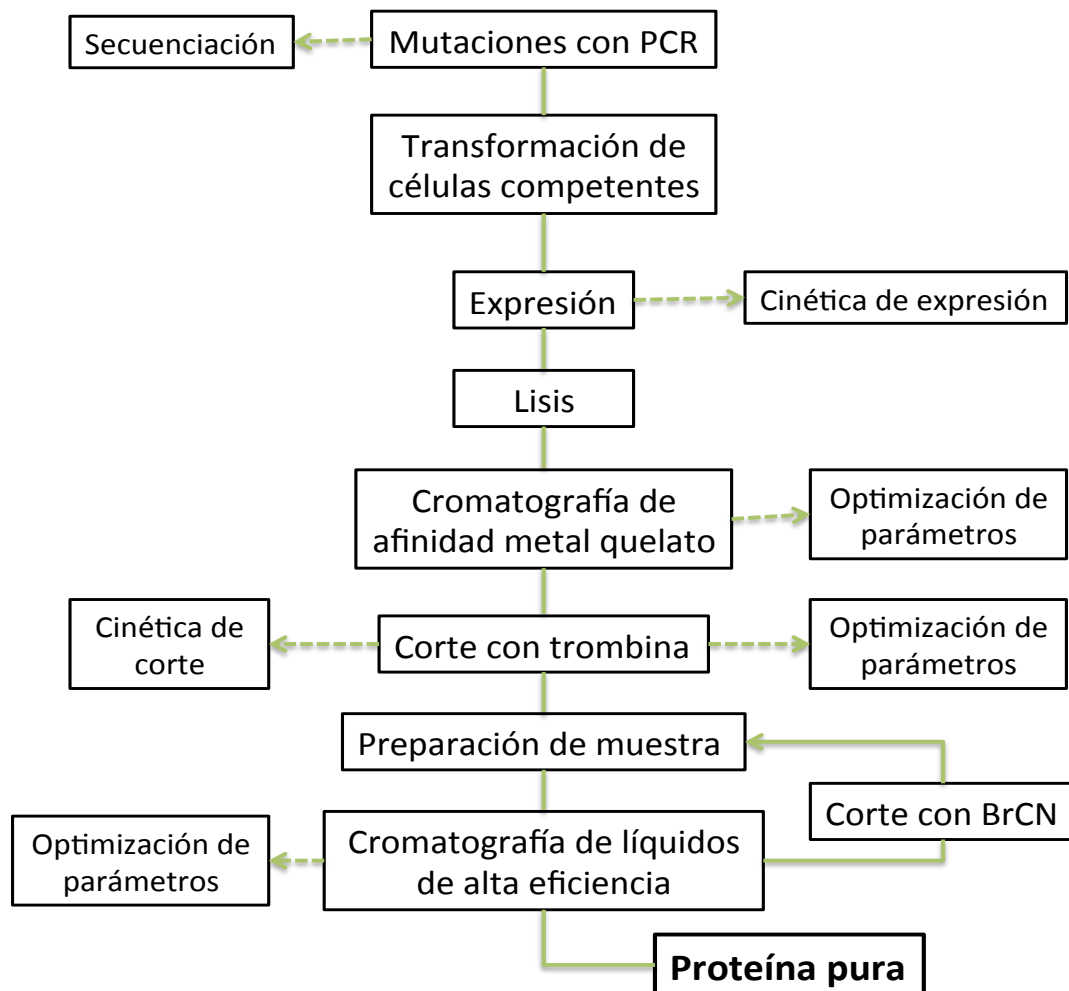


Ilustración 8. Esquema general de trabajo para la obtención de proteína pura. En los cuadros se encuentran los pasos a seguir para obtener la proteína.

En la ilustración 8 se muestra el esquema general de trabajo para obtener la proteína recombinante mutante 3 pura. La línea continua muestra los pasos principales que hay que seguir para producir la proteína, la línea punteada son los pasos secundarios que hay que afinar en cada paso antes de continuar con el siguiente, estos se realizan una sola vez.

La pureza y marca de los reactivos utilizados se encuentra en el apéndice I, así como la composición de las disoluciones mencionadas. Todo tiempo que se trabaja con bacterias se procuran condiciones de esterilidad.

## Biosíntesis

### Mutaciones con PCR

Se utiliza la técnica PCR (Polymerase Chain Reaction) sobre el pET32-a-modif-DEF1, Novagene, el cual es el plásmido utilizado para la expresión de la defensina 1.<sup>14</sup> Los oligonucleótidos requeridos para cada una de las mutaciones fueron sintetizados por Sigma Aldrich, las secuencias se encuentran en la tabla 2 y las condiciones utilizadas se encuentran en tabla 3 y 4.

Tabla 2. Oligos utilizados para llevar a cabo las mutaciones requeridas por PCR.

Secuencia del oligo (5'-3')	Mutación	Clave del péptido
Fwd: CTGGTGCCACGCGGTATGGCGTGCCAATTTTGG Rvs: CCAAATTGGCAGCCATACCGCGAGGCACCAG	LVPRG- <b>S</b> -ACQFW LVPRG- <b>M</b> -ACQFW	GM-DEF1
Fwd: TACCGTCAGGGTAAATGCTGGGGTATC Rvs: GATACCCCAGCATTTACCCTGACGGTA	YRQG- <b>Y</b> -CWGI YRQG- <b>K</b> -CWGI	GM-Mutante1
Fwd: TACTGCCAGTGCTACTAGGGATCCGAA Rvs: TTCGGATCCCTAGTAGCACTGGCAGTA	YCQC- <b>Q</b> -*GSE YCQC- <b>Y</b> -*GSE	GM-mutante2
Fwd: AATGCTGGGGTAAATACTGCCAG Rvs: CTGGCAGTATTTACCCCAGCATTT	KCWG- <b>IQY</b> -KYCQ KCWG--KYCQ	GM-mutante3

Tabla 3. Programa de PCR utilizado para las diferentes mutaciones realizadas. T es temperatura, t es tiempo en notación min ' , segundos ''.

Programa PCR	GM-DEF1	GM-mutante1	GM-mutante2	GM-mutante3
Desnaturalización inicial	T= 95 °C, t=3'00''.	T= 95 °C, t=3'00''.	T= 95 °C, t=3'00''.	T= 95 °C, t=3'00''.
Desnaturalización	T= 95 °C, t=0'30''.	T= 95 °C, t=0'30''.	T= 95 °C, t=0'30''.	T= 95 °C, t=0'30''.
Alineamiento	T= 55 °C, t=0'30''.	T= 55 °C, t=0'30''.	T= 53 °C, t=0'30''.	T= 60 °C, t=0'30''.
Extensión	T= 70°C, t=3'00''.	T= 70°C, t=2'30''.	T= 70°C, t=2'30''.	T= 70°C, t=2'30''.
Extensión final	T= 75 °C, t=5'00''.	T= 75 °C, t=5'00''.	T= 75 °C, t=5'00''.	T= 75 °C, t=5'00''.

Tabla 4. Reactivos utilizados para la reacción de PCR.

	GM-DEF1	GM-mutante1	GM-mutante2	GM-mutante3
buffer	1 x	1 x	1 x	1 x
d-ntp	1 mM	3 mM	1 mM	1 mM
Oligo fwd	0.2 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M	0.3 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M
Oligo rvs	0.2 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M	0.3 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M
MgSO <sub>4</sub>	2.25 mM	2.25 mM	2.5 mM	2.5 mM
KOD	0.02 u/mL	0.02 u/mL	0.02 u/mL	0.02 u/mL
Plásmido	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L

Para la reacción de PCR se utilizó el kit KOD Hot Start DNA Polymerase (la cual utiliza la polimerasa KOD HiFi DNA) Novagen. El plásmido fue purificado utilizando miniprep kit (250) de Qiagen, se mandó a secuenciar por la compañía Laragen.

#### *Transformación de células competentes*

Protocolo para la transformación de células competentes:

- En un tubo con 50  $\mu$ L de células competentes de la cepa Rosetta (Novagen) se agrega 2  $\mu$ L de plásmido. Reposar por 20 min a 0 °C.
- Choque térmico: 45 segundos a 42 °C y 2 min a 0 °C. Se deja que las bacterias se reproduzcan; se les coloca 200  $\mu$ l de medio de cultivo LB y se dejan incubando en agitación a 37 °C por hora y media.
- Se siembran en cajas Petri las bacterias transformadas, tomando en cuenta la resistencia a antibióticos de la cepa y el plásmido. Rosetta tienen resistencia a cloranfenicol, el plásmido confiere resistencia a ampicilina.
- Se incuban a 37 °C por 14 horas. Se traslada una de las colonias crecidas a medio de cultivo líquido.

#### *Expresión*

Las condiciones optimizadas para expresar la proteína de fusión es inducir a 18 °C con 0.5 mM de IPTG por 24 horas. El IPTG debe ser adicionado cuando la densidad óptica del medio de cultivo a 600 nm es cercano a 0.6 ( $OD_{600} \approx 0.6$ ). Las células se separan del medio de cultivo por centrifugación a 5,000 x g por 10 min. El medio de cultivo se decanta.

## *Lisis*

Protocolo optimizado para la lisis es:

- Resuspender las células en buffer de lisis.
- Sonicar a 70 V.
- Pulsos 10 segundos con 1:20 minutos de descanso, durante un tiempo total de pulsado de 15 minutos.
- Es importante mantener la muestra siempre en hielo y dependiendo del aspecto se decide si se dan más tiempo de lisado o no.

Se separa el pellet de la fracción soluble por centrifugación a 39,000 x g

## **Purificación**

### *Cromatografía de afinidad metal quelato*

Se utiliza una columna Hitrap chelatin HP de 5 mL GE Healthcare. Las condiciones optimizadas para la purificación de proteína de fusión son:

- Flujo de 5 ml/min.
- Equilibrar la columna. Buffer de lisis (BL), 25 mL.
- Pasar el lisado.
- Lavar la columna con buffer de lisis, elimina proteínas no afines a la columna, 25 mL.
- Lavar con BL + 50 mM de imidazol. Elimina proteínas que interaccionan con la columna sin eluir la proteína de fusión, 25 mL.
- Buffer de elución, para obtener la proteína de fusión, 25 mL.
- Mantener las disoluciones que contiene proteína siempre en frío.
- Después de la elución agregar urea en pequeñas cantidades (punta de espátula) para mejorar la solubilidad de la proteína de fusión.

Todas las disoluciones utilizadas para cromatografía de afinidad metal-quelato fueron previamente filtradas por membrana de poro 0.45  $\mu$ m. Se utilizaron membranas Millipore de nylon para las disoluciones, polisulfonato para las proteínas.

### *Reacción de corte con trombina*

Para llevar a cabo el corte con trombina se utilizó el Kit Thrombin Clean Cleavage, Sigma Aldrich. Las condiciones optimizadas para el corte son, Concentración 1.5 mg/mL de proteína, buffer de corte, 2 mM de CaCl<sub>2</sub>, 30  $\mu$ L de trombina por mL de reacción durante 24 horas. Para dializar la muestra se

usaron membranas Spectrum labs de 10 000. Se utilizó un equipo para concentrar la muestra el cual se conoce como Amicon, funciona filtrando a presión disoluciones por membranas de tamaño específico, que dependen de la muestra, también se puede usar para purificar la proteína. Las membranas utilizadas en el Amicon fueron proporcionadas por Millipore.

#### *Cromatografía de líquidos de alta eficiencia*

Se utilizó un equipo Varian Pro Star, modelo 325. Columnas de fase reversa Phenomenex Jupiter 5 $\mu$  C18 300 A y Phenomenex Jupiter 4 $\mu$  proteo 90 A. Disolventes: Acetonitrilo + 0.05% TFA y agua + 0.05% TFA. Detección 280 nm, flujo 1 ml/min. Todas las disoluciones utilizadas para HPLC fueron filtradas por membranas de poro 0.22  $\mu$ m Millipore, así como la muestra a inyectar. Las condiciones utilizadas se encuentran en tablas 5 y 6.

**Tabla 5. Condiciones optimizadas de HPLC para mutante 3.**

Péptido	Mutante 3	
Columna	Jupiter 4u C12 proteo 90 A	
Gradiente	Min	% CH <sub>3</sub> CN
	0	18
	5	18
	15	30
	17	18
Retención	12.95 min	

**Tabla 6. Condiciones optimizadas de HPLC para GM-mutante 3.**

Péptido	GM-mutante 3	
Columna	Jupiter 5u C18 300 A	
Gradiente	Min	% CH <sub>3</sub> CN
	0	15
	0	15
	15	35
	20	69
	28	15
	Retención	15.5 min

#### *Corte con Bromuro de cianógeno*

Las condiciones optimizadas para el corte con BrCN fueron las siguientes: 10 mg/ml de proteína en 25% agua 75% TFA, BrCN en relación molar 10:1 con la proteína, atmósfera de N<sub>2</sub>, 16 horas.



### Replegamiento

El procedimiento esta ampliamente descrito en los resultados, las condiciones utilizadas son las siguientes:

- Lisis de los cuerpos de inclusión: 8 M urea, 0.3 M NaCl y 50 mM tris pH= 8. Mismo programa que se utiliza para lisar las células.
- Purificación: por cromatografía de afinidad metal quelato
- Buffer de diálisis: 4 M de urea, 0.3 M NaCl, 50 mM y tris pH= 8.
- Buffer de replegamiento: 4 M de urea, 0.3 M NaCl, 50 mM, tris pH= 8, 10 mM DTT, 0.5 mM cistina y 5 mM cisteína.

### Caracterización

La caracterización de los péptidos se llevó a cabo por técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- Time Of Flight), se utilizó un equipo MALDI-TOF Bruker microflex, como matriz ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico y como referencia tamapina (es una toxina de alacrán selectiva para canales SK2, peso molecular 3465 g/mol) .

### Resonancia magnética nuclear

Los experimentos de resonancia magnética nuclear fueron realizados en un equipo Varian Unity inova 500 MHz. Los espectros se muestran en el anexo II. La asignación de los espectros se lleva a cabo en el programa CARAMA<sup>22</sup>. Los cálculos de la estructura tridimensional se llevaron a cabo con el programa CYANA.<sup>23</sup> El afinamiento por dinámica molecular se realizó con el programa AMBER.<sup>24</sup> Los cálculos de superficie de potencial se realizaron con el programa APBS.<sup>25</sup>

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## **Biosíntesis**

El sistema de expresión utilizado para la expresión de la mutante 3 es el pET32-a con ligeras modificaciones en el sitio de corte con trombina, este vector se utiliza en la expresión de proteínas de fusión con tiorredoxina, la cual ayuda a la correcta formación de los puentes disulfuro.

### **Mutaciones con PCR**

Las mutaciones propuestas se llevan a cabo por la técnica de PCR, las cuales se realizan en el siguiente orden y de manera consecutiva  $GS - DEF1 \rightarrow GM - DEF1 \rightarrow GM - mutante1 \rightarrow GM - mutante2 \rightarrow GM - mutante3$ .

Es indispensable que después de cada mutación se obtenga la secuencia del gen mutado antes de continuar con la siguiente mutación.

Las condiciones de PCR utilizadas para obtener todas las mutaciones (tabla 3) fueron similares, la temperatura de alineamiento fue el parámetro clave para conseguir las mutaciones sobre el plásmido. Todos los plásmidos fueron secuenciados, en el Anexo I se encuentra la secuencia para la mutante 3.

### **Transformación de células competentes**

Para llevar a cabo la transformación se introduce el plásmido dentro de la célula competente (ésta sometida a estrés en disoluciones de  $CaCl_2$ , lo cual estimula mecanismos de recombinación). En este trabajo se utilizó la cepa Rosetta de *Escherichia coli*, dado que el trabajo previo con GS-Def1, concluye que es la cepa en la cual se obtiene una mejor expresión de la proteína de fusión en la fracción soluble.<sup>14</sup>

### **Expresión**

El plásmido pET32-a, es un plásmido diseñado para la biosíntesis de péptidos el cual contiene el gen de la proteína de interés dentro del operon lac que puede ser regulado por IPTG, para este trabajo el gen de la mutante 3. El IPTG induce la sobreexpresión de la proteína de fusión, la cual puede quedar de manera soluble en el citoplasma (fracción soluble) o formando cuerpos de inclusión de manera insoluble (pellet). La secuencia de la proteína de fusión para mutante 3 se muestra en la ilustración 9.

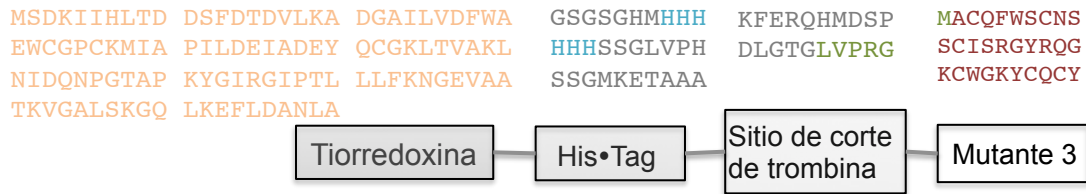


Ilustración 9. Secuencia y características de la proteína de fusión para mutante 3.

Una de las condiciones que se sabe afecta la solubilidad de la proteína de fusión es la temperatura de inducción; en general se observa que al disminuir la temperatura de inducción aumenta la cantidad de proteína de fusión en la fracción soluble.<sup>26,27</sup> Se probaron las condiciones de expresión presentes en la tabla 7. Entre las temperaturas 25, 30 y 37 °C se observan ligeras diferencias no significativas en cuanto a la obtención de la proteína en fracción soluble. Se observa una gran mejoría a 18 °C, donde aproximadamente la mitad del total de proteína producida se encuentra en la fracción soluble, ilustración 10. El decremento en la temperatura significa un incremento en los tiempos de expresión.

Tabla 7. Condiciones de cinética de expresión probadas

	GM-DEF1	GM-mutante1	GM-mutante2	GM-mutante3
37 °C		✓	✓	
30 °C		✓	✓	
25 °C		✓	✓	✓
18 °C	✓			✓

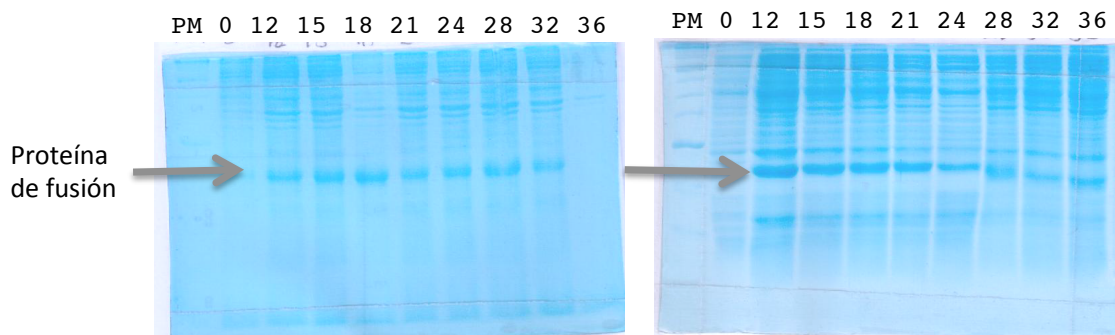


Ilustración 10. Cinética de expresión para GM-mutante3 a 18 °C, imagen izquierda sobrenadante, derecha pellet. El tiempo se muestra en la parte de arriba en horas. PM es el marcador de peso molecular

## Lisis

Las células se separan del medio de cultivo por centrifugación a 5000 x g, durante 10 min. Se decanta el medio y se resuspenden en buffer de lisis (entre 20-30 mL por gramo de pellet). Se sonicán para romper la membrana celular y que el contenido del citoplasma salga al medio (esto es lo que llamamos fracción soluble). Hay que cuidar que la muestra se mantenga fría para evitar la desnaturalización de proteínas.

La experiencia trabajando con la mutante 3 es que el lisado es un punto clave, realizarlo de manera correcta aumenta el rendimiento de purificación.

## Purificación

La purificación de la proteína de fusión se realiza en función de las características de la proteína y estas son únicas para cada molécula. Por lo tanto, deben de ser optimizados los parámetros necesarios.

De manera general, se mencionarán las características más importantes de la proteína de fusión para su purificación.

- His•Tag: 6 histidinas que funcionan como átomos donadores para metales; la proteína de fusión se puede separar por cromatografía de afinidad metal-quelato.
- Sitio de corte con trombina: Dentro de la proteína de fusión se encuentra la secuencia LVPRGM, la cual es reconocida por la enzima que corta entre R y G.
- Mutaciones realizadas de S a M (GM-DEF1): se puede realizar corte con bromuro de cianógeno el cual reacciona selectivamente con metionina, rompiendo el enlace peptídico.

## Cromatografía de afinidad metal-quelato

La proteína de fusión trae dentro de la secuencia un His•Tag (ilustración 9), que son 6 histidinas consecutivas, éstas se puede coordinar a un metal, haciendo un efecto quelato y, por lo tanto, se retiene con mucha afinidad a la columna que contiene  $Ni^{2+}$ . Las condiciones optimizadas para la purificación de proteína de fusión se presentan en la parte experimental. Es necesario tener dos precauciones: 1) mantener las disoluciones en frío para evitar la

desnaturalización y 2) agregar urea al final de la purificación para mejorar la solubilidad de la proteína de fusión, ilustración 11.

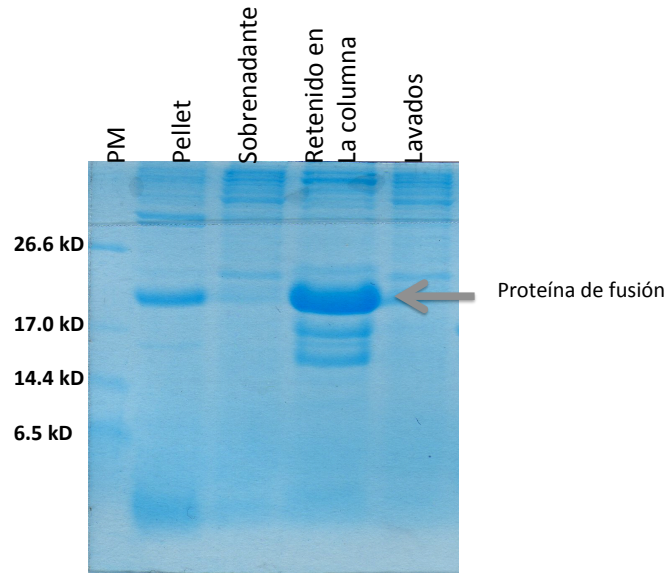


Ilustración 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 14%. Purificación de proteína de fusión por cromatografía de afinidad metal quelato.

### Reacción de corte con trombina

Para poder separar la proteína objetivo de lo que hemos llamado proteína de fusión, es necesario realizar un corte para obtener GM-mutante3. Para esto antes de la secuencia de la proteína de interés se introduce el sitio de corte específico para la proteasa trombina LVPRGM-mutante3 (ilustración 12). La trombina corta selectivamente entre R-G, dejando dos residuos: tiorredoxina y His•Tag (nombrado como residuo de corte) y otro con GM-mutante3, la secuencia de ambos fragmentos y el peso molecular se muestran en la ilustración 12.

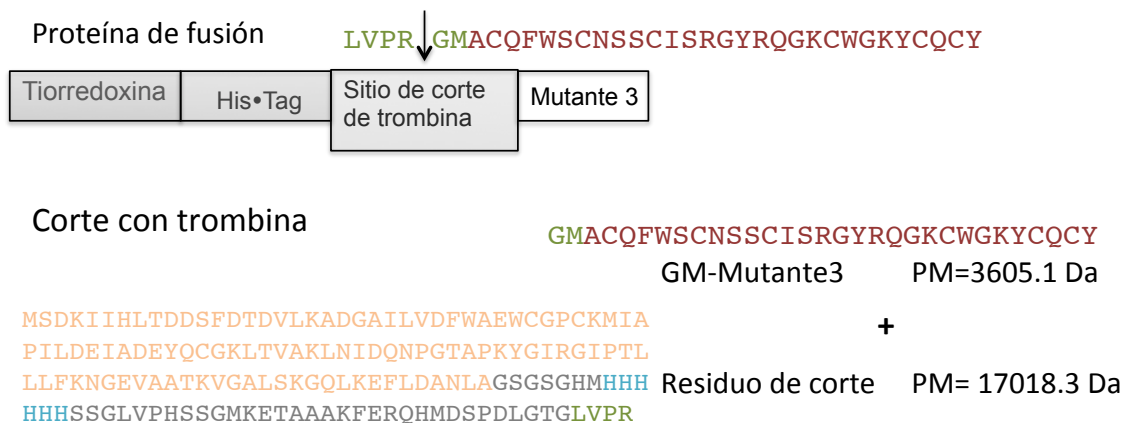


Ilustración 12. Resumen del corte con trombina, en la parte superior proteína de fusión. En la parte inferior productos de la reacción del corte con trombina.

Dado que el peso molecular del residuo de corte es de mayor al peso molecular de GM-mutante3; se determina la cinética de corte por el monitoreo de la desaparición de la proteína de fusión y la aparición del residuo de corte. Las condiciones utilizadas fueron las sugeridas por el manual<sup>28</sup> para un volumen de 1 mL: 50 mM tris, 7.5  $\mu$ g de trombina, 1 mg/mL de proteína de fusión, 10 mM CaCl<sub>2</sub>.

El principal problema que se presentó en este paso de purificación fue la solubilidad de la proteína de fusión en las condiciones sugeridas por el manual. Fue necesario determinar diferentes parámetros que afectan la solubilidad de la proteína.

- Concentración de CaCl<sub>2</sub>.
- Temperatura de reacción.
- Concentración de NaCl.
- Concentración de Urea.
- Concentración de cloruro de guanidinio.

El calcio es un agente complejante que puede interactuar con las cadenas laterales de los aminoácidos de una proteína para formar interacciones muy fuertes. De esta manera, entre más cloruro de calcio hay presente en la disolución más precipitado se observa. Se probó la reacción de corte a dos concentraciones de calcio distintas, como se muestra en la ilustración 13. La concentración elegida para trabajar es 2 mM de cloruro de calcio, ya que no se ve diferencia significativa con respecto al tiempo de corte en comparación a la cinética realizada con 5 mM de cloruro de calcio.

En cuanto a la temperatura, se probó la solubilidad de la proteína de fusión a 4 °C y a temperatura ambiente. Se determinó que no hay una diferencia significativa, la temperatura elegida de trabajo es la ambiente.

Al aumentar la concentración de cloruro de sodio aumenta la solubilidad de la proteína de fusión; sin embargo, tiene un efecto directo sobre la cinética de reacción y por lo tanto se deben optimizar las condiciones. La concentración de NaCl utilizada es 300 mM.

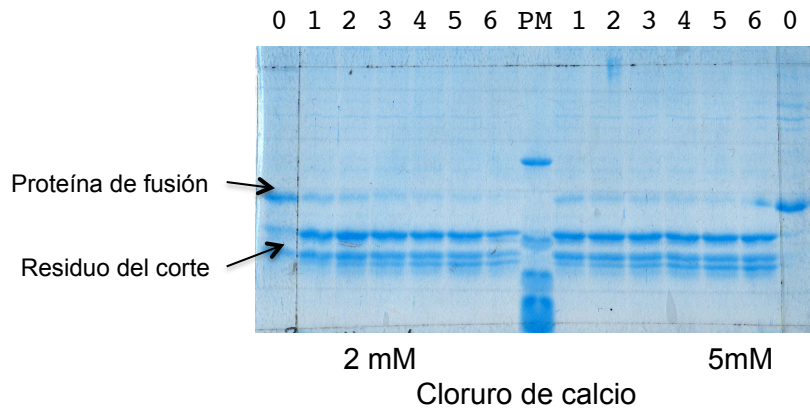


Ilustración 13. Cinética de corte con trombina para dos concentraciones de calcio.

En algunos casos la adición de un agente caotrópico en condiciones no desnaturalizantes ayuda a mantener a la proteína de fusión soluble. Se hicieron pruebas tanto con urea como con cloruro de guanidinio en concentraciones menores a 1M . Aquí surge una observación interesante, con urea aumenta la solubilidad, con cloruro de guanidinio se reduce. Esto se debe que el cloruro de guanidinio es un compuesto iónico que interfiere con las interacciones de tipo electrostático que la molécula pueda tener con el disolvente y, por lo tanto, disminuye su solubilidad; esto no ocurre con la urea ya que es un compuesto de tipo neutro.<sup>29</sup>

Se probaron dos concentraciones diferentes de urea 0.5 M y 1M, en ambas concentraciones la proteína de fusión se mantiene soluble cuando se prueban sin cloruro de calcio. Agregando 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, la proteína de fusión se mantiene soluble con 1 M de urea durante 24 horas, tiempo requerido para la reacción y precipita con 0.5 M de urea después de 12 horas.

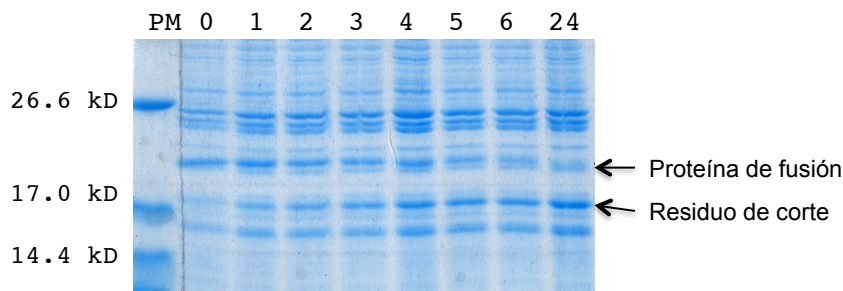


Ilustración 14. Cinética de reacción de corte con trombina para las condiciones optimizadas para la proteína de fusión de la mutante 3.



Se realiza la cinética de reacción con las condiciones optimizadas para 1 mL de reacción: 50 mM tris, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 300 mM NaCl, 1M urea, 2.25 µg de trombina, 1 mg/mL proteína de fusión. La cinética (ilustración 14) muestra que la reacción tarda mucho más tiempo en comparación con la mostrada en la ilustración 13, incluso después de 24 horas aún queda proteína de fusión. Se obtienen mejores en estas condiciones ya que se observa menos precipitado después del corte.

#### **Preparación de la muestra**

Después del corte con trombina la purificación de GM-mutante3 consiste en separarla de los productos del corte con trombina; para este fin se puede utilizar la cromatografía de fase reversa. Sin embargo, una preparación de muestra adecuada antes de inyectar al cromatógrafo, aumenta la concentración y pureza de la proteína, con lo que disminuye el tiempo requerido en el cromatógrafo y se cuida el equipo.

Para separar el residuo de corte y proteína de fusión restante de GM-mutante3 se aprovecha el His•Tag y se utiliza cromatografía de afinidad metal quelato. Siendo en este caso importante la fracción que no se retiene en la columna. Para retirar cualquier residuo mayor de 10 kDa no afín a la columna presente en la muestra, se hace pasar por el amicon con una membrana de 10 000. El péptido GM-mutante3 3.6 kDa pasa por la membrana junto con otras proteínas pequeñas. Para concentrar lo colectado del amicon se pasa nuevamente con una membrana de 1000, con lo que se eliminan residuos pequeños.

#### **Cromatografía de líquidos de alta eficiencia.**

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia o HPLC es una de las técnicas más utilizadas en la purificación de biomoléculas. Se basa en la separación de compuestos por su diferente interacción química con la columna o fase estacionaria y la fase móvil, que en este caso son líquidos. Se utilizó una columna de fase reversa (sus interacciones son de tipo no polar) Jupiter C18, la cual se utiliza en la separación de proteínas hidrofóbicas con pesos moleculares menores a 10 kDa. Se utilizan diferentes gradientes de acetonitrilo-agua como fase móvil, a la fase móvil se le agrega 0.05% de TFA que sirve para neutralizar cargas de los residuos ácidos de la proteína y que

mejorar la retención. Las condiciones optimizadas para la separación de la reacción de corte con trombina son las reportadas para el péptido GM-mutante3.

Con la finalidad de estimar la concentración del péptido durante la separación, se obtuvo el espectro de absorción de UV con una concentración de proteína 1 mg/ml, Ilustración 15. Los métodos de HPLC se monitorean a 280 nm.

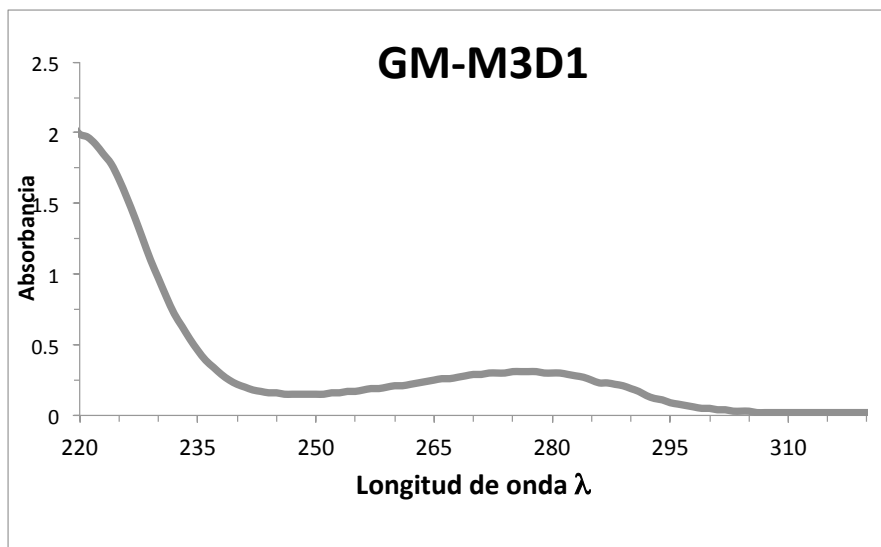


Ilustración 15. Espectro UV de GM-mutante3

Una vez purificada GM-mutante3 se liofiliza para que sea caracterizada por espectrometría de masas y RMN o para el corte con bromuro de cianógeno.

#### Corte con bromuro de cianógeno

Es una reacción no enzimática que rompe específicamente el enlace peptídico por el lado del carboxilo de los residuos de metionina.<sup>30</sup> Para llevar a cabo esta reacción partimos de la proteína GM-mutante 3 pura y caracterizada por espectrometría de masas.

Las condiciones optimizadas para el corte con bromuro de cianógeno ilustración 16, fueron las siguientes: preparar una disolución 10 mg/ml de proteína en 25% agua 75%TFA. Se agrega BrCN de tal forma que la relación molar sea 10:1 con la proteína. Se burbujea  $N_2$  ya que la muestra no debe contener oxígeno. Se deja en agitación por 16 horas. No se realizó cinética de corte, la única condición que se varió fue el contenido de TFA.<sup>31</sup>

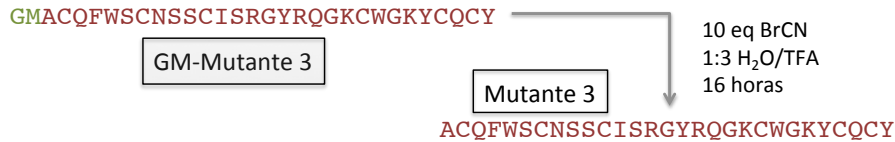


Ilustración 16. Condiciones de la reacción de corte con bromuro de cianógeno para GM-mutante3

El rendimiento de la reacción es estimado por HPLC el cual se usa para la purificación del péptido cortado. Se utiliza una columna fase reversa, Phenomenex Proteo C12, la cual es especial para la separación de péptidos de peso molecular menor a 10 000 D, esta columna nos permite separar entre mutante 3 y GM-mutante 3 con un gradiente adecuado. Un resumen del método optimizado se muestra en ilustración 17.

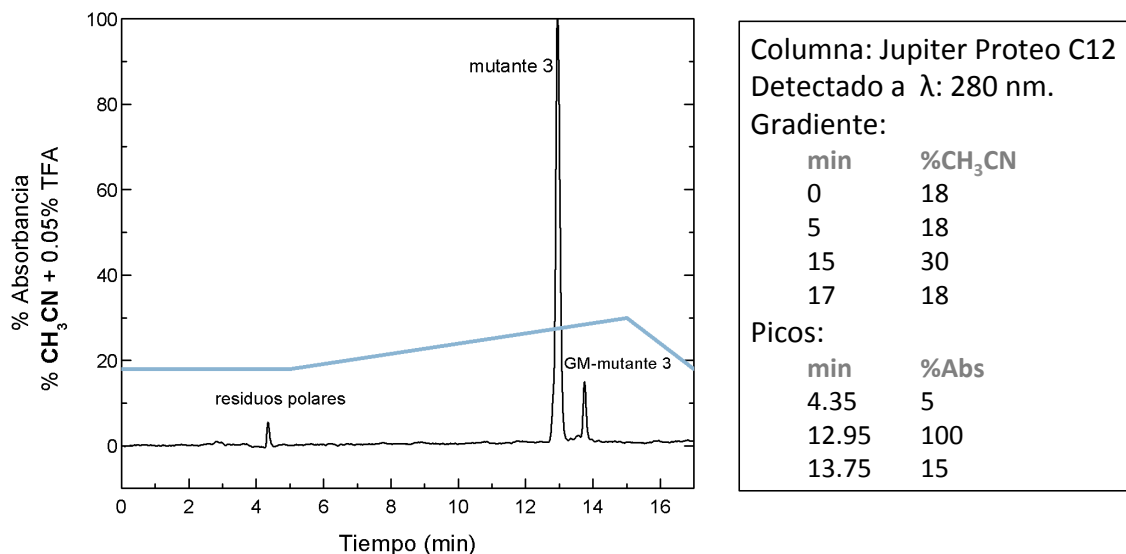


Ilustración 17. Izquierda: Cromatograma de separación de mutante 3 y GM- mutante 3, producto de la reacción con BrCN. Se normalizó la absorbancia al pico de mayor intensidad. Derecha: detalles del método.

Después de la purificación por HPLC, es necesario liofilizar la proteína para eliminar los disolventes ya que interfirieren con los experimentos de RMN.

### Replegamiento

Cuando la proteína tiende a acumularse en cuerpos de inclusión (pellet, geles de poliacrilamida ilustración 10 y Anexo I). Puede ser una ventaja ya que 1) los cuerpos de inclusión son aislados fácilmente por centrifugación y se obtiene la proteína en concentraciones altas y buena pureza, 2) la formación de cuerpos de inclusión protege a la proteína de la proteólisis.<sup>29</sup>

Para purificar los cuerpos de inclusión es necesario extraerlos y solubilizarlos, después es necesario replegar la proteína *in vitro*. La eficiencia del replegamiento depende de la naturaleza de cada proteína,<sup>32</sup> para la mutante 3 se llevó a cabo el replegamiento *in vitro* ya que gran parte de la proteína se encuentra en el pellet, en función de la temperatura de inducción, a continuación el procedimiento.

La proteína se extrae de los cuerpos de inclusión con 8 M urea, 0.3 M NaCl y 50 mM tris pH= 8, las cuales son condiciones desnaturalizantes. Para purificarla del resto de las biomoléculas se utiliza la Hitrap, aprovechando el péptido His•Tag. La proteína se dializa a 4 M de urea y buffer de lisis.

Se prepara una disolución 1mg/ml (aproximadamente 30 mL), se añadie DTT ditiotreitól en concentración 10 mM para reducir cualquier puente disulfuro presente. Se llevo a cabo la dilución, llevando la proteína a una concentración ≈ 30 µg/mL (casi un litro) utilizando buffer de replegamiento. La baja concentración dentro de un buffer que contiene un par redox (cistina/cisteína), ayuda a que la proteína se pliegue de manera correcta.<sup>33</sup>

Se reduce el volumen (≈1.03L) a 30 mL utilizando amicon con una membrana de tamaño de poro de 10 kDa, suficiente para que no pase la proteína de fusión, al reducir el volumen la concentración de proteína de fusión será ≈ 1mg/ml. Después se continúa con el corte con trombina. El resultado de la proteína obtenida por este método fue caracterizado por espectrometría de masas (ver anexo I).

### **Caracterización**

La caracterización de las proteínas obtenidas se lleva a cabo por espectrometría de masas por la técnica de MALDI- TOF. En la tabla 8 se muestra los pesos esperados para los péptidos obtenidos.

Tabla 8. Peso molecular calculado para GM-mutante3 y mutante, con y sin puentes disulfuro.

Péptido	Peso molecular
GM-mutante3 sin puentes disulfuro	3605.1
GM-mutante3 con puentes disulfuro	3599.1
Mutante 3 sin puentes disulfuro	3416.9
Mutante 3 con puentes disulfuro	3410.9

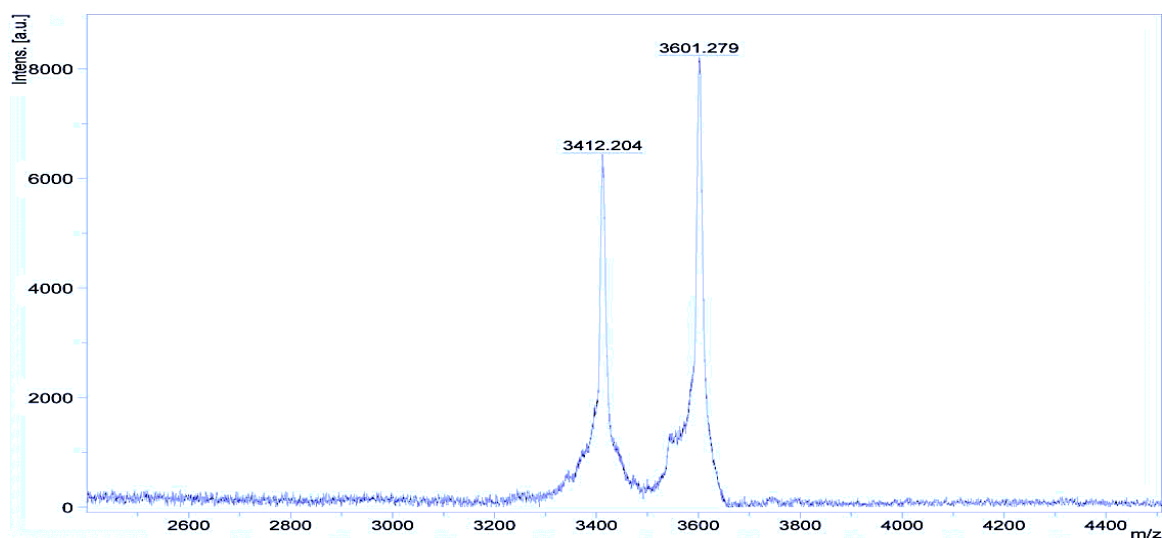


Ilustración 18. Espectrometría de masas por técnica de MALDI-TOF. Se muestra producto de la reacción de corte con BrCN, mezcla de GM-mutante3 (3601.28 m/z) y mutante 3 (3412.2 m/z)

En la ilustración 18 se observa las masas de los productos de la reacción de corte con bromuro de cianógeno y, por tanto, están presentes tanto GM-mutante3 (3601.28 m/z) y mutante 3 (3412.2 m/z), las masas corresponden al péptido- $H^+$  menos 6 unidades ya que la formación del puente disulfuro es una oxidación de la cisteína en la cual se pierden 2 átomos de hidrógeno, esta diferencia en masa nos indica la presencia de tres puentes disulfuro. (tabla 6).

### *Resonancia magnética nuclear*

#### **Preparación de la muestra.**

El deuterio en resonancia magnética nuclear se utiliza para anclar el equipo a una radiofrecuencia determinada. En el estudio de proteínas la presencia de solventes deuterados no es deseada ya que tiene una constante de intercambio grande en átomos electrodonadores como O y N; por lo tanto, se perderían las señales de los protones de amida del enlace peptídico, contar con esta información es crucial para la interpretación de los espectros. La muestra se coloca en 95% de agua y 5% de óxido de deuterio.

Todos los experimentos de RMN utilizados para la mutante 3 se llevaron a cabo con la secuencia de pulsos específica para la supresión de agua excitation sculpting.

### Experimentos de RMN $^1\text{H}$ .

Del espectro obtenido para el experimento de RMN de protón (ilustración 19) podemos deducir que la proteína se encuentra plegada ya que hay señales entre 10 ppm y 7 ppm, que es donde se encuentran los protones pertenecientes a las amidas del enlace peptídico y los protones aromáticos; de 4 ppm a 1 ppm se observan los protones alifáticos de las cadenas laterales de los aminoácidos. De no estar plegada la proteína, se esperaría que todos los aminoácidos interaccionaran con el disolvente de la misma manera y, por lo tanto, se esperaría un desplazamiento químico similar, con lo que se observaría un cumulo de señales entre 7-8 ppm.<sup>4</sup> Al estar plegada, los hidrógenos del esqueleto de los aminoácidos forman puentes de hidrógeno e interaccionarán de manera distinta con el disolvente (ilustración 20), lo que causa la dispersión de las señales.

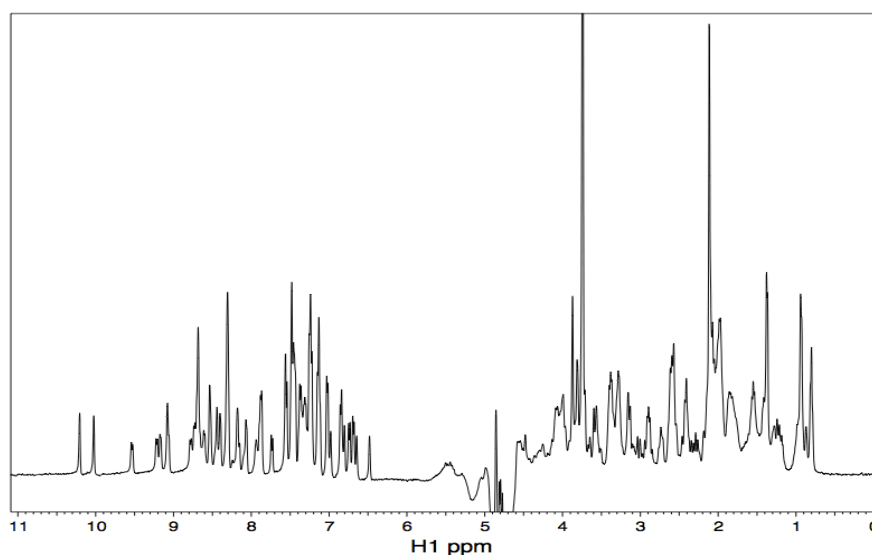


Ilustración 19. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para GM-mutante3.

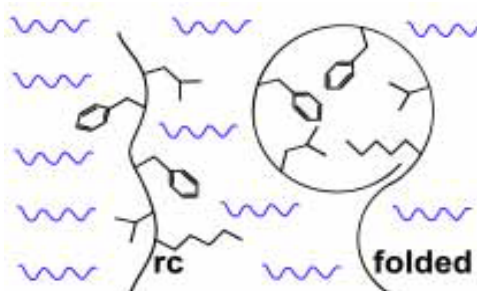


Ilustración 20. Diferencias de interacción con el disolvente para un péptido desplegado (RC random chain, lado izquierdo) y para un péptido plegado (folded, lado derecho). Tomada de referencia 3.

## Experimentos de RMN en 2D

Para poder obtener la estructura terciaria de GM-Mutante3, se obtuvieron espectros en dos dimensiones, COSY, TOCSY y NOESY, ver anexo II. Los espectros son necesarios para llevar a cabo la asignación de los aminoácidos (ver ilustración 7, antecedentes). El más importante es el NOESY ya que la intensidad de las señales está relacionada con la distancia a la cual se encuentran los átomos, los cálculos para determinar la estructura terciaria utilizan las señales de este experimento.

Para realizar la asignación es indispensable contar con la estructura primaria de la proteína. Se comienza identificando un sistema de espín que no tenga traslape y que el sistema de espín no se confunda con el de otro aminoácido, en el caso de GM-mutante3 un buen candidato para empezar la asignación es la alanina ya que presenta un sistema de espín muy característico, para ejemplificar la asignación lo llamaremos aminoácido  $i$ . Una vez identificado el sistema de espín con los experimentos COSY y TOCSY, se busca el aminoácido en el espectro NOESY y se identifica el aminoácido secuencial ( $i-1$ ), en el cual se espera una interacción fuerte del  $NH_i$  con  $H\alpha_{i-1}$ . Esto dependerá del ángulo de torsión entre los aminoácidos.

Con ayuda de los 3 espectros obtenidos, se identifican todos los sistemas de espín presentes en la proteína; este procedimiento puede ser tardado dependiendo de la complejidad de la proteína. Una vez identificados todos los sistemas de espín, se procede a la localización de señales en el experimento NOESY de aminoácidos no secuenciales, lo que significa que se encuentren cercanos en distancia más no en la secuencia primaria. La asignación de este tipo de señales es clave ya que son las interacciones provenientes de la estructura terciaria de la proteína. Es importante mencionar que las diferentes estructuras secundarias presentan patrones característicos, dependiendo de la orientación de los aminoácidos y de la calidad del espectro.

La asignación de los espectros se lleva a cabo utilizando el programa CARA (computer Aided Resonance Assignment), con interfaz para XEASY, ambos programas fueron desarrollados por el equipo de investigación de Dr. Wüthrich.

## Cálculos de la estructura terciara

### CYANA

Conociendo las distancias  $<5 \text{ \AA}$  entre los protones de la molécula, gracias a la asignación del experimento NOESY y la estructura primaria de la proteína, el arreglo tridimensional de los átomos en el espacio se puede calcular utilizando el programa CYANA.<sup>34</sup>

El programa CYANA establece las restricciones de distancia en función del valor de la integral de cada señal en el espectro NOESY y respeta los ángulos de torsión permitidos para la molécula. El programa realiza ciclos de cálculos, cada ciclo toma como base el ciclo anterior hasta completar 7.<sup>35</sup> En cada uno de los ciclos se calculan 100 estructuras de las cuales se seleccionan las 20 estructuras que mejor cumplan las restricciones tanto de distancia como de ángulo de torsión, si es necesario el programa reasigna las señales o no las toma en cuenta.

El afinamiento de la estructura consiste en hacer una evaluación de la asignación del espectro NOESY con los datos que arroja el cálculo con el programa CYANA. La evaluación se hizo de manera manual, considerando únicamente las señales que salen de los parámetros establecidos por CYANA.

El cálculo de la estructura se realizó de dos formas, la primera indicándole al programa la conexión de los puentes disulfuro C1-C4, C2-C5, C3-C6 (es la conexión observada en defensina 1) y la segunda se realiza suponiendo que no hay puentes disulfuro en la molécula.

Los resultados de ambos cálculos se muestran en la ilustración 21, presentan una estructura de hélice alfa sobre hoja beta. Lo cual sugiere que los puentes disulfuro indicados son correctos.

En la ilustración 22 se muestra el gráfico de Ramachandran, en el cual se grafican los ángulos de torsión del enlace peptídico  $\varphi$  y  $\phi$ , para las 20 estructuras obtenidas en el cálculo, 65.4% se encuentran en regiones muy favorecidas (azul) y 34.6 % se encuentran en regiones permitidas (lila).



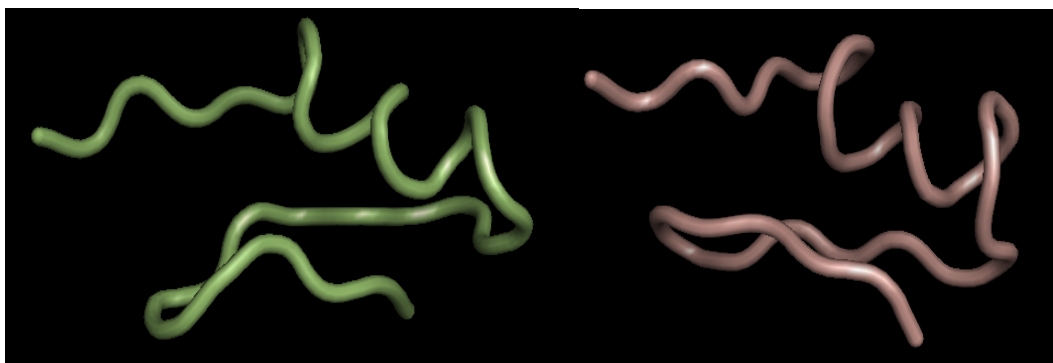


Ilustración 21. Cálculos de la estructura tridimensional de GM-mutante3 con CYANA. Izquierda: cálculos restringiendo los puentes disulfuro. Derecha: cálculo sin restricción.

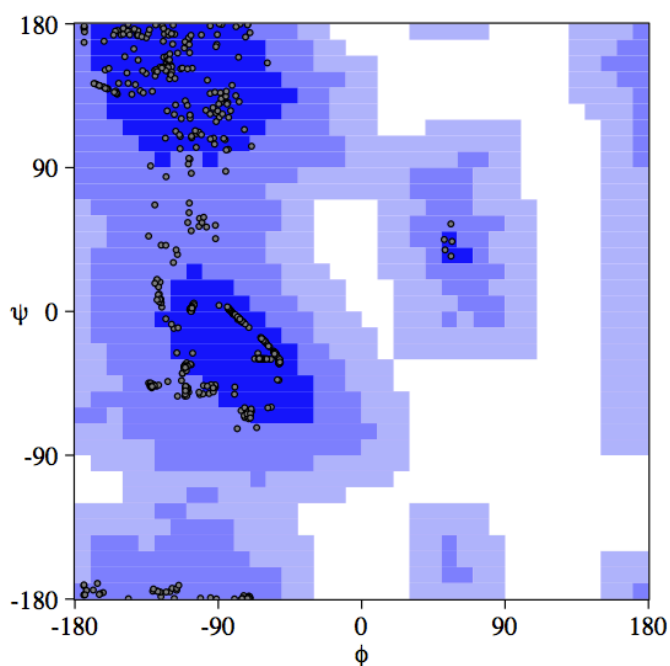


Ilustración 22. Gráfico de Ramachandran GM-mutante 3.

En la ilustración 23 se muestran las relaciones de las señales NOE para  $^1\text{H}_\alpha$ ,  $^1\text{H}_\beta$  y  $^1\text{H}_\text{N}$ . Las primeras tres filas son distancias que se manifiestan en los NOEs secuenciales  $(i, i+1)$ ,<sup>4</sup> el grosor de la línea es proporcional a la intensidad del NOE. Las interacciones  $i, i+2$  -  $i, i+3$  e  $i, i+4$  se observan con NOE de mediano alcance, patrones en estas distancias nos permiten analizar tipos de estructuras secundarias. En la ilustración 21 se observa la formación de una hélice alfa de C9 a I14. Lo cual corresponde con interacciones observadas para  $d_{\text{NN}}(i, i + 2)$ ,  $d_{\alpha\text{N}}(i, i + 3)$  (ilustración 23). En la ilustración 24 se muestran gráficas acerca de la asignación realizada.

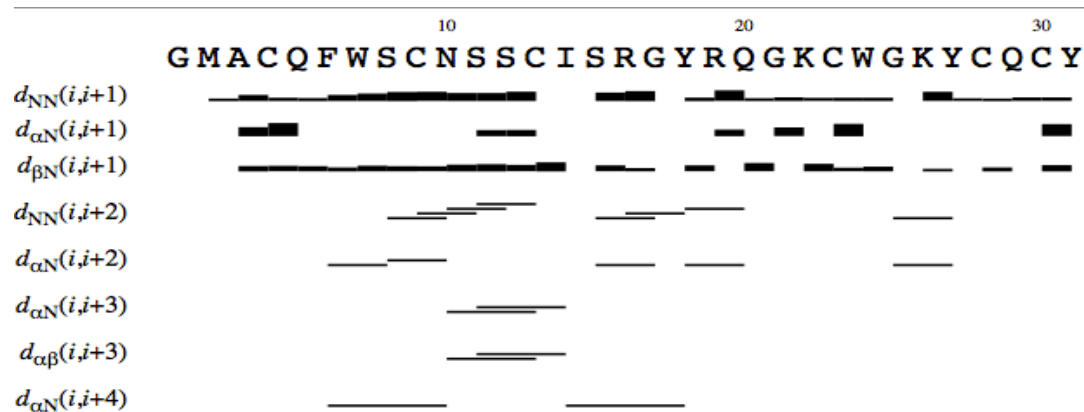


Ilustración 23. Interacciones NOE por aminoácido. Las primeras 3 filas (corresponden a NOE secuenciales y la altura es proporcional a la intensidad de la señal. La otras filas denotan patrones de estructura secundaria.

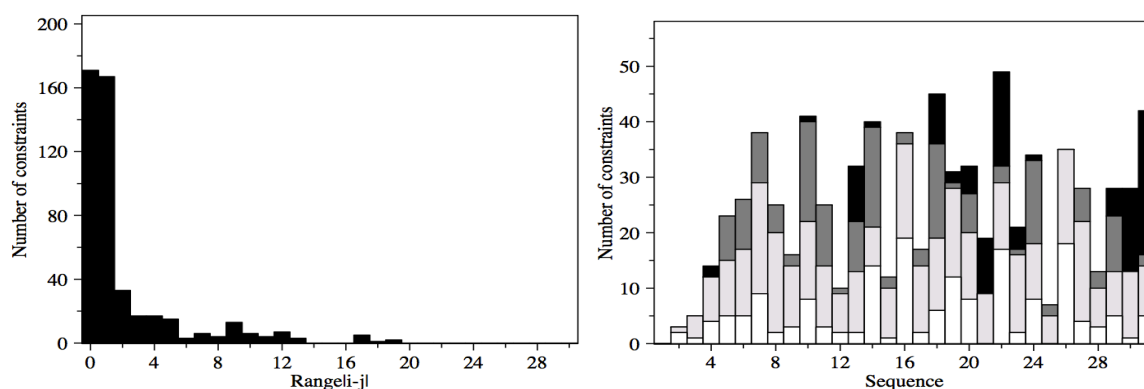


Ilustración 24. Gráfica izquierda: distribución de NOEs a corta y larga distancia. Gráfica derecha: número de restricciones de distancia para cada aminoácido, intrarresiduo (blanco), corto alcance (gris claro), mediano alcance (gris fuerte) y largo alcance (negro).

### AMBER

AMBER es un conjunto de programas utilizados en modelado molecular y simulaciones moleculares, consiste en una base de datos de estructuras proteicas, un archivo de parámetros de campo de fuerza y una serie de programas.<sup>24</sup> Las 20 estructuras del cálculo de CYANA se someten a cálculos de dinámica molecular, donde se calcula el arreglo más favorable con restricciones fisicoquímicas, tomando en cuenta la interacción con el disolvente, que en este caso es el agua. La estructura de menor energía se muestra en la ilustración 25.

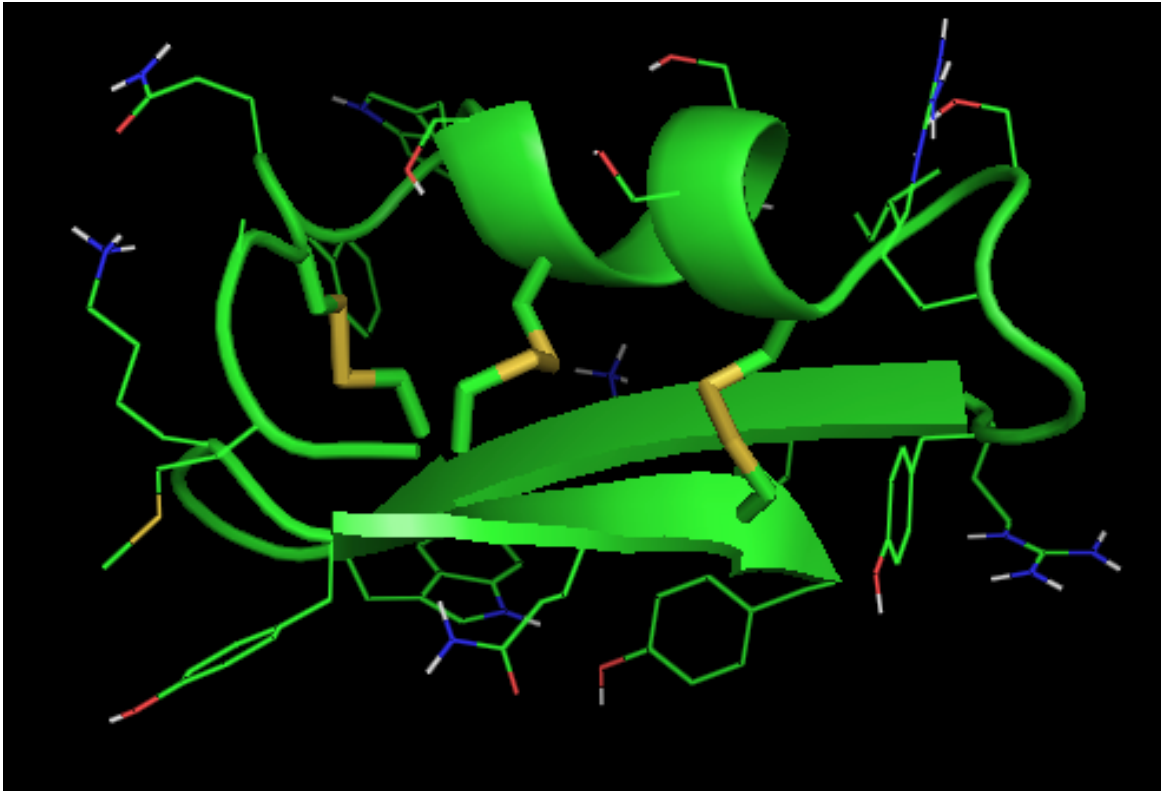


Ilustración 25. Estructura de menor energía de simulación con AMBER para mutante 3.

La estructura de GM-mutante3 muestra un motivo estructural CS  $\alpha/\beta$ , estabilizado por tres puentes disulfuro con conectividad convencional, C1-C4, C2-C5 y C3-C6, en la ilustración 25 se muestran los residuos de aminoácidos polares, como es de esperarse la mayoría se encuentran en la parte externa de la proteína, interactuando con moléculas de agua.

La conectividad de los puentes disulfuro en GM-mutante3, presenta la característica  $C_i - C_j, C_{i+4} - C_{j+2}$  que en la mutante corresponden a  $C_2 - C_{21}, C_6 - C_{23}$ , de la familia de toxinas alfa-Ktx ambas comparten el motivo estructural.

El motivo estructural es el mismo que para GS-DEF1 y, por lo tanto, podemos decir que se conserva a pesar de las mutaciones, la sobreposición de las estructuras se muestra en la ilustración 26, en esta se observa que el asa que se observa en GS-DEF1 antes de empezar la hoja beta (ilustración 3, antecedentes) ya no se encuentra en la GM-mutante3, esto corresponde a la delección IQY. Las mutaciones Y20K y Q32Y no afectan la estructura terciaria.

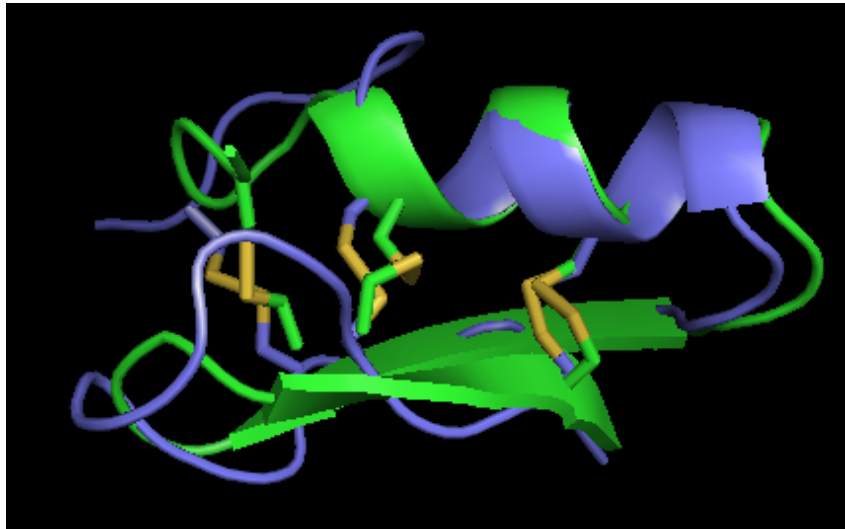


Ilustración 26. Comparación GM-mutante3 color verde y GS-Def1 color morado.

En la ilustración 27 se muestra la comparación de la superficie de potencial electrostático para GS-DEF1 y GM-mutante3, calculado con el programa APBS, ambas presentan una alta densidad de carga positiva, sin embargo la superficie de potencial es mucho más homogénea para GM-mutante3, las diferencias en la superficie de potencial nos pueden sugerir que habrá una diferencia en la actividad biológica; sin embargo, es necesario realizar pruebas específicas con ambos péptidos sobre canales iónicos de potasio para poder discutir acerca de su actividad.

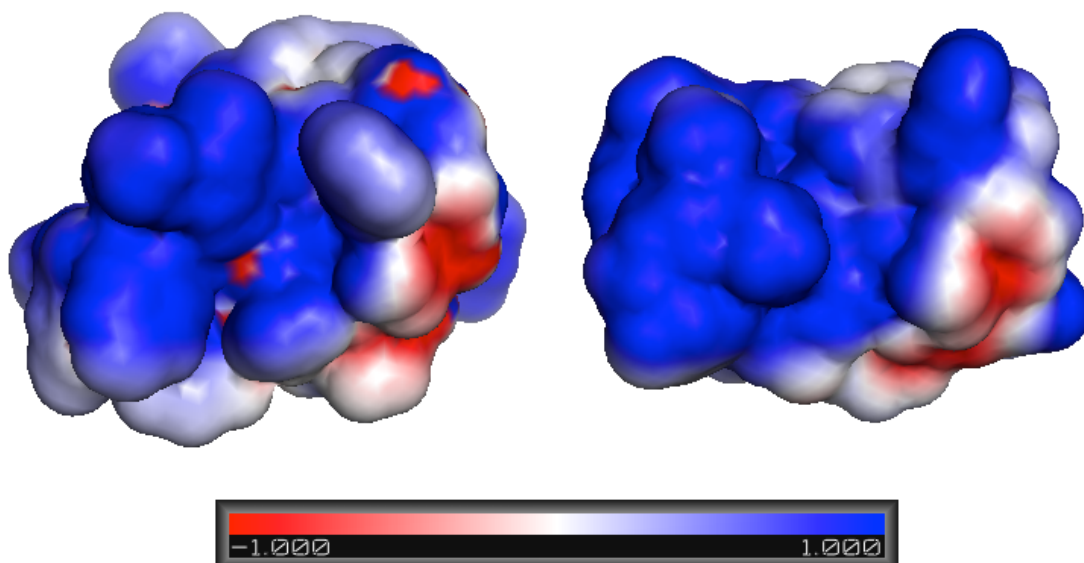


Ilustración 27. comparación superficie de potencial electrostático. Izquierda GS-Def1, derecha GM.mutante3.

# CONCLUSIONES

Se logró obtener el plásmido con la secuencia correcta de mutante 3 para poder ser insertado dentro de la cepa Rosetta de *E. coli*. Se llevó a cabo la biosíntesis y purificación del péptido. Se encontraron condiciones óptimas para el replegamiento *in vitro*.

La obtención del péptido fue confirmada por espectrometría de masas, de la masas podemos saber que hay presencia de tres puentes disulfuro, el experimento de RMN <sup>1</sup>H nos indica que la proteína está plegada.

Gracias a la obtención de los espectros de RMN en dos dimensiones COSY, TOCSY y NOESY se pudo llevar a cabo la asignación de los sistemas de espín que permitieron obtener la estructura terciaria de la mutante 3.

La estructura de la mutante 3 presenta una hélice alfa unida a una hoja beta por tres puentes disulfuro con conectividad clásica, lo que hace que mutante 3 tenga las características típicas de la familia alfa-Ktx.

El motivo estructural CS- $\alpha/\beta$  presente en la mutante 3 es el mismo que el defensina 1, por lo tanto las mutaciones realizadas no afectan a la estructura terciaria.

### *Perspectivas*

Las pruebas de actividad con canales iónicos de potasio es la prueba necesaria para establecer una relación evolutiva entre defensinas y toxinas bloqueadoras de canales iónicos de potasio presentes en el alacrán.

# BIBLIOGRAFÍA

1. Rodríguez de la Vega, R. C. *et al.* Antimicrobial peptide induction in the haemolymph of the Mexican scorpion; *Centruroides limpidus limpidus* in response to septic injury. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**, 1507–1519 (2004).
2. Miller, C. The charybdotoxin family of K<sup>+</sup> channel-blocking peptides. *Neuron* **15**, 5–10 (1995).
3. Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389–395 (2002).
4. Wüthrich, K. NMR studies of structure and function of biological macromolecules. (2002). Nobel lecture, [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2002/wuthrich-lecture.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/wuthrich-lecture.html). Visitada en octubre 2013.
5. Ganz, T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology* **3**, 710–720 (2003).
6. Jimenez. *Biología Celular Y Molecular*. (Pearson Educación, 2003)
7. MacKinnon, R. Potassium Channels and the Atomic Basis of Selective Ion Conduction. (2003).
8. Rodríguez de la Vega, R. C. & Possani, L. D. Current views on scorpion toxins specific for K<sup>+</sup>-channels. *Toxicon* **43**, 865–875 (2004).
9. Saucedo, A. L. *et al.* New Tricks of an Old Pattern: Structural Versatility of Scorpion Toxins with Common Cysteine Spacing. *J. Biol. Chem.* **287**, 12321-12330 (2012).
10. Flores-Solis, David. Biosíntesis, purificación, caracterización y determinación estructural por RMN de la toxina de alacrán TS16. Tesis de maestría, UNAM (2012).
11. Torres, A. M. *et al.* Solution structure of CnErg1 (Ergtoxin), a HERG specific scorpion toxin. *FEBS Lett.* **539**, 138–142 (2003).
12. Chagot, B. *et al.* An unusual fold for potassium channel blockers: NMR structure of three toxins from the scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochemical Journal* **388**, 263 (2005).
13. Zhu, S., Li, W., Jiang, D. & Zeng, X. Evidence for the Existence of Insect Defensin-Like Peptide in Scorpion Venom. *IUBMB Life* **50**, 57–61 (2000).
14. Franco-Bodek, D. Diseño, expresión, purificación y replegamiento para la caracterización por resonancia magnética nuclear de la defensina 1. Tesis de maestría, UNAM (2011).
15. Pochapsky, T. C. & Pochapsky, S. S. *NMR for physical and biological scientists*. (Taylor & Francis, 2007).
16. Levine, I. N. *Química cuántica*. (Pearson Educación, 2001).
17. Del Río-Portilla, F. & Ramirez-Cordero, B. in *Advances in Protein Physical Chemistry* 1–19 (Transworld Research Network, 2008).



18. Drago, R. in *Physical Methods for Chemist* (Sounders College Publishing, 1965).
19. Del Rio-Portilla, F. Determinación de la Estructura de Proteínas por Resonancia Magnética Nuclear. *Mensaje Bioquímico XXVII*, 65–83 (2003).
20. Keeler, J. *Understanding NMR Spectroscopy*. (Wiley, 2010).
21. in 80 (Novagen, 01/06).
22. Software CARA. at <http://cara.nmr.ch/doku.php>. Visitado enero 2014
23. Herrmann, T., Güntert, P. & Wüthrich, K. Protein NMR Structure Determination with Automated NOE Assignment Using the New Software CANDID and the Torsion Angle Dynamics Algorithm DYANA. *Journal of Molecular Biology* **319**, 209–227 (2002).
24. Amber Reference Manual. at <http://ambermd.org/doc12/>. Visitado enero 2014
25. Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J. & McCammon, J. A. Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *PNAS* **98**, 10037–10041 (2001).
26. Strandberg, L. & Enfors, S. O. Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1669–1674 (1991).
27. Jones, P. G., VanBogelen, R. A. & Neidhardt, F. C. Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**, 2092–2095 (1987).
28. User Manual Thrombin CleanCleave kit. <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/recomtbul.pdf>. Visitado enero 2014.
29. Monera, O. D., Kay, C. M. & Hodges, R. S. Protein denaturation with guanidine hydrochloride or urea provides a different estimate of stability depending on the contributions of electrostatic interactions. *Protein Sci* **3**, 1984–1991 (1994).
30. Inglis, A. S. & Edman, P. Mechanism of cyanogen bromide reaction with methionine in peptides and proteins: I. Formation of imidate and methyl thiocyanate. *Analytical Biochemistry* **37**, 73–80 (1970).
31. Schroeder, W. A., Shelton, J. B. & Shelton, J. R. An examination of conditions for the cleavage of polypeptide chains with cyanogen bromide: Application to catalase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **130**, 551–555 (1969).
32. Creighton, T. E. Protein folding. *Biochem. J.* 1–16 (1990).
33. Wingfield, P. T., Palmer, I. & Liang, S.-M. in *Current Protocols in Protein Science* (John Wiley & Sons, Inc., 2001). at
34. Web Portal of CYANA at <http://www.enmr.eu/webportal/cyana.html>. Visitado diciembre 2013.
35. Güntert, P. in *Protein NMR Techniques* (Downing, A. K.) 353–378 (Humana Press, 2004).

# ANEXOS

## *ANEXO I. Obtención de los péptidos.*

Reactivos y proveedores utilizados en los experimentos.

Reactivo	Marca
Acetonitrilo, grado HPLC	Fermont
Ácido trifluoroacético (TFA)	Sigma Aldrich
Agar	Sigma Aldrich
Ampicilina	Goldbio
Cloranfenicol	Goldbio
Cloruro de níquel R.A.	Reasol
Cloruro de sodio RA	Reasol
Ditiotreitol (DTT) 99%	Sigma-Aldrich
EDTA	Reasol
Imidazol 99%	Sigma Aldrich
IPTG Isopropil-b-D-1-tiogalactopiranosido	Goldbio
L-cisteína 98%	Sigma
L-cistina G. Reactivo	Sigma
Medio de cultivo LB:	Sigma Aldrich
Trizmahidrocloruro 99%	Sigma
Urea 98%	Sigma Aldrich

### Composición de las disoluciones utilizadas.

Disoluciones	Composición
Medio de cultivo LB	10 g de triptona 5 g de extracto de levadura 10 g NaCl
Buffer de lisis	300 mM de NaCl 50 mM tris pH=8
Buffer de elución	300 mM de NaCl 50 mM tris pH=8 300 mM de imidazol
Buffer de corte	300 mM de NaCl 50 mM tris pH=8 1 M de urea
Buffer de repliegamiento	300 mM de NaCl 50 mM tris pH=8 0.8 M de urea 0.5 mM cistina 5 mM cisteína

### Secuencia del plásmido de mutante 3.

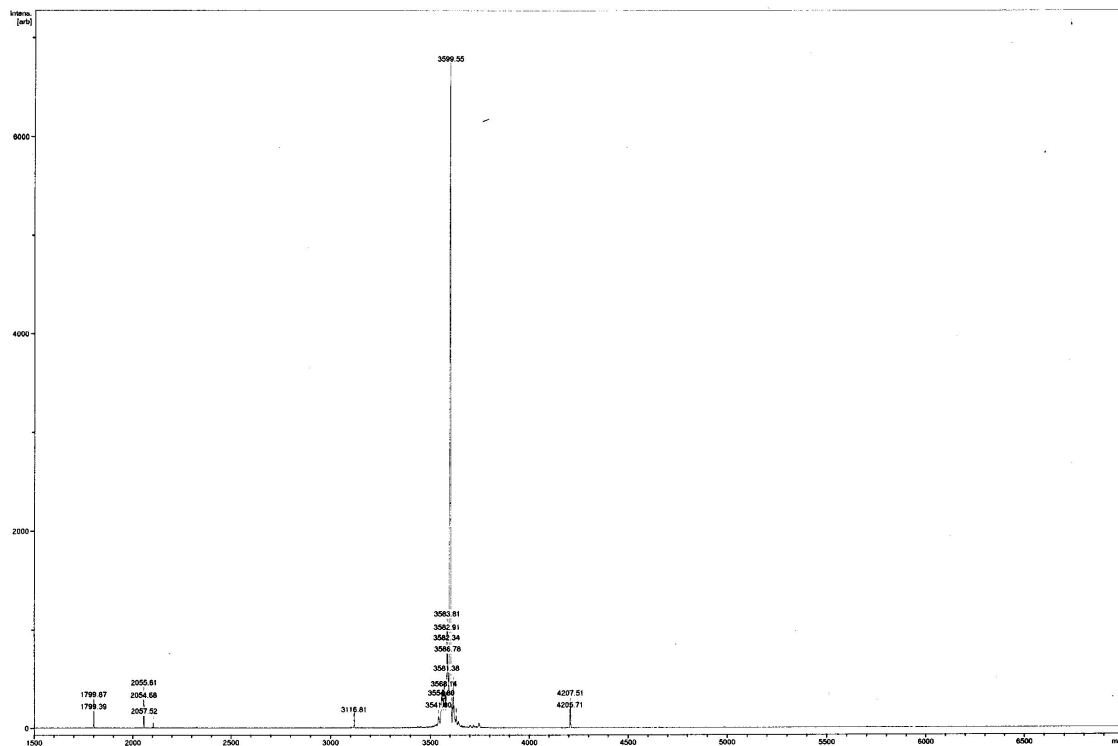
```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATACATATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGACAGTTTGGACACGGATGACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTCGATTCTGGCGAGAGT
M S D K I I H L T D D S F D T D V L K A D G A I L V D F W A E
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
GGTGGCGTCCGTGCAAAATGATCGCCCGATTCTGGATGAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACCTGACCGTTGCAAAACTGAACATCGATCAAAACCC
W C G P C K M I A P I L D E I A D E Y Q G K L T V A K L N I D Q N P
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
TGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAACCGGTGAAGTGGCGCAACCAAAGTGGGTGCCTGTCTAAAGGT
G T A P K Y G I R G I P T L L L F K N G E V A A T K V G A L S K G
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
CAATTGAAAGAGTTCTCGACGCTAACCTGGCCGGTTCGGTTCGGCCATATGCACCATCATCATCATTCTTCTGGTCTGGTCCACACAGTTCTG
Q L K E F L D A N L A G S G S G H M H H H H H S S G L V P H S S
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
GTATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAATTCGAAACGCGAGCACATGGACAGCCCGAGATCTGGGTACCGGTCTGGTGCCTCGCGGTATGGCGTGCCAAATTTG
G M K E T A A A K F E R Q H M D S P D L G T G L V P R G M A C Q F W
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
GTCTTGCACCTCTTCTTCATCTCTGTTGTTACCGTCAAGGTAAATGCTGGGGTAAACTACTGCCAGTGTCTACTAGGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGA
S C N S S C I S R G Y R Q G K C W G K Y C Q C Y * G S E F E L R R
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
610     620     630     640     650     660     670     680
CAAGCTTGGCGCCGCACTCGAGCACCCACCACCACCAGTGAATCCGGCTGCTAAACAAAGCCCGAANGNNNNNNNNN
Q A C G R T R A P P P P L R S G C * Q S P X X X X

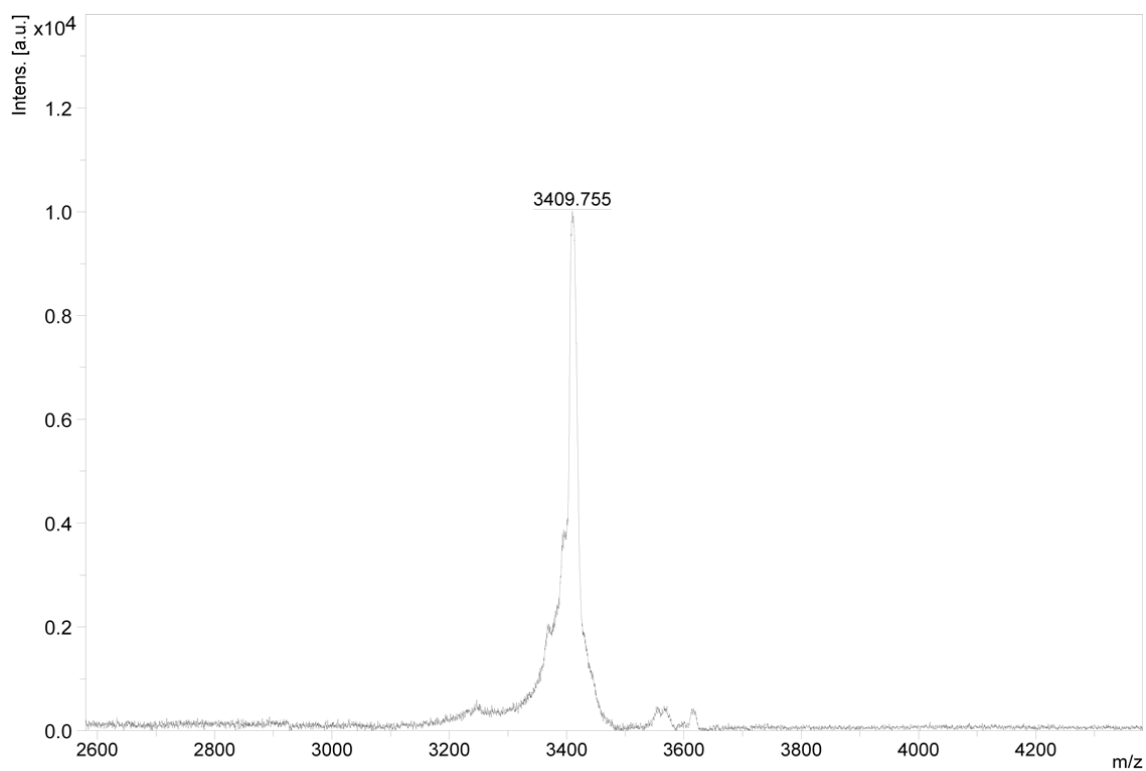
```

Espectrometría de masa por técnica de MALDI-TOF para los péptidos GM-mutante 3 y mutante 3 puros.

### GM-Mutante 3

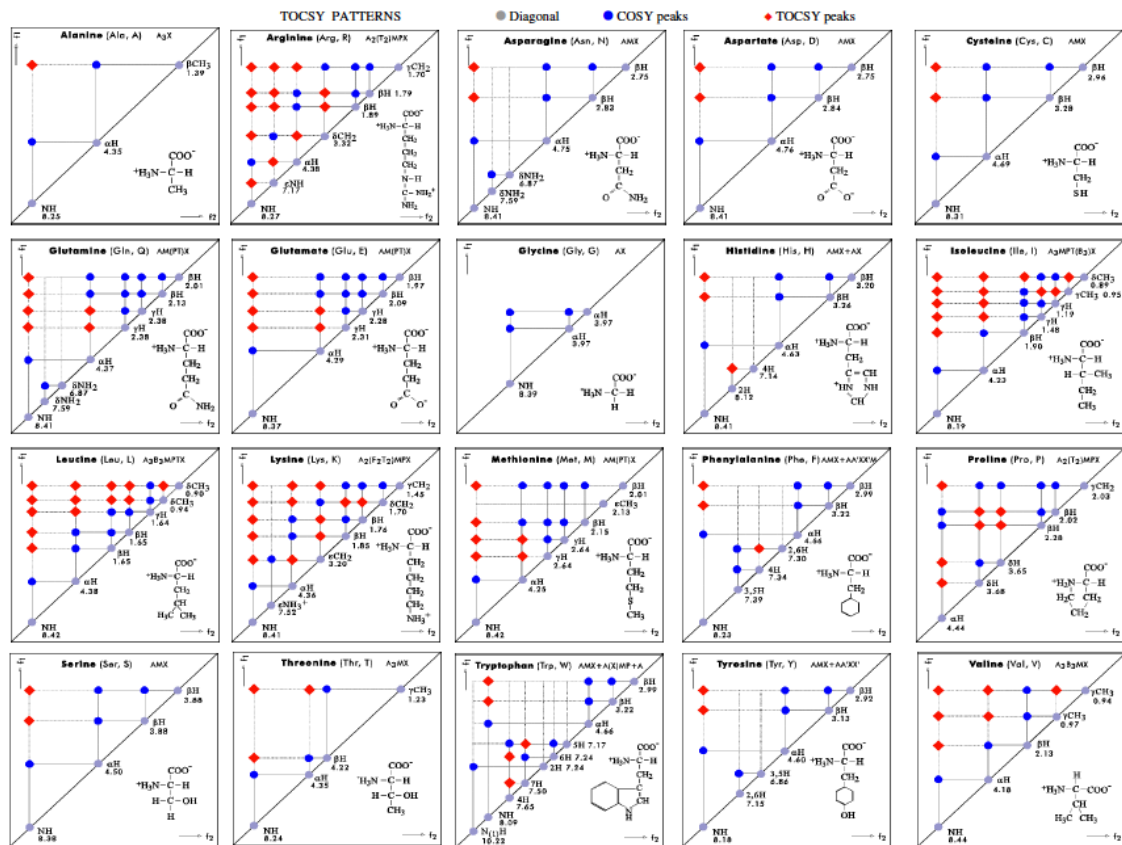


### Mutante 3

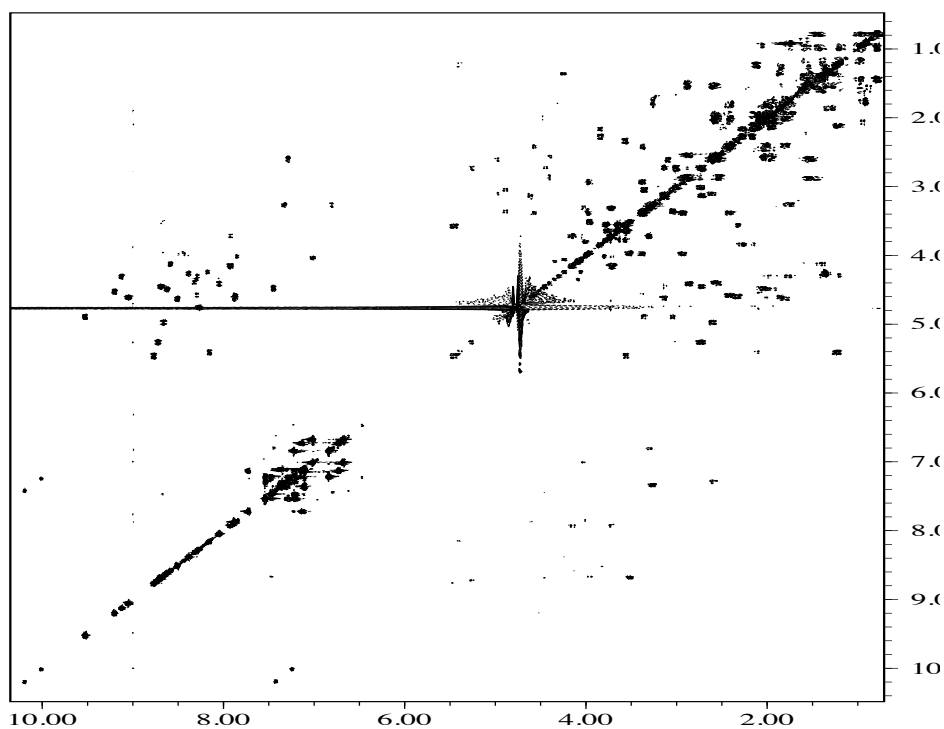


## Anexo II. Determinación de la estructura terciaria por RMN.

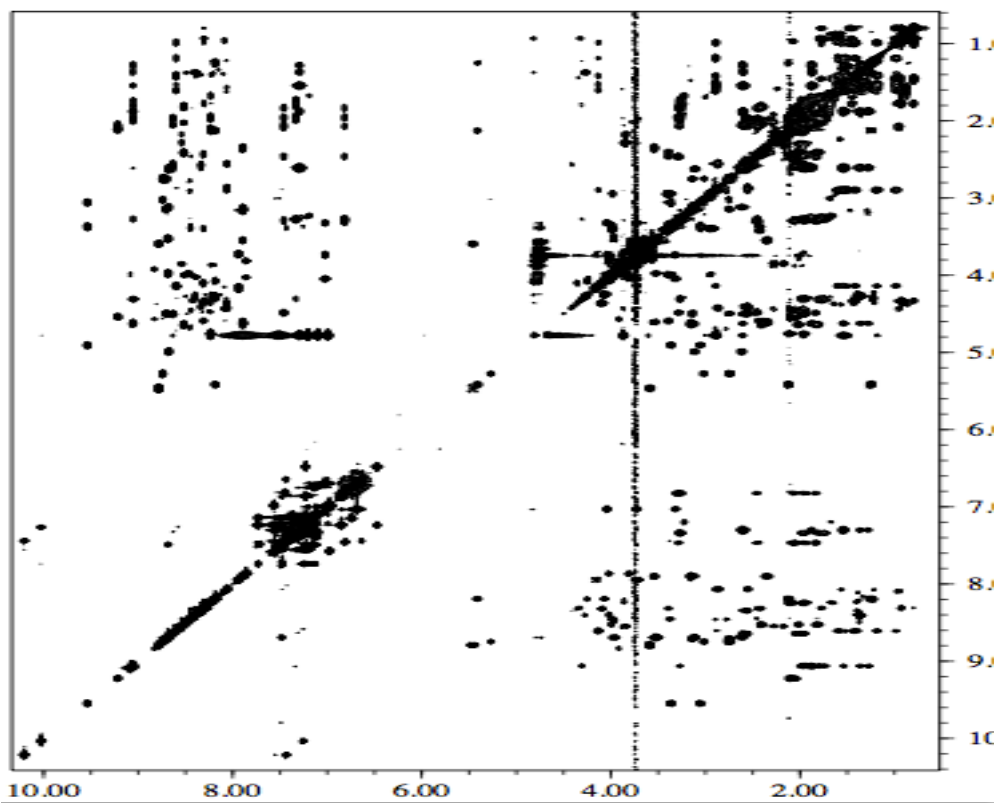
### Patrones TOCSY de los aminoácidos.



### Experimento COSY GM-mutante3



Experimento TOCSY GM-mutante3



Experimento NOESY GM-mutante3

