



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS

BIOSÍNTESIS, ESTUDIO ESTRUCTURAL Y CITOTOXICIDAD DE  
PÉPTIDOS TIPO TOXINAS DE ALACRÁN

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. BELÉN ERNESTINA RAMÍREZ CORDERO

TUTOR: Dr. JOSÉ FEDERICO DEL RÍO PORTILLA  
INSTITUTO DE QUÍMICA



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.

## Agradecimientos

Agradezco profunda y sinceramente a la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de tener una formación profesional de calidad, por contribuir enormemente a formarme no solo como profesional sino como ser humano, con el orgullo de ser mexicana y ser universitaria.

De igual manera agradezco a mi tutor de estudios de doctorado, el Dr. José Federico del Río Portilla, quien me ha otorgado mucho más que la guía para realizar mis estudios, ha sido el mayor ejemplo de paciencia, inteligencia, liderazgo, perseverancia y calidad humana. Gracias por todo el apoyo para lograr llegar a esta meta.

Agradezco a los miembros de mi comité tutor, la Dra. Adela Rodríguez Romero y el Dr. Rogelio Pereda Miranda, por la asesoría durante la evolución de este trabajo, por las aportaciones y el tiempo dedicado a mi formación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado a través del programa de becas para estudios de posgrado (No de registro de becario **207877**, apoyo No **30668**).

A la Dra. Patricia Cano Sánchez (técnico académico a cargo del laboratorio de Biología molecular del Instituto de Química UNAM) por la asesoría, apoyo y la aportación a este trabajo.

Agradezco a los sinodales que revisaron esta tesis de Doctorado, por todo el tiempo invertido, los comentarios y observaciones que ayudaron a mejorar este manuscrito.

Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

Dra. Adela Rodríguez Romero

Dra Romina María de la Paz Rodríguez Sanoja

Dr. Martín Andrés Iglesias Arteaga

Dra. Nuria Esturau Escofet.

A la Dra. Yanis Toledano por la realización de las pruebas de citotoxicidad presentadas en este trabajo.

Al Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea le agradezco por las muestras otorgadas para realizar parte importante de este trabajo.

Este proyecto se realizó gracias al apoyo económico brindado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) mediante el proyecto **IN207713**.

Agradezco también por el apoyo del CONACyT a través del proyecto de investigación número **166472**.

## Dedicatorias

A Dios y a mi familia, la biológica y la que la vida me dio oportunidad de elegir. Gracias por las lecciones, el apoyo incondicional y el cariño.

## Lugar de trabajo, presentaciones y publicación

Este trabajo se realizó en el instituto de Química de la UNAM, en el laboratorio de Química de Biomacromoléculas 1 y el laboratorio de Biología Molecular.

Los avances y resultados de este trabajo se presentaron en los siguientes simposios y congresos:

- Simposio interno 2010 del Instituto de Química. En modalidad de presentación oral. Título de la plática: “Expresión y determinación estructural por RMN de péptidos tipo toxinas de alacrán”. México D. F. Diciembre del 2010.
- QuimiUNAM 2011. Presentación oral: “Estudio estructural por RMN de péptidos tipo toxinas bloqueadoras de canales de  $K^+$  SK2”. México D. F. Diciembre del 2011.
- 53<sup>rd</sup> Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference. Presentación en modalidad cartel: “Structural NMR analysis of SK2 potassium channel blocker toxin-like peptides”. Miami, Florida USA, abril del 2012.
- 30 Congreso Latinoamericano de Química 2012. Presentación en modalidad de cartel: “Análisis estructural por RMN de péptidos tipo toxinas de alacrán. Caso: tamapina, bloqueador selectivo de canales de potasio SK2”. Cancún, México, octubre del 2012.
- QuimiUNAM 2012. Presentación en modalidad cartel: “Análisis estructural por RMN de péptidos tipo toxinas de alacrán”. México D. F. Noviembre del 2012.
- XXIX Congreso Nacional Sociedad Mexicana de Bioquímica. Presentación en modalidad cartel: “Análisis estructural por RMN de péptidos sintéticos tipo toxinas de alacrán”. Oaxaca, México, noviembre de 2012.
- Simposio interno 2012 del Instituto de Química. En modalidad de presentación oral. Título de la plática: “Análisis estructural por RMN de péptidos tipo toxinas de alacrán. Caso: tamapina, bloqueador selectivo de canales de potasio SK2”. México D. F. Diciembre del 2012.
- I simposio de Resonancia Magnética Nuclear del Posgrado en Química de la UAM. Presentación en modalidad cartel: Estudio estructural de la toxina tamapina y péptidos relacionados, empleando Resonancia Magnética Nuclear. México D. F. Enero del 2014.
- Simposio interno 2014 del Instituto de Química. En modalidad de presentación oral. Título de la plática: “Péptidos tipo toxina y su efecto en linfocitos Jurkat. Relación estructura-actividad”. México D. F. Enero del 2014.

Los resultados principales de este trabajo se publicaron en el artículo: “Cytotoxicity of recombinant tamapin and related toxin-like peptides on model cell lines.” en la revista *Chemical Research in Toxicology*. 27 (6), 960-967. DOI: 10.1021/tx4004193.

# Contenido

Agradecimientos.....	I
Dedicatorias.....	III
Lugar de trabajo, presentaciones y publicación.....	IV
Índice de Figuras.....	VII
Indice de tablas.....	VIII
Abreviaturas.....	IX
1. Resumen.....	1
Abstract.....	3
2 Antecedentes y justificación del proyecto.....	5
3. Objetivos.....	8
3.1 Objetivos particulares.....	8
4. Marco Teórico.....	9
4.1 Toxinas de Alacrán.....	9
4.2 Tamapina.....	14
4.3 Canales iónicos de K <sup>+</sup> .....	15
4.4 Mecanismo de Permeación y Filtro de Selectividad.....	18
4.5 Mecanismo de apertura de canales KCa <sub>2</sub> .....	19
4.6 Farmacología de los canales KCa <sub>2</sub> .....	21
4.6.1 Interacción de canales KCa <sub>2</sub> con toxinas peptídicas.....	24
4.7 Canales KCa <sub>2</sub> en cáncer.....	31
4.8 Resonancia Magnética Nuclear.....	32
4.8.1 RMN bidimensional.....	33
4.8.2 Experimento COSY (Correlated Spectroscopy).....	36
4.8.3 Experimento TOCSY (Total Correlation Spectroscopy).....	37
4.8.4 Experimento NOESY (Nuclear Overhauser–Effect Spectroscopy).....	38
5 Metodología.....	40

5.1 Construcción del vector de clonación .....	40
5.2 Expresión de proteína de Fusión.....	41
5.3 Purificación de la proteína de fusión .....	41
5.3 Reacción con trombina .....	41
5.4 Purificación de péptidos tipo toxina .....	42
5.5 Reacción con CNBr.....	42
5.6 Caracterización por MALDI-TOF .....	42
5.7 Determinación de estructuras tridimensionales .....	43
5.7.1 Experimentos .....	43
5.7.2 Cálculo de estructura.....	43
5.7.3 Afinamiento .....	43
5.8 Pruebas de citotoxicidad.....	45
5.8.1 Cultivos celulares .....	45
5.8.2 Aislamiento de linfocitos de sangre periférica humana.....	45
5.8.3 Ensayos de viabilidad .....	45
5.8.4 Mecanismo de muerte celular .....	46
6 Resultados y Análisis .....	47
6.1 Obtención de péptidos tipo toxina .....	47
6.2 Determinación estructural por RMN.....	50
6.3 Conectividad de enlaces disulfuro.....	58
6.4 Ensayos de citotoxicidad .....	61
6.5 Determinación de mecanismo de muerte celular.....	67
7 Discusión .....	70
7.1 Análisis estructural.....	70
7.2 Relación Estructura-Actividad .....	72
8 Conclusiones .....	76
9 Referencias.....	78
Anexos .....	87

## Índice de Figuras

Figura 2.1.....	6
Figura 4.1.....	11
Figura 4.2.....	13
Figura 4.3.....	15
Figura 4.4.....	17
Figura 4.5.....	18
Figura 4.6.....	20
Figura 4.7.....	21
Figura 4.8.....	23
Figura 4.9.....	26
Figura 4.10.....	26
Figura 4.11.....	27
Figura 4.12.....	28
Figura 4.13.....	29
Figura 4.14.....	30
Figura 4.15.....	34
Figura 4.16.....	35
Figura 4.17.....	36
Figura 4.18.....	37
Figura 4.19.....	38
Figura 4.20.....	39
Figura 5.1.....	40
Figura 6.1.....	47
Figura 6.2.....	48
Figura 6.3.....	50
Figura 6.4.....	51
Figura 6.5.....	52
Figura 6.6.....	53
Figura 6.7.....	54
Figura 6.8.....	55
Figura 6.9.....	58
Figura 6.10.....	59
Figura 6.11.....	60
Figura 6.12.....	62
Figura 7.2.....	72
Figura 7.3.....	74



## Indice de tablas

Tabla 4.1. Descriptores de actividad para nombrar toxinas peptídicas..	13
Tabla 4.2. Farmacología de canales KCa2 recombinantes. Toxinas.....	22
Tabla 4.3. Farmacología de canales KCa2. Bloqueadores/inhibidores orgánicos. ....	23
Tabla 4.4. Farmacología de canales KCa2. Activadores.....	24
Tabla 6.1. Rendimiento de los péptidos y caracterización por MALDI-TOF .....	49
Tabla 6.2. Restricciones de distancia procedentes de los espectros NOESY .....	56
Tabla 6.3. RMSD de los ensambles obtenidos con CYANA y AMBER.....	57
Tabla 6.4. CE <sub>50</sub> en nM de las toxinas probadas en linfocitos Jurkat E6-1.....	63
Tabla 6.5. Porcentaje de células en los diferentes cuadrantes de las gráficas de puntos del análisis citométrico .....	69

## Abreviaturas

$^1\text{H-RMN}$	Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno 1
AT	Azul Tripano
ADN	Ácido DesoxirriboNucleico
CaM	Calmodulina
CaMBD	CalModulin Binding Domain
$\text{CE}_{50}$	Concentración Efectiva media
CFDA	CarboxiFluorescein DiAcetate
COSY	COrrrelated SpectroscopY
CS- $\alpha/\alpha$	Cysteine Stabilized alpha-alpha motif
CS- $\alpha/\beta$	Cysteine Stabilized alpha-beta motif
$\delta$	desplazamiento químico
DE	Desviación Estándar
DPFGSE	Double Pulsed Field Gradient Spin Echo
DQF-COSY	Double Quantum Filtered COrrrelated SpectroscopY
FID	Free Induction Decay
H $\alpha$	Hidrógeno alfa de un aminoácido
H $\beta$	Hidrógeno beta de un aminoácido
His6	Secuencia de seis histidinas consecutivas
HN	Hidrógeno de amida de una aminoácido
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
$I_{(nOe)}$	Intensidad de la señal nOe

IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
IUPHAR	International Union of PHARmacology
KCa	Canales iónicos de potasio activados por calcio
KTx	Toxinas bloqueadoras de canales de potasio
LB	Luria Bertani
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Fly
NOESY	Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polimerase Chain Reaction
PDB	Protein Data Bank
PF	Proteína de Fusión
PI	Propidium Iodide
PL	Poor Loop forming
ppm	partes por millón
QG	Protones gamma de la cadena lateral de aminoácidos
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate – PoliAcrilamide Gel Electrophoresis
TEA	TetraEtilAmonio
TFA	TriFluoroAcetic acid
TOCSY	Total Correlated SpectroscopY
Trx	Tiorredoxina

## 1. Resumen

La tamapina es una  $\alpha$  toxina aislada del alacrán *Mesobuthus tamulus* y descrita por primera vez en el 2002. Esta toxina presenta actividad bloqueadora de canales de potasio de baja conductancia activados por calcio (SK o KCa2). La particularidad de esta toxina es su capacidad de bloquear específicamente los canales KCa2, presentando una alta afinidad por el canal KCa2.2, mientras que prácticamente no interacciona con KCa2.1 y bloquea débilmente a los canales KCa2.3. En un estudio teórico realizado por Andreotti en 2005, se propuso que los aminoácidos responsables de la interacción canal-toxina son principalmente las argininas en posición 6, 7 y 13 de la toxina. La capacidad de bloquear selectivamente un tipo de canales representa un alto potencial farmacológico, por lo que estudiar las determinantes estructurales que le confieren selectividad a la toxina tamapina constituyó el objetivo principal de este trabajo.

Para analizar la relación entre los cambios de estructura y actividad, se evaluó la citotoxicidad en células Jurkat y MDA-MB-231. Dichas células expresan KCa2.2 como principal canal de potasio activado por calcio. Los pépticos evaluados fueron la toxina con secuencia nativa y los péptidos con mutación por alanina en los aminoácidos arginina 6, arginina 7 y arginina 13, residuos que posiblemente están involucrados en la interacción con los canales KCa2.2.

En este trabajo se logró obtener por métodos de biología molecular la toxina r-tamapina y los péptidos R6A, R7A, R13A, R6A-R7A y GS-tamapina (toxina que contiene los residuos glicina y serina en el extremo amino terminal), los cuales presentaron respuesta letal en células Jurkat y MDA-MB-231 a concentraciones nanomolares. La actividad tóxica presentó respuesta dosis y tiempo dependiente con orden de potencia: r-tamapina > GS-tamapina > R6A > R13A > R6A-R7A > R7A. Estos resultados demostraron que al eliminar las cadenas laterales de arginina, la interacción con las células disminuye, especialmente cuando el aminoácido modificado es la arginina 7. Esta evidencia sugiere que la interacción de las toxinas con las células está mediada por el canal KCa2.2. La determinación estructural se realizó interpretando los experimentos de  $^1\text{H}$ -RMN en 2D: DQF-COSY, TOCSY y NOESY. El cálculo de estructuras a partir de las restricciones de distancia obtenidas del espectro NOESY se realizó mediante Dinámica de Ángulos de Torsión empleando el programa CYANA. El afinamiento de las diferentes estructuras en presencia de agua se realizó con Dinámica Molecular. Se demostró que todos los péptidos estudiados conservan el plegamiento de la familia  $\alpha\text{KTx5}$ , con motivo estructural CS- $\alpha/\beta$  ( $\alpha/\beta$  estabilizado por enlaces disulfuro). Se confirmó que los enlaces disulfuro de los péptidos

recombinantes corresponden a los de la familia  $\alpha$ KTx5, donde se encuentran unidas la primera cisteína con la cuarta (enlace C1-C4), la segunda con la quinta (enlace C2-C5) y la tercera con la sexta (enlace C3-C6). El análisis de las superficies de potencial de los péptidos muestra que las mutaciones por alanina disminuyen el tamaño de la región con deficiencia electrónica del péptido nativo y provocan cambios en la distribución de densidad electrónica en la hélice alfa. Estos cambios, aunados a la modificación de actividad, apuntan a que la región amino terminal es una zona clave en la interacción con el canal objetivo.

Los resultados obtenidos en este estudio son evidencia del potencial farmacológico de la tamapina como un buen inhibidor de la proliferación de células que expresen canales KCa2.2. Los cambios en la estructura primaria produjeron disminución de la actividad, por lo que se puede concluir que los aminoácidos en posición 6, 7 y 13 están involucrados en el mecanismo de acción de la toxina. Al realizar las mutaciones puntuales, la disminución en los valores de  $CE_{50}$  no es muy grande, lo que sugiere que el mecanismo de interacción puede estar mediado por un efecto sinérgico con todos los aminoácidos expuestos en la región de la hélice alfa.

Los resultados presentados en este trabajo son muestra de la posibilidad de utilizar toxinas para modular la proliferación de células específicas mediante la interacción con sus blancos, los canales iónicos. Actualmente, los mecanismos de interacción de las toxinas con componentes de la membrana celular siguen siendo estudiados y parecen depender de la naturaleza, tanto de las toxinas, como de las proteínas con las que interactúan, por lo que es de gran relevancia generar información que ayude a comprender estas interacciones.

## Abstract

Tamapin is an  $\alpha$  toxin isolated from scorpion *Mesobuthus tamulus*, which was firstly reported by Pedarzani's group in 2002. This toxin is a slow-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel blocker. Moreover, tamapin is known to display a high affinity to KCa2.2 channels, it blocks KCa2.3 channels with a lesser potency and interacts weakly with KCa2.1 channels. In 2005, a theoretical study proposed by Adreotti stated that arginine residues of tamapin (R6, R7 and R13) are responsible for the channel-toxin interaction. Thus, the selectivity for KCa2.2 channels represents a high pharmacological potential. Thereby, studying molecular features which provide high selectivity was the aim of this work.

Tamapin and related peptides cytotoxicity was evaluated on Jurkat and MDA-MB-231 cell lines in order to elucidated structure-activity relationship. These cell lines constitutively express  $\text{Ca}^{2+}$  activated  $\text{K}^+$  potassium channels KCa2.2. In addition, the evaluated peptides were wildtype tamapin and peptides with punctual mutations in residues R6, R7 and R13 that are probably associated in the channel - toxin interaction.

r-Tamapin, related peptides R6A, R7A, R13A, R6A-R7A and GS-tamapin (toxin with additional Gly and Ser residues at the amino termini), were obtained by Molecular Biology techniques. Nanomolar concentrations of these peptides displayed lethal effect on the cell lines tested with dose and time dependence. The potency order was: r-tamapin > GS-tamapin > R6A > R13A > R6A-R7A > R7A. These results demonstrated that elimination of the charged arginine side chains decreased the interaction with cells, particularly when arginine 7 is the modified residue. These evidences suggest that the toxin-cell interaction is mediated by KCa2.2 channels. The structural determination was carried out using 2D  $^1\text{H}$ -NMR experiments: DQF-COSY, TOCSY and NOESY. Likewise, structures were calculated by Torsion Angle Dynamics working on the CYANA software using distance constraints obtained from NOESY spectra. The refinement of all structures in solvent was achieved by Molecular Dynamics. In this work, it was determined that all peptides to be studied, preserve  $\alpha\text{KTx5}$  subfamily folding, which exhibits a CS- $\alpha/\beta$  motif (cysteine stabilized  $\alpha/\beta$ ). Additionally, the disulfide bonds connectivity of recombinant peptides was consistent within family  $\alpha\text{KTx5}$ , whose configuration is C1-C4, C2-C5 and C3-C6. Electrostatic potential surface analysis showed that alanine mutations reduce electronic deficient areas and modify electronic density distribution when they were compared with wild type toxin surface. These electronic density modifications and the cytotoxicity changes produced by the

alanine mutations indicate that amino termini region is a key region of toxin interaction with the target channel.

The results in this study provide evidence on the pharmacological potential of tamapin as a good inhibitor of expressing KCa2.2 cells proliferation. Changes in residues 6, 7 and 13 of tamapin decrease the cytotoxic activity, suggesting that these residues are involved in the toxin action mechanism. Punctual mutations produced minimal changes in  $EC_{50}$  values, result that may be due to the mechanism is mediated by a synergic effect implicating all exposed residues in the  $\alpha$  helix region.

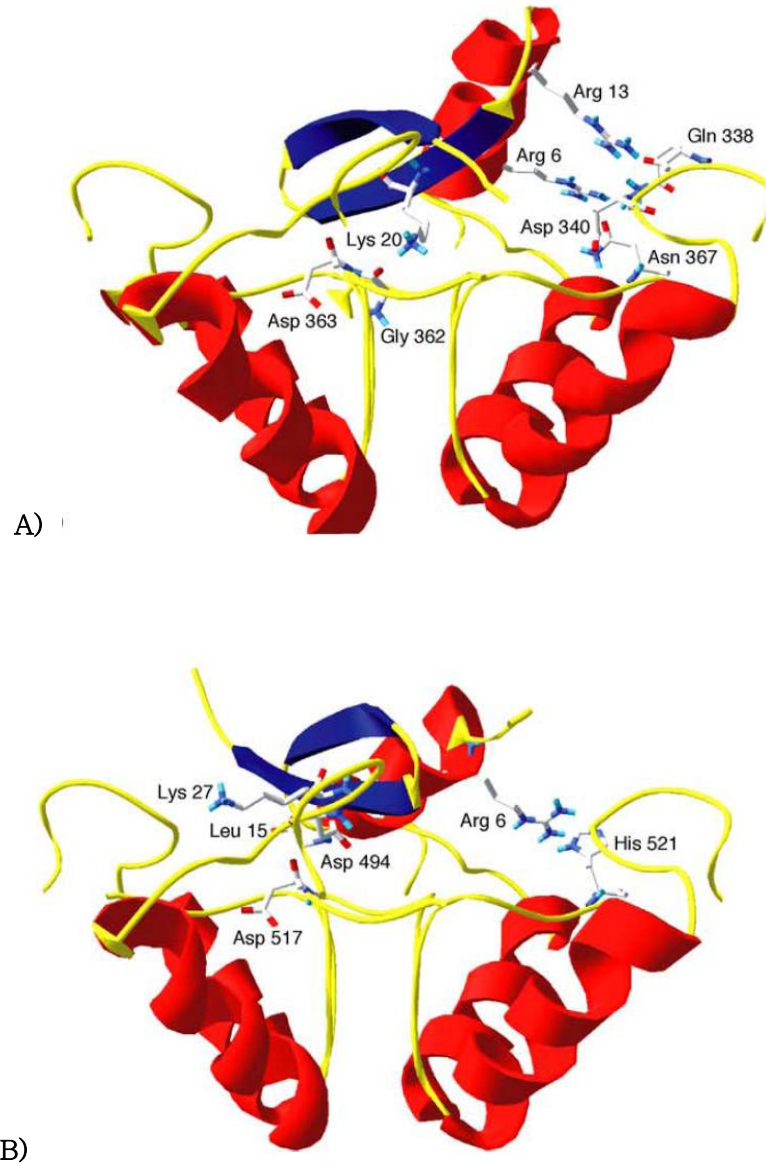
Furthermore, these results are evidence of the possibility to modulate cellular proliferation by blocking ion channels using toxins. Nowadays, the toxin interaction mechanisms with cellular membrane components are still under study and seem to be dependent on the nature of both, toxin and its target. Therefore, generating information that helps to the understanding of these interactions is our matter of interest.

## 2 Antecedentes y justificación del proyecto

En el 2002, Pedarzani y colaboradores [1] reportaron el aislamiento de la toxina tamapina del veneno del alacrán *Mesobuthus tamulus*. Esta toxina presenta una mayor afinidad al canal KCa2.2 ( $IC_{50}=24$  pM) comparada con la afinidad por KCa2.3 ( $IC_{50}=1.7$  nM) y KCa2.1 ( $IC_{50}=42$  nM) [1], siendo un bloqueador específico a canales KCa2 y selectiva al canal KCa2.2. Hasta el 2015, ésta toxina es el péptido natural más selectivo a canales KCa2.2. En el 2005, Andreotti y colaboradores [2] publicaron modelos de la interacción de la tamapina con canales KCa2.2 y KCa2.3. Estos autores encontraron que la lisina 20 de la toxina es capaz de introducirse en el filtro de selectividad del canal KCa2.2, como se muestra en la **figura 2.1**, formando varias interacciones electrostáticas con los residuos Y361, G362, D363, M364 y V365. Adicionalmente, el residuo N367 del canal KCa2.2, que es sustituido por una histidina en canales KCa2.3, se encuentra involucrado en muchos contactos con la toxina, formando un puente de hidrógeno con la R13 y varios contactos electrostáticos con los residuos de la tamapina: R6, R7, P30, Y31 y F2. Como se observa en la **figura 2.1B**, el modelo de interacción con el canal KCa2.3 no muestra residuos de la toxina dentro del poro, lo cual se cree que es un factor importante que reduce la afinidad de la toxina a estos canales.

Dado el alto número de contactos entre residuos del canal KCa2.2 y las tres argininas de la tamapina, en este proyecto se propuso realizar la mutación de estos residuos por alanina, con el fin de estudiar el efecto de la eliminación de las cadenas laterales cargadas en la estructura y la función de la toxina. La hipótesis que se planteó fue que el cambio de residuos de arginina por alanina modificaría tanto la carga total y la superficie electrostática de la toxina, pero no así la estructura terciaria debido a la corta longitud de la cadena lateral de alanina. Dado que las toxinas bloqueadoras de canales de  $K^+$  tienen una superficie de potencial positiva, el cambio en la superficie de potencial de tamapina provocado por las mutaciones producirá cambios en su actividad, lo que dará información valiosa para el entendimiento de la relación estructura-actividad de este tipo de péptidos.





**Figura 2.1.** A) Modelo de interacción de tamapina y el canal KCa2.2. B) Modelo de interacción de tamapina y el canal KCa2.3. Se señalan algunos residuos importantes en el modelo de interacción. Imagen modificada de la referencia [2].

Para evaluar la actividad de los péptidos producidos se utilizaron células que expresan constitutivamente canales KCa2.2, células Jurkat y células MDA-MB-231. La línea celular Jurkat se ha estudiado ampliamente y se sabe que expresa canales KCa2.2 funcionales que están implicados en las vías de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  [3], mientras que en las células MDA-MB-231 se ha comprobado la expresión de estos canales, pero no se tiene evidencia de la formación de canales funcionales ni su función biológica [4]. Dada la importancia de los canales KCa2.2 en linfocitos Jurkat, en este trabajo se propuso usarlos como modelo para evaluar la actividad de los

péptidos obtenidos, ya que al bloquear los canales de su membrana plasmática se interrumpirá la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  y por tanto se verán afectados los procesos vitales de la célula. Si el efecto observado en células MDA-MB-231 es similar al efecto en células Jurkat, entonces la citotoxicidad de los péptidos tiene mecanismos similares en ambas líneas celulares.

### 3. Objetivos

Establecer la importancia de los residuos de arginina en posiciones 6, 7 y 13 en la estructura y actividad citotóxica de la toxina tamapina.

Correlacionar la estructura de r-tamapina con su actividad citotóxica en células Jurkar E6-1 y MDA-MB-231.

#### 3.1 Objetivos particulares

- Clonar y expresar r-tamapina y los péptidos R6A, R7A, R13A y R6A/R7A.
- Purificar la cantidad necesaria de cada péptido para obtener su estructura por RMN.
- Determinar la estructura tridimensional de la tamapina y péptidos relacionados usando restricciones de RMN.
- Determinar si la citotoxicidad de la toxina tamapina en células que expresan canales KCa2.2 está afectada por los residuos Arg6, Arg7 y Arg13.
- Determinar la citotoxicidad y el mecanismo de acción de los péptidos estudiados en las líneas celulares Jurat E6-1 y MDA-MB-231.
- Determinar la citotoxicidad de los péptidos estudiados en linfocitos de sangre periférica humana.
- Calcular las superficies de potencial electrostático de los péptidos estudiados y correlacionar esta información con su actividad citotóxica.

## 4. Marco Teórico

En este trabajo se determinó la estructura tridimensional de la toxina tamapina en disolución y se analizó la correlación de dicha estructura con su actividad citotóxica en células que expresan canales KCa<sub>2.2</sub>. En este apartado se discutirá brevemente la importancia de los canales iónicos de K<sup>+</sup>, en particular los canales de baja conductancia activados por Ca<sup>2+</sup> (KCa), además de la estrecha relación existente entre canales iónicos y toxinas de alacrán. También se presenta un breve resumen de las características estructurales que proporcionan a las toxinas su actividad bloqueadora de canales, especialmente a las de la familia  $\alpha$ KTx5, a la cual pertenece la toxina tamapina. Así mismo se presenta una descripción de la técnica espectroscópica, Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y los experimentos empleados para realizar la determinación estructural.

### 4.1 Toxinas de Alacrán

Los alacranes son los animales terrestres más antiguos de los que se tiene conocimiento [5]. Se han encontrado fósiles del periodo Silúrico de la Era Paleozoica de 360 millones de años de antigüedad [5]. Se clasifican taxonómicamente dentro del *phylum* artrópoda, *subphylum* chelicerata, *clase* Arachnida, *orden* escorpiónida dividida en 17 familias y 163 géneros [5, 6]. En México habitan miembros de 7 familias y 23 géneros [7]. La picadura de alacrán es un problema de salud en varios países incluyendo a México, donde se reportaron 319,246 casos en el año 2013, ocupando el lugar 11 dentro de las principales causas de enfermedad [8].

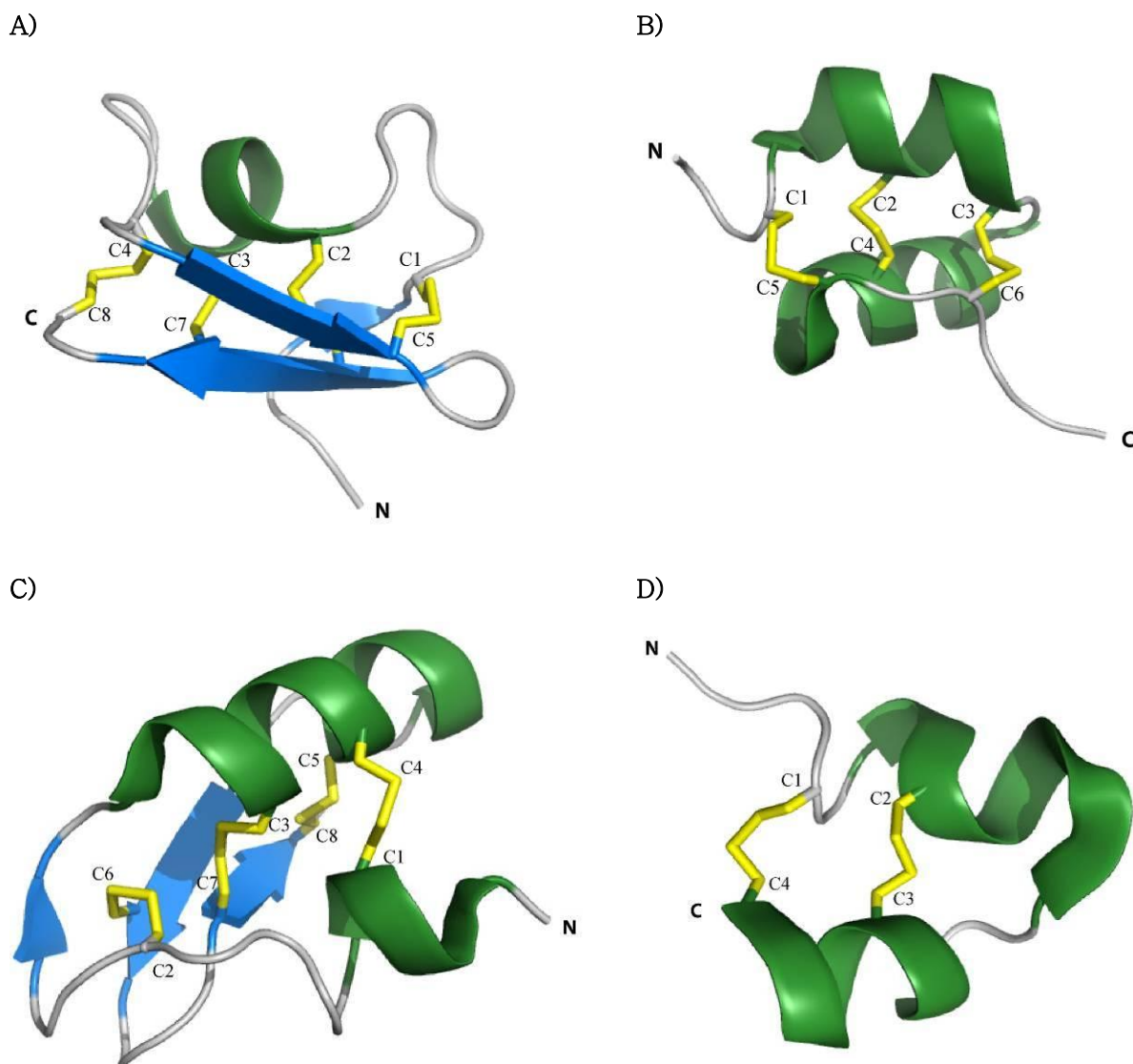
El peligro que representan estos arácnidos se debe a la eficacia de su veneno que es una mezcla de diferentes compuestos entre los que se encuentran proteínas, oligonucleótidos, aminoácidos libres y sales. El contenido proteico del veneno es del 30 al 75% del veneno seco, del cual, hasta el 98% son proteínas solubles en agua. La fracción proteica del veneno se puede dividir en proteínas de alto peso molecular como las mucinas, serín proteasas, lisozima, calcina, hialuronidasa, proteínas con actividad fosfolipasa, y péptidos de menos de 9000 Da, como las toxinas, defensinas, escorpinas y péptidos sin enlaces disulfuro [9, 10]. Dentro de los péptidos con masa molecular menor de 9000 Da se han identificado tres grupos, los de menos de 1500 Da, los de masa entre 3001 a 4500 Da y los de 6001 a 7500 Da. En el primer grupo se encuentran péptidos que provienen de la degradación de proteínas más grandes y algunos que se cree que pueden ayudar a imponer el pH del veneno [11]. Entre los componentes más importantes del segundo grupo se encuentran las toxinas de cadena corta que afectan

principalmente canales iónicos de  $K^+$  y  $Cl^-$  [11]. En el tercer grupo se encuentran las toxinas que afectan la permeabilidad de canales iónicos de  $Na^+$  [11].

Hasta junio del 2015 se habían descrito 725 toxinas de alacrán en la base UNIPROT [12]. La clasificación de estas toxinas depende de cuatro criterios: el tipo del canal iónico con el que interactúan, el receptor al que se une la toxina, su estructura terciaria y el tipo de respuesta que induce sobre los canales [13]. Por ejemplo, las toxinas que interactúan con canales de sodio se dividen en dos grupos: las toxinas  $\alpha NaScTx$ , que se unen al sitio 3 del receptor en la superficie extracelular del canal e inhibe el proceso de inactivación rápida de los canales de  $Na^+$ , y las toxinas  $\beta NaScTx$ , que se unen al sitio 4 del receptor y modifican el umbral de activación de los canales a potenciales más negativos [14].

Por su parte, las toxinas bloqueadoras de canales de potasio son el grupo con mayor diversidad. Se cree que esta diversidad es consecuencia de la adaptación a una gran variedad de canales de  $K^+$ . Se han identificado más de 30 subfamilias de toxinas bloqueadoras de canales de  $K^+$  que se pueden clasificar en cuatro grupos siguiendo la nomenclatura propuesta por Tytgat *et al.* [15].

En el primer grupo se encuentran las alfa toxinas ( $\alpha KTx$ ) que tienen una longitud de 23 a 45 residuos y que afectan principalmente a canales iónicos de  $K^+$  dependientes de voltaje o dependientes de  $Ca^{2+}$ . Estas toxinas se caracterizan estructuralmente por contener un motivo CS- $\alpha\beta$  [16]. El motivo CS- $\alpha\beta$  se caracteriza por contener una sección con estructura de hélice  $\alpha$ , otra sección con estructura de hoja  $\beta$  antiparalela y presentar enlaces disulfuro que unen covalentemente estas dos regiones [16]. Comúnmente las alfa toxinas contienen dos enlaces disulfuro entre las estructuras de hélice  $\alpha$  y hoja  $\beta$ , como en la toxina  $\alpha KTx$  mostrada en la **figura 4.1A** se muestra una toxina donde los puentes C2-C5 y C3-C6 se encuentran entre la hélice  $\alpha$  y la hoja  $\beta$ .



**Figura 4.1.** A) La  $\alpha$  toxina Vm24, PDB: 2K90. B) La toxina TS16, PDB: 2LO7. C) La  $\gamma$  toxina ErgTx1, PDB: 1PX9. D) La  $\kappa$  toxina Hefutoxina, PDB: 1HP9. Se muestran los puentes disulfuro en color amarillo incluyendo los cabonos beta. Figura realizada en Pymol.

El segundo grupo pertenece a las beta toxinas ( $\beta$ KTx) también llamadas toxinas de cadena larga, ya que están formadas por 50 a 75 residuos. Se cree que estas toxinas contienen dos dominios, uno desestructurado en el amino terminal y otro con motivo CS- $\alpha/\beta$  que contiene tres enlaces disulfuro. Sin embargo, no se ha determinado la estructura de ninguna  $\beta$ KTx. No se conoce con exactitud el blanco molecular de este grupo de toxinas, pero se ha descrito que el dominio CS- $\alpha/\beta$  de algunas toxinas bloquea canales de  $K^+$ , mientras que algunas toxinas completas tienen propiedades citolíticas y antimicrobianas [17].

El tercer grupo corresponde a las gamma toxinas ( $\gamma$ KTx) cuyo tamaño va de los 36 a 47 residuos y se caracterizan por interactuar específicamente con los canales humanos ERG y tener motivo estructural CS- $\alpha\beta$  (**figura 4.1C**) [16].

El cuarto grupo es el de las kappa toxinas ( $\kappa$ KTx), las cuales están formadas por dos hélices  $\alpha$  unidas por un giro  $\beta$  y estabilizadas por dos enlaces disulfuro (motivo CS $\alpha/\alpha$ , ver **figura 4.1D**); bloquean canales de K<sup>+</sup> Kv1 y KCNQ1 [14, 18].

A pesar de los esfuerzos por clasificar los diferentes tipos de toxinas dentro de familias, se han aislado algunas como las toxinas TS16 y  $\kappa$ -BUTX-Tt2b que filogenéticamente corresponden a la familia  $\alpha$ KTx20, pero que poseen un motivo estructural CS- $\alpha/\alpha$  en lugar del motivo esperado CS- $\alpha/\beta$  [19]. En la **figura 4.1B** se muestra la toxina TS16 que contiene un motivo estructural CS- $\alpha/\alpha$ .

Dada la gran versatilidad estructural de las toxinas, recientemente se ha sugerido usar la nomenclatura propuesta por King *et al.* [20] para asignar los nombres a las toxinas de origen animal. Dicha nomenclatura consta de un descriptor de actividad que debe iniciar con una letra griega o símbolo que denote su actividad biológica o blanco molecular (ver **tabla 4.1**) seguida de un subíndice como descriptor de especificidad, donde se indique el receptor primario o subtipo de canal al que es específica la toxina (de ser el caso). Cuando sea posible, estos subíndices deben seguir la recomendación para receptores y canales iónicos de la Unión Internacional de Farmacología (IUPHAR). Después del descriptor de actividad se coloca el nombre genérico, el cual estará basado en la familia taxonómica del espécimen que produce la toxina, seguido de la inicial en mayúscula del género y la primera o primeras letras en minúscula correspondiente a la especie. Para diferenciar entre toxinas provenientes de la misma especie que tengan una misma actividad, se colocará un número y, para diferenciar toxinas homólogas, una letra minúscula adicional como se muestra en la **figura 4.2**.

**Tabla 4.1.** Descriptores de actividad para nombrar toxinas peptídicas. Adaptada de la referencia [20].

Descriptor	Función biológica asociada con el descriptor	Ejemplo
$\alpha$ (alfa)	Actúa sobre el receptor de acetilcolina	$\alpha$ -Bungarotoxin (serpiente)
$\beta$ (beta)	Modifica la activación por voltaje de canales NaV.	Bj-xtrIT (alacrán)
$\gamma$ (gamma)	Actúa sobre canales de cationes no específicos HCN.	$\gamma$ -Ctx PnVIIA (caracol cono)
$\delta$ (delta)	Retrasa la inactivación de canales dependientes de voltaje NaV.	$\delta$ -ACTX-Hv1a (araña)
$\varepsilon$ (épsilon)	Actúa sobre canales de cloro CIC.	- <sup>a</sup>
$\xi$ (dseda)	Actúa sobre canales activados por nucleótidos cíclicos.	Pseudechetoxin (serpiente) <sup>b</sup>
$\eta$ (eta)	Actúa sobre canales de potasio rectificadores internos (KIR).	Tertiapin (abeja mielera)
$\theta$ (theta)	Actúa sobre canales de potasio de dos poros (K2P).	-
$\iota$ (iota)	Agonista de canales NaV.	$\iota$ -Ctx RXIA (caracol cono)
$\kappa$ (kappa)	Inhibe canales de potasio activados por voltaje (KV).	$\kappa$ -Ctx PVIIA (caracol cono)
$\lambda$ (lambda)	Inhibe canales de potasio activados por calcio (KCa).	Charybdotoxin (alacrán)
$\mu$ (mu)	Inhibe canales de sodio activados por voltaje (NaV).	$\mu$ -Aga-I (araña)
$\nu$ (nu)	Actúa sobre el receptor de neurotensina.	Contulakin-G (caracol cono)
$\xi$ (xi)	Actúa sobre el receptor de endotelina.	Sarafotoxin S6c (serpiente)
$\omicron$ (ómicron)	Actúa sobre el receptor de octopamina.	-
$\pi$ (pi)	Actúa sobre canales sensores de ácido (ASICs).	PcTx1 (araña)
$\rho$ (ro)	Actúa sobre el adrenoreceptor.	$\rho$ -Ctx TIA (caracol cono)
$\sigma$ (sigma)	Actúa sobre el receptor 5-HT.	$\sigma$ -Ctx GVIIIA (caracol cono)
$\tau$ (tau)	Actúa sobre canales TRP.	VaTx1 (araña)
$\upsilon$ (ípsilon)	Actúa sobre el receptor de vasopresina/oxitocina.	Conopressin-G (caracol cono)
$\phi$ (fi)	Actúa sobre el receptor de rianodina.	Maurocalcine (alacrán)
$\chi$ (ji)	Actúa sobre el transportador de noradrenalina.	$\chi$ -Ctx MrIA (caracol cono)
$\psi$ (psi)	Agonista no competitivo del receptor de acetilcolina.	$\psi$ -Ctx PIIIE (caracol cono)
$\omega$ (omega)	Inhibe canales de calcio activados por voltaje (CaV).	$\omega$ -Aga-IVA (araña)
$\Gamma$ (Gamma)	Actúa sobre el receptor de glutamato.	Conantokin-G (caracol cono)
$\Lambda$ (Lambda)	Actúa sobre receptores GABA.	-
$\Xi$ (Ómicron)	Actúa sobre el receptor P2X.	-
$\Sigma$ (Sigma)	Actúa sobre canales CFTR.	GaTx1 (alacrán)
$\Omega$ (Omega)	Actúa sobre el receptor del factor de crecimiento epidérmico.	Gigantoxin I (anemona marina)
$\Delta$ (Delta)	Actividad citolítica.	Cupiennin 1a (araña)
U	Actividad desconocida.	ACTX-Hvf17 (araña)

<sup>a</sup> Se indica con un guión que no se han aislado toxinas con esta actividad.

<sup>b</sup> Pseudechetoxin (24 kDa) no es una toxina peptídica pero se incluyó en la tabla para indicar que esta farmacología existe en proteomas de venenos.



**Figura 4.2.** Esquema de la nomenclatura propuesta por King. El nombre de la toxina se puede dividir en tres partes que describen la actividad de la toxina (en azul), su origen biológico (rojo) y su relación con otras toxinas (verde/morado). El ejemplo mostrado es de una toxina de anemona marina conocida comúnmente como ShK que actúa específicamente sobre canales K<sub>v</sub>1.3. Figura adaptada de la referencia [20].



## 4.2 Tamapina

En este proyecto se estudió la toxina, de 31 aminoácidos, tamapina proveniente del alacrán rojo de la india *Mesobuthus tamulus*. Considerando su secuencia de aminoácidos y puentes disulfuro esta toxina se clasificó como la cuarta integrante de la subfamilia  $\alpha$ KTx5, empleando la nomenclatura de King se nombraría  $\lambda_{2,2}$ -BUTX-Mt4a. La subfamilia  $\alpha$ KTx5 se caracteriza por competir con la apamina (toxina de 18 residuos proveniente del veneno de abeja) por los canales KCa2 a través de una área cargada positivamente en la región de la hélice  $\alpha$  en el extremo amino terminal. Los residuos de interacción equivalentes a los de la tamapina (RXCQ) se encuentran el extremo carboxilo terminal de la apamina.

Estructuralmente, esta subfamilia se caracteriza por tener el motivo CS- $\alpha/\beta$  formando la hélice  $\alpha$  del residuo 5 al 14 y una hoja  $\beta$  formada por dos hebras antiparalelas (residuos 17-22 y 25-29) unidas por un giro  $\beta$  del residuo 22 al 25 [21].

Solo la apamina y la toxina Tsk del alacrán *Tityus serrulatus* son toxinas de origen natural capaces de bloquear canales KCa2 además de las toxinas de la subfamilia  $\alpha$ KTx5, formada por tamapina, leurotoxina, aislada del alacrán *Leiurus quinquestriatus*, P05 del alacrán *Androctonus mauretanicus* y BmP05 del alacrán *Buthus martensii Karschi* [1].

En el 2002, se describió por primera vez la purificación y caracterización farmacológica de la tamapina [1]. Se describió la secuencia primaria y la masa molecular de  $3457.9 \pm 0.2$  Da, que es una unidad menor que la masa calculada para la secuencia primaria (3459.1 Da). Este dato sugirió que había amidación en el residuo carboxilo terminal (Y31), lo que se confirmó por la falta de digestión usando carboxipeptidasa A o carboxipeptidasa Y [1]. En este trabajo también se describió la isoforma tamapina-2 que sólo varía en un aminoácido (H31 en lugar de Y31) y que presenta una actividad similar a la tamapina, en la **figura 4.3** se muestra el alineamiento de las dos isoformas con otras integrantes de la subfamilia  $\alpha$ KTx5.

Toxina	PDB		%Identidad
Leiuurotoxina	1SCY	AFCNLRMCQLSCRSLSLGLLGGKCIIGDKCECVKH	100
P05	1PNH	TVCNLRRCQLSCRSLSLGLLGGKCIIGVKCECVKH	87
BmP05		AVCNLRKRCQLSCRSLSLGLLGGKCIIGDKCECVKH	90
Tamapin	2LU9	AFCNLRRCQLSCRSLSLGLLGGKCIIGEECKCVPY	77
Tamapin2		AFCNLRRCQLSCRSLSLGLLGGKCIIGEECKCVPH	81
		:.***: *:*****:***:	

**Figura 4.3.** Alineamiento de las integrantes de la familia  $\alpha$ KTx5. Se indica el % de identidad con respecto a leiuurotoxina. Con \* se indica los residuos que son conservados en todas las secuencias; (:) y (.) indican sustituciones conservadas y parcialmente conservadas respectivamente.

Se encontró que la tamapina desplaza [ $^{125}$ I]-apamina de sinaptosomas de rata (lo que indica que es afín al mismo tipo de canales que apamina, los canales de potasio activados por  $\text{Ca}^{2+}$  KCa2), inhibe las corrientes posthiperpolarizantes mediadas por canales KCa2 en neuronas piramidales del hipocampo e inhibe corrientes de canales KCa2 en sistemas heterólogos de expresión con valores de  $\text{IC}_{50}$  para canales KCa2.1, KCa2.2 y KCa2.3 de 42 nM, 24 pM y 1.7 nM respectivamente, siendo así el bloqueador más potente de canales KCa2.2 [22, 23]. En los últimos años, la tamapina ha sido una herramienta útil para identificar canales KCa2.3 en microglía de rata y su importancia en el aumento de migración e invasión de microglía en estados de activación antiinflamatoria [24, 25].

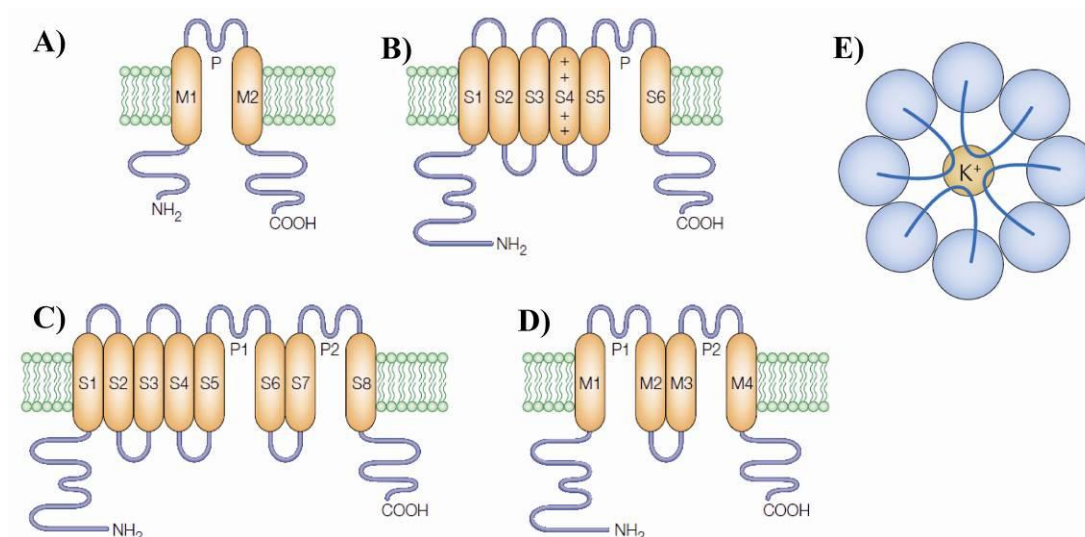
### 4.3 Canales iónicos de $\text{K}^+$

Como se ha mencionado previamente, los canales iónicos son los blancos moleculares de muchas toxinas de alacrán. Estas macromoléculas transmembranales son de suma importancia ya que regulan el potencial de membrana. Así mismo, están involucrados en los mecanismos de excitabilidad celular, varias rutas de señalización, control del volumen celular y pH, entre otras funciones. Dada la diversidad de las funciones celulares asociadas a la actividad de los canales iónicos, no resulta sorprendente la asociación de varias enfermedades a la expresión o mutación de estas macromoléculas. Tal es el caso de las canelopatías que afectan el sistema neuromuscular (produciendo enfermedades como epilepsia, ataxia o arritmia cardiaca) o canelopatías asociadas a desordenes renales y endócrinos [26-29]. Motivos por los que se ha propuesto la modulación de canales iónicos como potencial tratamiento en padecimientos como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, dolor crónico, síndrome de Down, adicciones y cáncer entre otras [30-34].

Los canales iónicos forman poros que permiten el transporte pasivo, disipando el gradiente electroquímico, con flujos de millones de iones por segundo a través de membranas biológicas. Se han identificado canales específicos para sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ), cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) y calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). También se han identificado canales de cationes no específicos. El mecanismo de apertura y cierre de canales iónicos es de tipo compuerta y puede estar regulado por voltaje, ligantes, temperatura y pH, entre otros factores.

Los canales de  $\text{K}^+$  tienen especial importancia, ya que median el transporte de iones  $\text{K}^+$ , ión que impone principalmente el potencial de membrana en condiciones de reposo. En estas condiciones existe un flujo de  $\text{K}^+$  de adentro hacia afuera de la célula, lo que resulta en un potencial de membrana negativo. Los canales de  $\text{K}^+$  se pueden clasificar de acuerdo al estímulo al que responden, sus propiedades de conductancia y criterios estructurales. Encontrándose así cuatro tipos principales: los activados por voltaje (Kv), los activados por calcio (KCa), los canales rectificadores internos (Kir) y los de dos poros (K2P).

La mayoría de los canales de potasio funcionales están conformados por cuatro subunidades  $\alpha$  arregladas alrededor de un poro conductor **figura 4.4E**. Las subunidades  $\alpha$  conservan una estructura que consta de dos dominios transmembranales (TM), nombrados M o S dependiendo de la subfamilia, y una horquilla formadora del poro (PL, por su nombre en inglés pore-forming loop). Esta estructura canónica formadora del poro es denominada como 2TM/P, ya que contiene 2 hélices transmembranales y forma un poro (**figura 4.4A**). Su prototipo son los canales rectificadores internos Kir1-6. Los canales Kv poseen cuatro segmentos transmembranales (S1-S4) adicionales a los elementos estructurales fundamentales formadores del poro (S5-S6). Estos segmentos adicionales forman el módulo sensor de voltaje, teniendo así un total de 6 TM en la subunidad  $\alpha$  (estructura 6TM/P, **figura 4.4C**). Los canales activados por calcio KCa tienen una estructura similar a la de los Kv, pero no son sensibles al voltaje a excepción de la subunidad  $\alpha$  del canal KCa1.1. Los canales de alta conductancia activados por calcio (BK) también tienen estructura similar a la de los KCa pero contienen una hélice transmembranal adicional en el extremo amino terminal, por lo que su arquitectura se denomina como 7TM/P. Los canales de dos poros pueden tener arquitectura 8 TM/2P o 4TM/2P como se muestra en la **figura 4.4C y D** [35, 36].

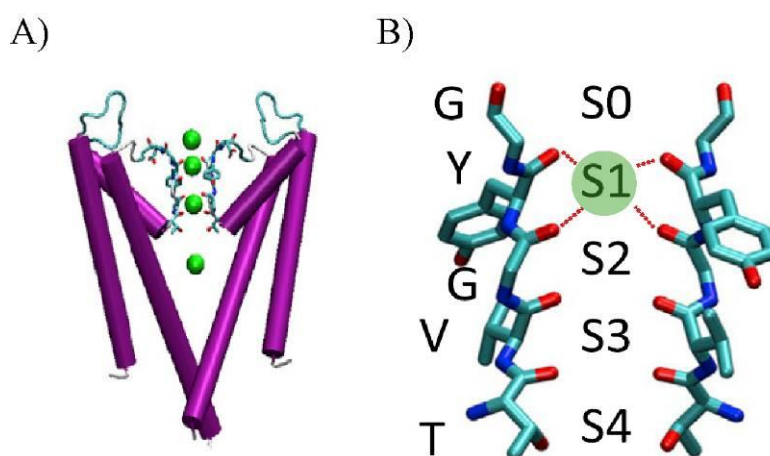


**Figura 4.4.** Esquemas de las diferentes arquitecturas de los canales iónicos de  $K^+$ . A) arquitectura tipo 2TM/P formada por dos regiones transmembranales y un PL (indicado con la letra P en la figura). B) Canal tipo 6TM/P con 6 regiones transmebranales y un PL, S4 está marcada con signos + para indicar su papel como sensor de voltaje en canales Kv. C) Esquema de canales tipo 8TM/2P, los cuales son híbridos de los canales 6TM/P y 2TM/P. D) Esquema de canales tipo 4TM/2P formados por dos unidades 2TM/P consecutivas. Los canales tipo 8TM/2P y 4TM/2P probablemente se ensamblan como dímeros para formar un canal. Figura modificada de la referencia [37]. E) Esquema de la vista superior de un poro formado por cuatro subunidades, se muestran las posiciones del PL, las subunidades S5 y S6 en torno al ión  $K^+$ . Figura modificada de la referencia [36].

Adicionalmente a las subunidades  $\alpha$ , el canal completo suele contener subunidades accesorias  $\beta$  que pueden modificar el comportamiento del tetrámero de subunidades  $\alpha$ . Existen varios factores que pueden cambiar las propiedades funcionales de los canales iónicos aumentando la variabilidad funcional. Entre estos factores se encuentran la presencia subunidades  $\beta$ , el ensamble de canales heteroméricos, el empalme alternativo y las modificaciones postraduccionales [37].

#### 4.4 Mecanismo de Permeación y Filtro de Selectividad

Como se mencionó anteriormente, la región formadora del poro de los canales de  $K^+$  está constituida por las dos hélices transmembranales unidas por el PL, en esta región se encuentra la hélice del poro y el filtro de selectividad (FS). El FS consta de una secuencia de aminoácidos característica (TVGYG) responsable de la conducción selectiva de iones  $K^+$  [38]. Como se muestra en la **figura 4.5**, los oxígenos carbonílicos de la cadena principal de estos residuos, junto con el oxígeno de la cadena lateral de la treonina, definen una serie de cuatro sitios de unión a potasio (S1-S4), donde el ión  $K^+$  interacciona en un arreglo de antiprisma cuadrado [39, 40]. Adicionalmente, existen los sitios S0 y S<sub>ext</sub> observados en la entrada extracelular del FS [39, 40].



**Figura 4.5.** A) Representación del poro, para mayor claridad sólo se muestran dos de las cuatro subunidades formadoras del poro. Las hélices se representan con cilindros, el filtro de selectividad FS se representa en tubos y los iones  $K^+$  en esferas color verde. B) Representación en tubos de la secuencia característica, o secuencia firma, del FS del canal KcsA cristalizado en una alta concentración de  $K^+$ . En la figura se muestran las interacciones de un ión potasio en el sitio S1 con los carbonilos de la cadena principal de dos de las cuatro subunidades. Figura modificada de la referencia [40].

En estructuras cristalográficas se observaron iones  $K^+$  en los cuatro sitios (S1-S4). Dado que las estructuras experimentales son promedios de diferentes estados, se ha sugerido que las dos configuraciones energéticamente más probables son las que contienen iones  $K^+$  en S1, S3 o S2, S4. Simulaciones de Dinámica Molecular confirmaron que los iones son estables en S1, S3 o S2, S4 con los sitios restantes ocupados por moléculas de agua. Se confirmó que la configuración S2, S4 es la más estable y la S1, S3 tiene una energía calculada solo 3.5 Kcal/mol mayor [41-43]. Esta pequeña diferencia de energía implica que los iones pueden cambiar fácilmente de configuración, siendo la fuerza repulsiva de un ion entrante la que, durante la permeación,

promueve el movimiento concertado de los iones que ya estaban en el filtro de selectividad y la salida de un ion al lado opuesto del poro [44, 45]. Dado que los iones  $K^+$  se encuentran alternados con moléculas de agua en el FS, la permeación de éstos está acompañada del transporte de moléculas de agua [46, 47].

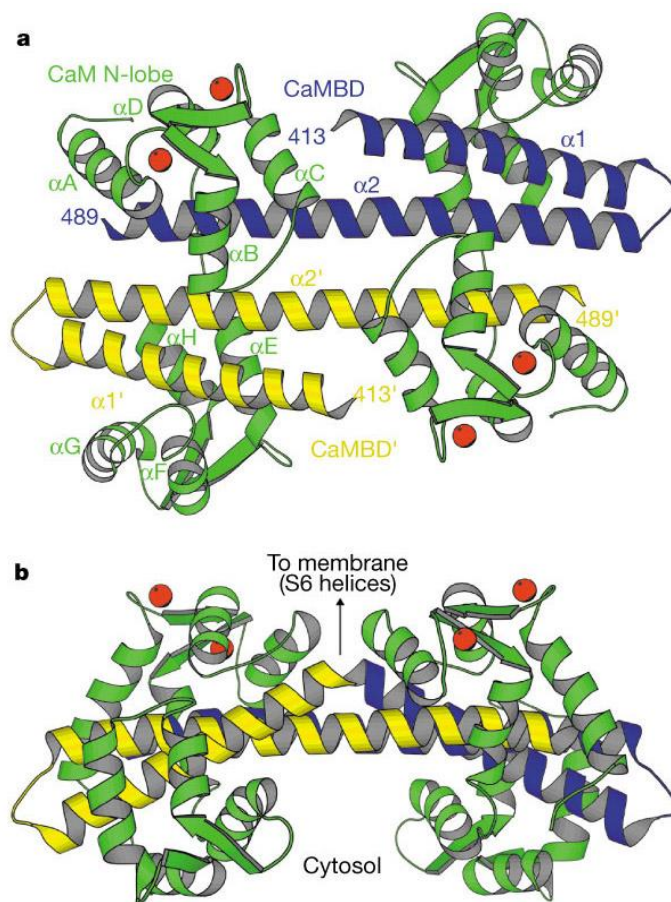
#### 4.5 Mecanismo de apertura de canales KCa2

Entre los canales de arquitectura 6TM/P se encuentran los canales de potasio activados por  $Ca^{2+}$ , los cuales se clasifican de acuerdo a su conductancia en tres tipos: canales de alta conductancia (KCa1, BK o canales maxi-K) que presentan conductancia de canal único de 100pS en condiciones fisiológicas [48, 49], canales de baja conductancia (KCa2 o SK) de conductancia 2–25 pS [50] y canales de conductancia intermedia (KCa3, IK o SK4) de conductancia 25–100 pS [51–53]. Al día de hoy, se han clonado tres miembros de la familia de canales de  $K^+$  de baja conductancia activados por  $Ca^{2+}$  (KCa2.1–3) [50], sus secuencias están altamente conservadas en los segmentos transmembranales, pero divergen en el tamaño y composición de los extremos amino y carboxilo terminales. Los canales KCa2 son activados por concentraciones submicromolares de  $Ca^{2+}$ , requiriéndose aproximadamente una concentración de 300 nM para alcanzar la mitad de la activación máxima, presentando un coeficiente de Hill de 4 [54–55].

Se ha demostrado que los canales KCa2 son activados por la unión de  $Ca^{2+}$  a calmodulina (CaM), la cual se encuentra constitutivamente unida al extremo carboxilo terminal intracelular de la subunidad  $\alpha$  del canal. El complejo CaM–subunidad  $\alpha$  se encuentra justo debajo del segmento transmembranal S6, CaM se une a través de su extremo carboxilo terminal (donde se localizan los sitios de unión a  $Ca^{2+}$  3 y 4) de forma independiente de la concentración de  $Ca^{2+}$ , mientras que su extremo amino terminal (que contienen los sitios de unión a  $Ca^{2+}$  1 y 2) solo interacciona con la subunidad  $\alpha$  en presencia de  $Ca^{2+}$  [55–57]. La mutación de residuos en los sitios de unión a calcio 1 ó 2 de CaM tuvo como resultado disminución de la sensibilidad a dicho catión, mientras que mutaciones en los sitios 3 ó 4 no modificaron la sensibilidad. Estos resultados sugieren que la apertura del canal resulta de la unión de  $Ca^{2+}$  a los sitios de unión 1 ó 2 de CaM, siendo suficiente la unión de  $Ca^{2+}$  en un sitio para que exista la activación [54, 55].

La determinación de la estructura de rayos X del complejo CaM–subunidad  $\alpha$  (figura 4.6) mostró la presencia del dominio de unión a CaM (CaMBD) en el extremo carboxilo terminal de la subunidad  $\alpha$  [58]. En este estudio se muestra que en ausencia de  $Ca^{2+}$ , la interacción entre CaM y la subunidad  $\alpha$  del canal tiene estequiometría uno a uno, mientras que en presencia del catión

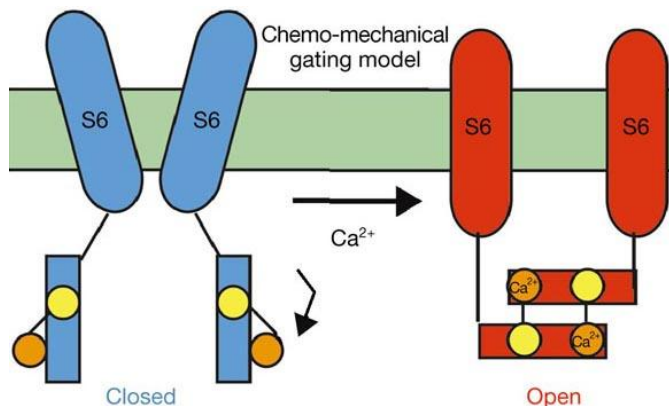
tiene estequiometría dos CaMBD por una CaM. Como se muestra en la **figura 4.6** dos CaMBD, comprendidos cada uno por una hélice  $\alpha$  corta, un giro  $\beta$  y una hélice  $\alpha$  larga, están acomodados con la hélice  $\alpha$  larga de forma antiparalela y no hacen contacto directo. Las dos moléculas de CaM están intercaladas simétricamente alrededor de los CaMBD con cada CaM haciendo varios contactos con los dos CaMBD. La estructura confirma que solo los sitios de unión 1 y 2 de CaM contienen iones  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que los sitios 3 y 4 no lo contienen [58].



**Figura 4.6.** a) Diagrama de listones del complejo dimérico CaMBD/ $\text{Ca}^{2+}$ /CaM. Los sitios CaMBD de dos subunidades  $\alpha$  se muestran en azul y amarillo, moléculas de CaM se muestran en verde, y los cationes  $\text{Ca}^{2+}$  en rojo. Se indican los elementos de estructura secundaria y el primer y último residuo que se observa en el CaMBD. b) Vista rotada  $90^\circ$  muestra la orientación del complejo relativa a la membrana. La flecha señala el primer residuo del CaMBD que se une a las hélices del poro del dominio S6. Figura modificada de la referencia [58].

Considerando los resultados anteriores, se propuso un modelo para el mecanismo de apertura de canales KCa2, donde CaM se une a través de su extremo carboxilo terminal al CaMBD. Una vez que el  $\text{Ca}^{2+}$  se une al dominio globular amino terminal de CaM ocurre un rearrreglo en el que el

lóbulo amino de CaM contacta al dominio distal del CaMBD de la subunidad  $\alpha$  vecina. Como se muestra en la **figura 4.7**, este rearrreglo resulta en un cambio conformacional del canal y abre el poro conductor [58].



**Figura 4.7.** Esquema que muestra dos de las cuatro subunidades del canal. Para mayor claridad solo se representan las hélices del dominio S6, el CaMBD y el segmento de unión entre el dominio S6 y CaMBD (línea). Los lóbulos amino y carboxilo terminal de CaM se muestran en amarillo y naranja respectivamente. La clave de este modelo son datos bioquímicos que demuestran que el complejo CaMBD/CaM tiene estequiometría 1:1 en ausencia y 2:1 en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . En este modelo, un movimiento de rotación (exagerado en la figura) podría resultar en la formación de un complejo dimérico, lo que podría conducir a la rotación entre las hélices del dominio S6 y la apertura del poro. Figura modificada de la referencia [58].

#### 4.6 Farmacología de los canales KCa2

La expresión heteróloga de canales KCa2.2 y KCa2.3 de humano, rata o ratón produce canales homoméricos funcionales [50]. En contraste, el cADN del canal KCa2.1 de humano produce canales funcionales en la membrana plasmática [59], mientras que los canales KCa2.1 de rata o ratón sólo generan canales funcionales al coensamblarse con subunidades del canal KCa2.2 [60, 61]. La expresión de canales homoméricos activos produce corrientes de  $\text{K}^+$  activadas por  $\text{Ca}^{2+}$  que son bloqueadas diferencialmente por apamina, siendo el canal KCa2.2 el más sensible ( $\text{IC}_{50} \sim 40 \text{ pM}$ ), el canal KCa2.1 el menos sensible ( $\text{IC}_{50} \sim 10 \text{ nM}$ ) y el KCa2.3 mostró una sensibilidad intermedia ( $\text{IC}_{50} \sim 1 \text{ nM}$ ) [50, 62]. Esta diferencia en la actividad de apamina sobre los diferentes subtipos de canales KCa se ha utilizado para el reconocimiento y caracterización de este tipo de canales en diferentes contextos fisiológicos. Las herramientas farmacológicas empleadas en el estudio de canales KCa2 incluyen bloqueadores, moduladores positivos o mejoradores y moduladores negativos.



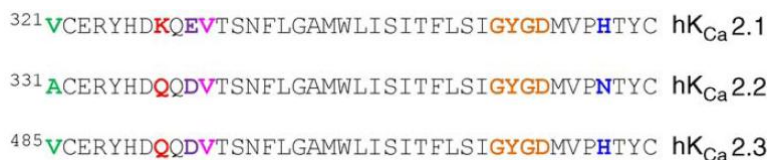
Entre los bloqueadores se encuentran las toxinas peptídicas de alacranes como tamapina de *Mesobuthus tamulus*, leiurotoxina (leiurotoxina 1) del alacrán amarillo *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, P05 del alacrán *Androctonus mauretanicus* y apamina del veneno de la abeja mielera *Apis mellifera*, ver **tabla 4.2** [23]. Los determinantes moleculares del bloqueo de canales se encuentran en la región del poro del canal, entre los segmentos S5 y S6, el mecanismo de interacción con estas toxinas se revisará a detalle más adelante.

**Tabla 4.2.** Farmacología de canales KCa2 recombinantes. Toxinas. Adaptada de la referencia [23].

Toxina	IC <sub>50</sub>	KCa2.1	KCa2.2	KCa2.3
Tamapina	nM	<u>42</u>	0.024	1.7
Apamina	nM	<u>0.7, 1.3, 2.9, 3.2, 5.1, 7.7,</u> <u>8, 12.2</u>	0.027, 0.03, 0.063, <u>0.07,</u> 0.083, 0.095, <u>0.14</u>	<u>0.63,</u> 1, <u>1.1,</u> 1.4, 2, <u>3,</u> 4, <u>13.2, 19.1</u> <u>25</u>
PO5	nM	-	-	-
Leiurotoxina (Leiurotoxina 1)	nM	<u>80, 325</u>	0.29, 0.3	<u>1.1,</u> 8.3
Lei-Dab7	nM	<u>6000</u>	<u>5.5</u>	2500
Tsk	nM	-	-	<u>198</u>

Los datos subrayados fueron obtenidos en canales recombinantes KCa2 de humano, los no subrayados se obtuvieron para canales recombinantes de rata.

Otro tipo de bloqueadores son compuestos orgánicos pequeños (**tabla 4.3**); sin embargo, estos compuestos no son capaces de diferenciar entre los tres subtipos de canales KCa2. En esta categoría se encuentran compuestos como D-tubocurarina, sales cuaternarias de bicuculina, decualinio y TEA. Se cree que la interacción de estos compuestos está mediada por residuos en la región del poro externo, como se mostró en un estudio donde la mutación de K328, E330 y H537 de KCa2.1 por los residuos equivalentes de KCa2.2 (ver **figura 4.8**) afectan la sensibilidad a D-tubocurarina [53]. Estudios de desplazamiento de apamina radiomarcada <sup>125</sup>I-apamina mostraron valores de constantes de interacción K<sub>i</sub> comparables con sus valores de IC<sub>50</sub> de bloqueo en los 3 subtipos de KCa2, sugiriendo que el mecanismo de bloqueo es mediante una reacción bimolecular simple. El compuesto NS8493 es un modulador negativo que no bloquea el canal, pero recorre la curva de activación por Ca<sup>2+</sup> a la derecha [63]. También se ha demostrado que fármacos neuroactivos disminuyen la actividad de los canales KCa, entre estos compuestos se encuentran antidepresivos tricíclicos como la fluoxetina (Prozac) y las fenotiazinas antipsicóticas [64-66].



**Figura 4.8.** Alineamiento de la secuencia del PL de los tres subtipos de canales hKCa2. Los residuos del filtro de selectividad se muestran en color amarillo. Los residuos en color rojo morado y azul están relacionados con la afinidad a inhibidores orgánicos. Figura de modificada de la referencia [22].

**Tabla 4.3.** Farmacología de canales KCa2 recombinantes. Bloqueadores/inhibidores orgánicos. Adaptada de la referencia [23].

Compuesto	IC <sub>50</sub>	KCa2.1	KCa2.2	KCa2.3
Quaternary	μM	<u>1.4</u> , <u>15.9</u>	1.1, 25	6.6
Bicuculline salts				
Dequalinium	μM	<u>0.44</u> , <u>0.48</u>	0.16, 0.35	<u>30</u>
d-Tubocurarine	μM	<u>23.5</u> , <u>27</u> , <u>30.8</u> , <u>76.2</u> , <u>354</u>	2.4, 5.4, 17	<u>210</u>
UCL 1684	nM	<u>0.76</u>	<u>0.28</u> , 0.36	5.8, <u>9.5</u>
UCL 1848	nM	<u>1.1</u>	0.11, 0.12	2.1
Calyculin A	nM	-	-	<u>240</u>
Okadaic acid	nM	-	-	<u>506</u>
Amitriptyline	μM	-	54.8	39
Carbamazepine	μM	-	14.5	-
Chlorpromazine	μM	-	12.8	0.6, 33
Cyproheptadine	μM	-	15.3	9.2
Desipramine	μM	-	-	<u>29</u>
Fluoxetine	μM	<u>9</u>	<u>7</u>	<u>17</u> , <u>20</u>
Fluphenazine	μM	-	-	<u>13</u>
Imipramine	μM	-	21.7	<u>44</u>
Nortriptyline	μM	-	-	<u>20</u>
Promethazine	μM	-	-	<u>31</u>
Tacrine	μM	-	53.7	-
Trifluoperazine	μM	-	7.6	<u>48</u>
Methyl-laundanosine	μM	<u>1.2</u>	0.8	1.8
Methyl-noscapine	μM	<u>5.9</u>	5.6	3.9
NS8593g	μM	<u>415</u>	<u>598</u>	<u>726</u>
4-Aminopyridine (4AP)	μM	-	-	512
Tetraethylammonium (TEA)	mM	<u>5.2</u> , <u>14.1</u> , <u>14.6</u>	2.8	8.7

Los datos subrayados fueron obtenidos en canales recombinantes KCa2 de humano, los no subrayados se obtuvieron para canales recombinantes de rata.

En la **tabla 4.4** se muestra una lista de moduladores positivos de canales KCa2. El primer modulador descrito fue la 1-etil-2-bencimidazolinona (1-EBIO), que originalmente se propuso como activador de canales KCa3.1 [67, 68]. Este compuesto incrementa la sensibilidad a Ca<sup>2+</sup> y ha sido el prototipo para diseñar otros moduladores positivos como 6,7-dicloro-1H-indol-2,3-diona 3-oxima (NS309), o el análogo diclorado DC-EBIO [69]. Se ha sugerido que este grupo de

compuestos actúa estabilizando el rearrreglo conformacional de CaM, asociada al extremo carboxilo terminal de los canales KCa2 o KCa3, involucrado en el mecanismo de apertura de los canales [22]. Esta deducción es soportada por los resultados al obtener una quimera de KCa2.2, proteína que contiene el extremo carboxilo-terminal de KCa3.1 mientras que el resto del canal correspondiente a la secuencia del canal KCa2.2, que resultó ser aproximadamente 20 veces más sensible a 1-EBIO. Este resultado demostró que 1-EBIO interacciona con el extremo carboxilo terminal de los canales. En este mismo estudio se demostró que 1-EBIO aumenta la sensibilidad de KCa2.2, sin aumentar la amplitud de las corrientes a concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  superiores al máximo necesario para lograr el 100 % de activación. [70]. Los moduladores positivos muestran una falta de selectividad entre canales Kca2 y KCa3, a excepción de la pirimidina trisustituida N-ciclohexil-N-[2-(3,5-dimetil-pirazol-1-il)-6-metil-4-pirimidinamina] (CyPPA) que es selectiva a KCa2.3 y KCa2.2 [71].

**Tabla 4.4.** Farmacología de canales KCa2 recombinantes. Activadores. Adaptada de la referencia [23].

Compuesto	IC <sub>50</sub>	KCa2.1	KCa2.2	KCa2.3
1-EBIO	μM	<u>631</u>	<u>453</u> , 654, <u>866</u> , 996	<u>87</u> , <u>545</u> , <u>789</u> , <u>1040</u>
Dichloro-EBIO (DCEBIO)	μM	-	<u>27</u>	<u>12</u> , <u>16</u> , <u>28</u> , >100 <sup>a</sup>
NS309	μM	-	<u>0.62</u>	<u>0.12</u> , <u>0.30</u> , <u>0.46</u> , <u>1.20</u>
CyPPA	μM	>100	<u>14</u>	<u>5.6</u>
Riluzole	μM	-	43	-
Zoxazolamine	μM	-	696	-
Chlorzoxazone	μM	-	84, 960	-
GW275919X	μM	-	-	<u>170</u> , >100 <sup>a</sup>
CCI7950	μM	-	-	<u>5</u>

Los datos subrayados fueron obtenidos en canales recombinantes KCa2 de humano, los no subrayados se obtuvieron para canales recombinantes de rata.

<sup>a</sup>Resultados obtenidos por electrofisiología en arreglo planar.

#### 4.6.1 Interacción de canales KCa2 con toxinas peptídicas

Como se describió anteriormente, la toxina apamina bloquea con alta afinidad canales KCa, logrando diferenciar entre los tres subtipos. El canal hKCa2.1 es 10 veces menos sensible a apamina que el hKCa2.2. Este dato fue utilizado para diseñar mutaciones puntuales que aumentaron la sensibilidad de hKCa2.1 cambiando los residuos E330, H357 y K328 por los correspondientes en hKCa2.2 (ver **figura 4.8**). Estos residuos se encuentran en la región cercana al PL, con lo que se confirma la interacción de la toxina con el vestibulo del canal [53]. Sin embargo, estudios realizados con un canal quimérico de hKCa2.1 que contiene las regiones extracelulares S1-S2 y S3-S4 de rKCa2.2 (KCa2.2 de ratón) mostraron un bloqueo del 50% por

300 pM de apamina, concentración que no afecta a canales hKCa2.1 pero produce el bloqueo casi total de rKCa2.2, resultado que comprueba la intervención de las regiones extracelulares en la interacción con apamina [72].

Un canal quimérico de rKCa2.1 que contiene los extremos carboxilo y amino terminales de rKCa2.2 (rKCa2.1<sub>NKCa2-CKCa2</sub>) es insensible a apamina. A pesar de que la región del poro de rKCa2.1 es idéntica a la de hKCa2.1, éste último si es sensible a apamina. La sustitución de la región extracelular S1-S2 de hKCa2.1 en la quimera rKCa2.1<sub>NKCa2-CKCa2</sub> produjo un canal insensible a apamina, mientras que la sustitución de la región extracelular S3-S4 de hKCa2.1 produjo un canal con sensibilidad a apamina comparable a la del canal hKCa2.1, con lo que se comprobó la importancia de residuos en el segmento extracelular S3-S4 en la interacción con apamina. Como se muestra en la **figura 4.9**, la secuencia de la región extracelular S3-S4 de canales hKCa2.1 tiene ocho residuos diferentes con respecto a la secuencia de rKCa2.2. Mutaciones puntuales en este canal permitieron identificar que el cambio T216S en hKCa2.1 proporciona un aumento de sensibilidad a apamina de aproximadamente 20 veces [72].

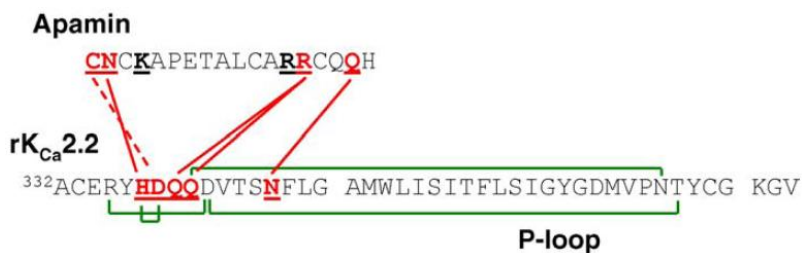
Estudios de la interacción del poro de diferentes canales de K<sup>+</sup> con TEA y las diferencias de afinidad por este bloqueador se usaron como herramienta para determinar si una mutación ha modificado la forma del canal [73]. La mutación hKCa2.1-T216S no presentó cambios significativos en el IC<sub>50</sub> de los bloqueadores TEA y D-tubocurarina lo que excluye cambios en la forma del vestíbulo [72]. Dado que la única diferencia entre serina y treonina es un grupo metilo, se cree que este residuo está en contacto directo con la apamina. Ambos aminoácidos tienen un grupo hidroxilo que podría estar formando un puente de hidrógeno con alguno de los residuos positivos como K4 o R13 de apamina. La apamina es la toxina peptídica más pequeña que interacciona con canales KCa2, su tamaño hace difícil pensar que su mecanismo de acción es por oclusión del poro y a la vez interactúa con residuos en la región extracelular S3-S4. En efecto, una investigación mostró que la interacción de apamina tiene una mayor afinidad que su potencia efectiva de bloqueo, datos que sugieren que la toxina puede inhibir la actividad del canal actuando como un inhibidor alostérico más que por oclusión del poro [73].



**Figura 4.9.** Alineamiento de la secuencia de la región extracelular S3–S4 de los canales hKCa2.1 y rKCa2.2. En color rojo se señalan los ocho residuos diferentes. Figura modificada de la referencia [22].

Muchas toxinas que bloquean corrientes de KCa2 con una potencia importante no muestran diferencias significativas entre sus constantes de afinidad ( $K_D$ ) y la potencia de bloqueo ( $IC_{50}$ ), como se espera si la interacción y el bloqueo se llevan a cabo en el mismo sitio. Sin embargo, toxinas como apamina, PO1, TS $\kappa$  y Pi1 muestran diferencias importantes en estos valores. De hecho, aunque todas estas desplazan <sup>125</sup>I–apamina, apamina es la única que logra bloquear canales KCa2 con una potencia importante [75]. Estos datos apoyan la teoría de que el mecanismo de bloqueo es diferente al mecanismo de unión de apamina a canales KCa2, siendo más probable que el mecanismo de bloqueo se dé mediante un proceso alostérico.

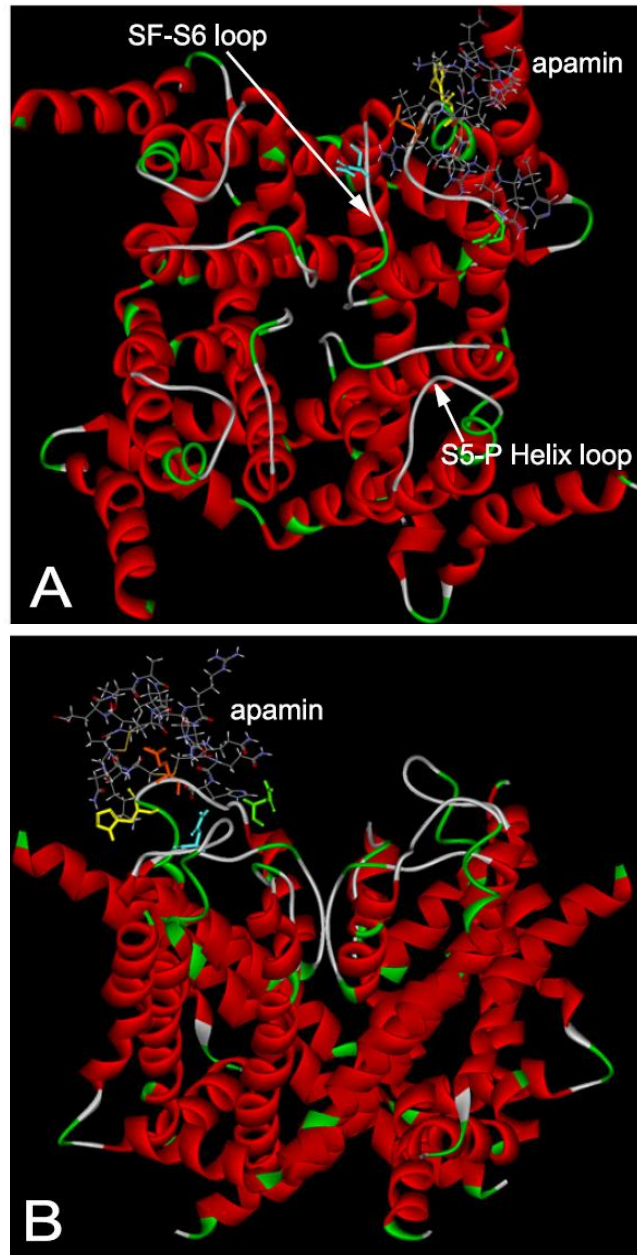
Estudios por mutagénesis y modelado estructural indican que la apamina puede unirse al vestíbulo extracelular de KCa2.2 interaccionando con H337, D338, Q340 y D341, y a la región extracelular S3–S4 interaccionando con S245 [75]. En la **figura 4.10** se muestran los residuos de interacción entre KCa2.2 y apamina predichos por modelado molecular.



**Figura 4.10.** Interacciones entre apamina y rKCa2.2 predichas por modelado molecular. Los puentes de hidrógeno se muestran en líneas rojas sólidas mientras que las interacciones electrostáticas se señalan mediante líneas rojas punteadas. Las interacciones entre los residuos del canal correspondientes al poro del mismo se señalan en líneas verdes. Los residuos de apamina que interaccionan con el poro del canal están subrayados en rojo, mientras que los residuos que potencialmente podrían interactuar con otras regiones del canal se encuentran subrayados en negro. Figura adaptada de la referencia [22].

El modelo de interacción de apamina con rKCa2.2 (**figura 4.11**) predice que el residuo N2(apa) forma un puente de hidrógeno con H337(KCa2.2); la cadena lateral de C1(apa) tiene una interacción electrostática con D338(KCa2.2) y K4(apa) forma un puente de hidrógeno con C333(KCa2.2). Se modeló la interacción de R14(apa) con Q339 y Q340 del motivo DQQD de KCa2.2. Adicionalmente, este modelo muestra R13(apa) apuntando hacia fuera del poro, haciendo posible que este residuo interactúe con residuos externos del poro como S245 que se

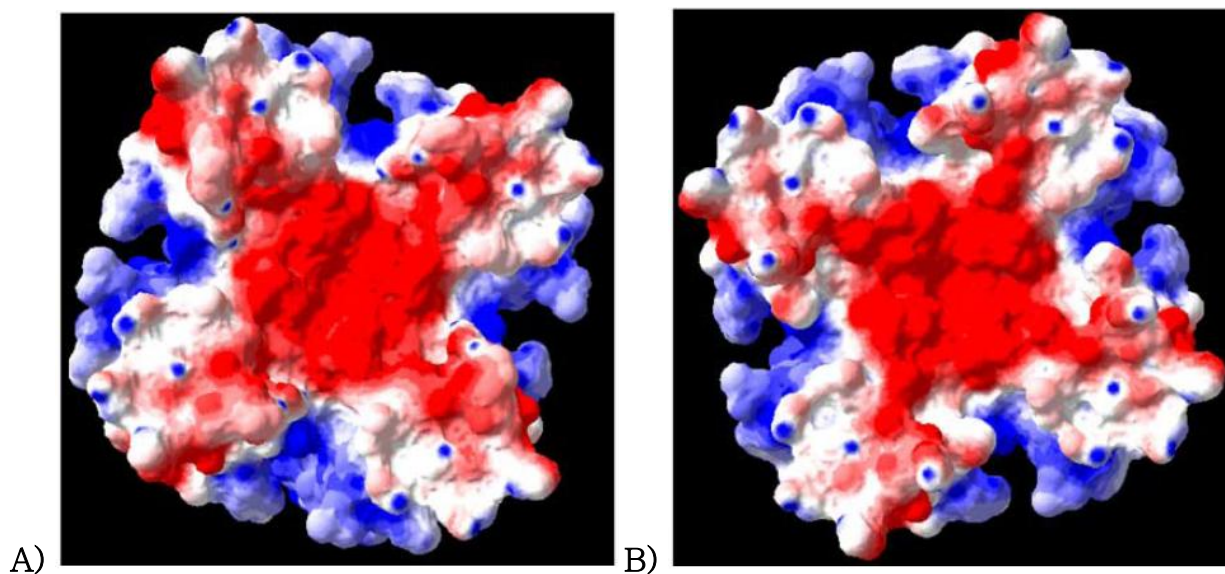
encuentra en la región extracelular S3-S4. En este modelo se muestra a la H337 en el exterior del poro asociada al ácido aspártico adyacente (D338). Se predice que un cambio en la orientación de las cadenas laterales de estos residuos, inducido por apamina, puede impactar en la hélice del poro y por tanto modificar la forma total de éste [75].



**Figura 4.11.** Modelo estructural de la interacción entre el canal KCa2.2 y apamina. A) Vista superior y B) vista lateral del acoplamiento de apamina en la región del vestíbulo. Los residuos del canal involucrados en la interacción con apamina se muestran en tubos como se describe a continuación: His337 (amarillo), Gln339 (anaranjado), Asn345 (verde) y Asn368 (cian). Figura modificada de la referencia [74].

En el caso de las toxinas de alacrán, se ha modelado la interacción de algunas de ellas comparando entre el estado abierto (usando la estructura cristalográfica de MthK [76] o Kv1.2 [77, 78] como templete) y cerrado (usando la estructura de KcsA [39] como templete) de los canales KCa2.2 y 2.3, mostrando que no existen diferencias significativas, resultado que sugiere que la región del poro de KCa2.2 y 2.3 prácticamente no cambia su forma entre los estados abierto y cerrado [2]. Dichos resultados concuerdan con estudios previos en los que se propone que el mecanismo de apertura de canales KCa se produce por modificación estructural de la región intracelular cercana al filtro de selectividad [79].

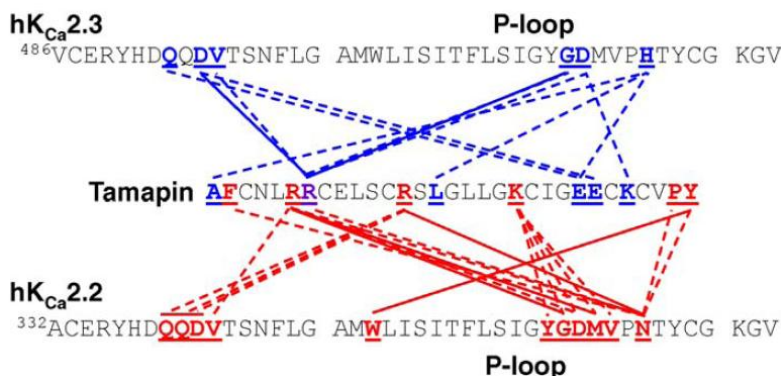
Como se aprecia en la **figura 4.12**, el análisis electrostático de canales KCa2.2 y 2.3 revela que el poro externo presenta una superficie cargada negativamente [2], la cual está en contacto directo con la disolución extracelular. Este análisis permite explicar la afinidad de las toxinas con alta densidad de carga positiva como tamapina, leiurotoxina y apamina.



**Figura 4.12.** Superficies de potencial electrostático de canales A) hKCa2.2 y B) hKCa2.3. Los canales se muestran desde una vista superior. Las superficies de color rojo, azul y blanco indican potenciales negativos (de  $-2$  a  $0$  kT/e), positivos (de  $0$  a  $+2$  kT/e) y neutros respectivamente. Solo se muestran los segmentos S5-S6. Figura modificada de la referencia [2].

En este proyecto se estudió la toxina tamapina, que presenta la mayor afinidad al canal KCa2.2 ( $K_D=24$  pM) comparada con la afinidad por KCa2.3 ( $K_D=1.7$  nM). [1] Ésta afinidad se ve reflejada en el modelo de acoplamiento de tamapina y KCa2.2 obtenido por Andreotti *et al.* [2], el cual predice la formación de cuatro puentes de hidrógeno entre R6(tam) y los residuos G362(KCa2.2) y M364(KCa2.2), R13(tam) y N367(KCa2.2), Y31(tam) y W350(KCa2.2). En este modelo se

aprecian varias interacciones electrostáticas con tres regiones del poro, el motivo DQQD en el vestíbulo extracelular, el motivo GYGDMV del filtro de selectividad y N367, un residuo correspondiente a H522 en el canal KCa2.3. El residuo K20 de tamapina es capaz de introducirse a la región formadora del poro del canal Kca2.2 haciendo varios contactos electrostáticos con los residuos Y361, G362, D363, M364 y V365 del filtro de selectividad. En la **figura 4.13** se muestra un esquema de las interacciones más importantes de tamapina con los canales KCa2.2 y 2.3.



**Figura 4.13.** Interacción entre tamapina y la región del poro de KCa2.2 y KCa2.3 predichas por modelado molecular, Andreotti *et al.* [2]. Los puentes de hidrógeno se señalan con líneas continuas, mientras que las interacciones electrostáticas se señalan con líneas punteadas. Los residuos que interactúan en el modelo con el canal KCa2.2 se señalan en rojo, mientras que los que interactúan en el modelo con KCa2.3 se muestran en azul. El residuo que interactúa en ambos modelos se muestra en morado. Imagen modificada de la referencia [22].

En el modelo de interacción de tamapina con el canal KCa2.3 se observa la interacción en regiones similares, pero con un número menor de puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas (ver **figura 4.13**). El residuo H522, que se encuentra en la posición de N367 de KCa2.2, hace contacto con L15(tam), mientras que R7(tam) ancla a la toxina sobre el vestíbulo del canal mediante un puente de hidrógeno y dos interacciones electrostáticas. En este caso, no hay ningún residuo de la toxina inmerso en el poro del canal [2]. Estas diferencias son consistentes con los valores experimentales de  $K_D$ . Los datos encontrados en estos modelos sugieren que la tamapina interactúa de forma importante con el poro de los canales causando el bloqueo de la corriente de  $K^+$  por oclusión del poro.

La toxina leiurotoxina, aislada del alacrán *Leiurus quinquestriatus*, bloquea tanto canales KCa2.2 como KCa2.3 con menor afinidad que tamapina y solo discrimina cinco veces entre los dos subtipos de canales (**tabla 4.2**). El modelo de acoplamiento con KCa2.2, descrito por Andreotti *et al.* [2], predice la formación de tres puentes de hidrógeno entre esta toxina y el motivo del filtro



de selectividad GYGDMV y N368, como se muestra en la **figura 4.14**. Estos datos sugieren que leiurotoxina ocluye el poro del canal bloqueado, mecanismo de acción similar al de la tamapina. Es importante notar que a diferencia del modelo de interacción de la tamapina, la leiurotoxina sólo muestra dos interacciones electrostáticas con el canal y no presenta puentes de hidrógeno con el motivo DQQD del vestíbulo del canal, factores que pueden explicar la menor afinidad de esta toxina por los canales KCa2.2. En el modelo de interacción de leiurotoxina con el canal KCa2.3 se observó la formación de dos puentes de hidrógeno entre R6(lei) y los residuos del canal Q493 y T496, además del anclaje de la toxina mediante interacciones electrostáticas entre R13(lei) y D518 del filtro de selectividad GYGDMV [2]. Se ha sugerido que la menor afinidad de este tipo de toxinas hacia el canal KCa2.3 se debe a que en lugar de la N368 en KCa2.2, el residuo positivo H522 de KCa2.3 repele electrostáticamente a las toxinas.



**Figura 4.14.** Interacción entre leiurotoxina y la región del poro de KCa2.2 predicha por modelado molecular, Andreotti *et al.* [2]. Los puentes de hidrógeno se señalan con líneas continuas, mientras que las interacciones electrostáticas se señalan con líneas punteadas. Los residuos que interaccionan en el modelo con el canal KCa2.2 se señalan en rojo. Imagen modificada de la referencia [22].

En general, tanto apamina como las toxinas de alacrán interaccionan con los canales KCa mediante el motivo RXCQ [80, 81]. Los bloqueadores apamina, leiurotoxina y P05 contienen un residuo básico o no cargado en la posición X de este motivo (RRCQ, RMCQ y RRCQ respectivamente). Todas las toxinas que presentan dos argininas (RR) en este sitio tienen una mayor afinidad por los canales KCa que las toxinas que contienen otro tipo de residuo en alguna de estas posiciones. La mutación de R6 por un residuo no cargado, como leucina, produce una disminución de la potencia de 70 a 180 veces, mientras que la mutación por lisina produce disminución de la potencia de 20 a 35 veces. Este resultado puede ser consecuencia de la reducción del tamaño de la cadena lateral con respecto al tamaño de R, o puede deberse a que la lisina es una base más débil que la arginina [75], siendo este residuo el que presenta el tamaño y la carga óptimos para la interacción con los canales KCa2.2 y KCa2.3. La mutación del motivo RMCQ de leiurotoxina por RKCQ no incrementó la potencia total, pero produjo un péptido 35 veces más potente sobre KCa2.2 que sobre KCa2.3. El cambio de la metionina 7 por el aminoácido no natural ácido 2,4-diaminobutírico (Dab) produjo un compuesto nombrado Lei-

Dab7, que es aproximadamente 650 veces más potente sobre KCa2.2 que sobre KCa2.3 y que no presenta actividad en KCa2.1, siendo el inhibidor más específico conocido [75].

#### 4.7 Canales KCa2 en cáncer

En este trabajo se evaluó la actividad citotóxica de la tamapina y toxinas derivadas en líneas celulares de origen cancerígeno, que expresan constitutivamente canales KCa2.2. Como se describió anteriormente, los canales iónicos contribuyen en prácticamente todos los procesos celulares básicos, de esta manera también se encuentran involucrados en el fenotipo maligno de células cancerígenas. Prevarskaya y colaboradores [82] hicieron una revisión del papel de diferentes canales iónicos involucrados en las seis características distintivas de células cancerígenas, las cuales incluyen autosuficiencia en la señalización de crecimiento, insensibilidad a las señales anti crecimiento, evasión de la apoptosis, potencial de replicación sin límites, angiogénesis sostenida y metástasis e invasión de tejidos [82]. Estas características de las células cancerígenas están íntimamente relacionadas con el flujo de iones; como son los eventos de señalización o la activación de respuestas celulares específicas que dependen de canales que transportan  $\text{Ca}^{2+}$ . Así mismo, la actividad de los canales de  $\text{K}^+$  se ve alterada durante las diferentes fases del ciclo celular; por ejemplo, se requiere que la hiperpolarización causada por la activación de este tipo de canales inicie la fase G1 del ciclo celular [83]. Comúnmente, las células cancerígenas tienen un potencial de membrana menos negativo que las células normales [84], por lo que es probable que se requiera una alta expresión de ciertos canales de  $\text{K}^+$  para producir la hiperpolarización necesaria en algunas etapas del ciclo celular.

Debido a su alta sensibilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  los canales KCa2 participan en las rutas de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en células excitables y no excitables. La regulación del potencial de membrana por estos canales provoca cambios en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . En general, la activación de estos canales en células excitables, como las neuronas, induce una repolarización o hiperpolarización que cierra los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por voltaje o disminuye su probabilidad de apertura lo que provoca la disminución de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. En células no excitables, como las del epitelio y endotelio, la activación canales KCa2 aumenta la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  insensibles a voltaje mediante el aumento del gradiente electroquímico, provocando así un incremento en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se ha descrito que los canales KCa1 y KCa3 regulan funciones en células cancerígenas como migración, proliferación y resistencia a la apoptosis; sin embargo, pocos estudios han considerado el papel de los canales KCa2 en la biología celular del cáncer. Además de la

presencia de canales KCa2.2 en la línea celular de leucemia humana Jurkat [85], solo se ha descrito la expresión de canales KCa2 en algunos tipos de tumores como meduloblastoma [86], melanoma [87, 88], cáncer de mama [4] y glioma [89, 90]. En este último tipo de tumor se ha detectado mRNA de los tres subtipos de canales KCa2, pero no se detectaron corrientes sensibles a apamina, por lo que se concluyó que no se forman canales funcionales [89, 90].

La línea celular de linfocitos Jurkat (evaluada en este proyecto) expresa dos tipos de canales de  $K^+$ , canales activados por voltaje Kv1.3 y canales activados por  $Ca^{2+}$  KCa2.2 [85, 3]. Se ha demostrado que los canales KCa2.2 en esta línea celular mantienen las vías de señalización de  $Ca^{2+}$  [91]. Este efecto puede deberse a que los niveles de expresión de canales KCa2.2 (300–500 canales/célula) son comparables a los de expresión de Kv1.3 (300–600 canales/célula) y los canales de  $Ca^{2+}$  CRAC (100 – 300 canales/célula) [91], a diferencia de las células T de humano que expresan alrededor de 400 canales Kv1.3, sólo 10 canales KCa1.1 y 10 canales CRAC por célula [92, 93]. El bloqueo de los canales KCa2.2 en células Jurkat inhibe la entrada de  $Ca^{2+}$  y produce la despolarización de la membrana plasmática [3]. Se observó que la adición del bloqueador de canales KCa2 UCL 1684 a una concentración 10 nM, bloqueó el  $95 \pm 5\%$  de los canales KCa2.2, inhibió la producción de interleucina-8 un 30% y no tuvo efecto en la producción de interleucina-2. En contraste, el bloqueo de canales Kv1.3 no tuvo ningún efecto en la entrada de  $Ca^{2+}$  [91].

La otra línea celular que se usó para evaluar la citotoxicidad de los péptidos obtenidos en este trabajo es la línea de cáncer de mama MDA-MB-231. Se ha determinado la expresión de canales KCa2.2 en esta línea celular; sin embargo, no se ha descrito que generen canales funcionales [4].

## 4.8 Resonancia Magnética Nuclear

En este proyecto se utilizó la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para determinar la estructura de las toxinas biosintetizadas. La RMN es una técnica espectroscópica mediante la cual se puede determinar la estructura tridimensional de macromoléculas, como las proteínas, a resolución atómica. La espectroscopía de RMN es una técnica muy poderosa que se emplea para la investigación de fenómenos químicos dependientes del tiempo, incluyendo cinéticas de reacción y dinámica intramolecular. También, se ha usado la RMN para estudiar interacciones proteína-ligante, donde el ligante puede ser otra proteína, ADN, ARN, sacáridos, compuestos orgánicos, etc. [94]. Las técnicas de RMN siguen en desarrollo. Uno de los puntos clave fue la

implementación de la Transformada de Fourier a la RMN por Ernst y Anderson [95], seguido por la implementación de la espectroscopía de RMN bidimensional por Jeener [96, 97]. Actualmente se han desarrollado de técnicas tan complejas que permiten el estudio de la dinámica de proteínas en células vivas [98].

Las técnicas de RMN están fundamentadas en la interacción de la radiación electromagnética con el espín nuclear cuando la muestra se encuentra dentro de un campo magnético externo  $B_0$ . En esta condición, la energía necesaria para producir una transición de nivel energético se define como:

$$\Delta E = h\nu = \gamma\hbar B_0(1 - \sigma) \quad \text{ecuación (1)}$$

Donde  $\gamma$  es la constante giromagnética del núcleo observado y  $\sigma$  es la constante de apantallamiento correspondiente.

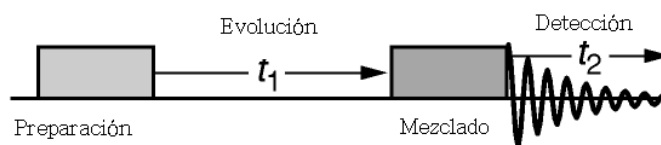
Los espectros de RMN unidimensional proveen información invaluable para la determinación de características estructurales en moléculas pequeñas. Desafortunadamente estas técnicas tienen una aplicabilidad limitada para obtener información de muestras más complejas, como lo son las biomoléculas, casos en los que el traslape de señales es un problema importante. En el caso particular de las proteínas, dependiendo del tamaño de éstas, es posible que varias decenas o cientos de protones se encuentren en la misma región del espectro, lo cual hace imposible asignar las señales empleando técnicas de RMN unidimensional. Así, la introducción de técnicas de RMN multidimensional ha jugado un papel fundamental para la resolución de la estructura de moléculas complejas [99].

#### 4.8.1 RMN bidimensional

Los espectros en dos dimensiones son relativamente sencillos de interpretar, en general la gráfica de éstos tiene tres ejes, en uno se encuentra la intensidad y los otros dos corresponden a frecuencias. Así, cada señal de un espectro bidimensional tiene una intensidad y coordenadas en dos ejes de frecuencia. Las frecuencias representadas en cada eje dependen de cada experimento particular.

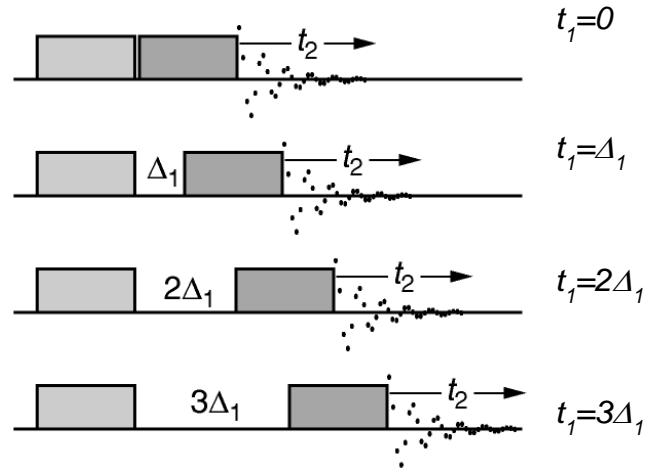
La forma general de representar un experimento en dos dimensiones se muestra en la **figura 4.15**. Estos experimentos en dos dimensiones constan de cuatro tiempos importantes, el tiempo de preparación, el de evolución, el de mezclado y la detección. Durante el *tiempo de preparación* la magnetización al equilibrio,  $\mathbf{M}$ , es manipulada de tal forma que se genere cierta coherencia

(magnetización en el plano x/y). La preparación puede ser tan sencilla como un pulso único de radiofrecuencia de  $90^\circ$ , como en el experimento COSY, hasta una serie compleja de pulsos y tiempos de espera. El *periodo de evolución*,  $t_1$ , es un tiempo variable que se incrementa sistemáticamente en series de experimentos separados; en este periodo la coherencia evoluciona. Es importante considerar que durante el tiempo de evolución, la coherencia no es necesariamente observable. En el *periodo de mezclado* la coherencia es manipulada después de haber evolucionado para obtener una señal observable que pueda ser registrada durante el *periodo de detección*. En general, durante el tiempo de mezclado es común que se realice la transferencia de coherencia entre núcleos; por ejemplo, a través del acoplamiento escalar. La manipulación de la magnetización durante el periodo de mezclado determinará el tipo de información que contendrá el espectro [100].



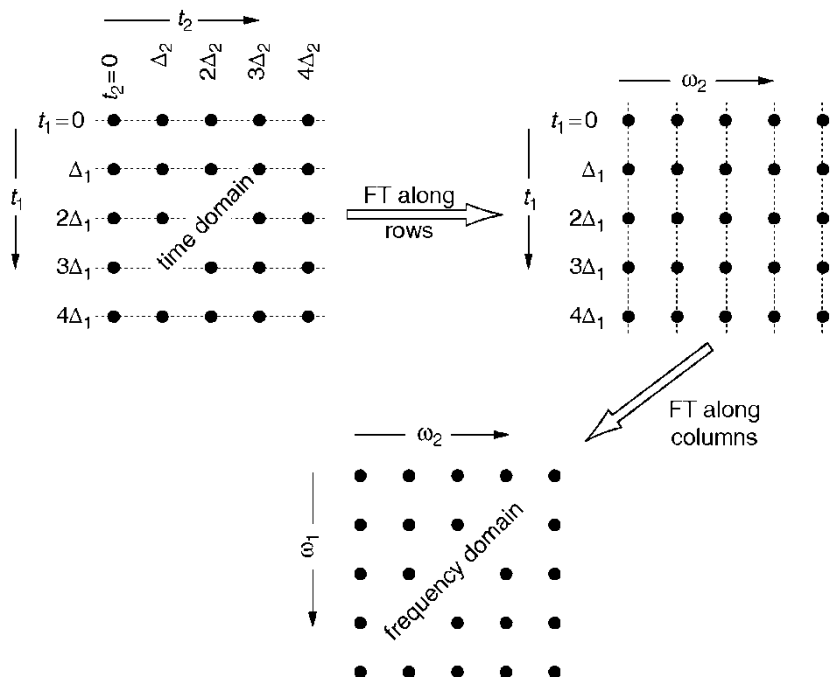
**Figura 4.15.** Esquema general de un experimento de RMN en dos dimensiones. El periodo de evolución  $t_1$  es un tiempo variable. Figura adaptada de la referencia [100].

El proceso de adquisición de un experimento en dos dimensiones se basa en el registro de una señal que decae en función del tiempo, FID, por sus siglas en inglés Free Induction Decay, similar al adquirido para un experimento de RMN unidimensional. Así, el primer FID adquirido es donde  $t_1=0$ , se realiza el registro de una serie de varios puntos. Como se observa en la **figura 4.16**, este proceso se repite en cada incremento de  $t_1$ , que es múltiplo de  $\Delta$ . El registro de  $t_2$  se realiza en tiempo real.



**Figura 4.16.** Proceso de adquisición de los espectros unidimensionales que conforman el espectro 2D. Figura adaptada de la referencia [100].

En un experimento de dos dimensiones se tiene una función,  $S$ , que depende de los tiempos  $t_1$  y  $t_2$ . Para poder interpretar fácilmente los resultados de este tipo de experimentos es necesario transformar la función  $S(t_1, t_2)$  en una función en el dominio de las frecuencias  $F(\omega_1, \omega_2)$ . En la **figura 4.17** se muestra el proceso general mediante el cual se procesan los datos adquiridos para obtener un espectro en el dominio de las frecuencias. Si los datos originales se tratan como una matriz, la primera transformada de Fourier se realiza sobre cada renglón, es decir sobre el dominio  $t_2$  para transformar la función a los dominios  $(t_1, \omega_2)$ . Posteriormente se realiza la segunda transformada de Fourier sobre las columnas, es decir sobre el dominio  $t_1$  para obtener la función en los dominios  $(\omega_1, \omega_2)$ .

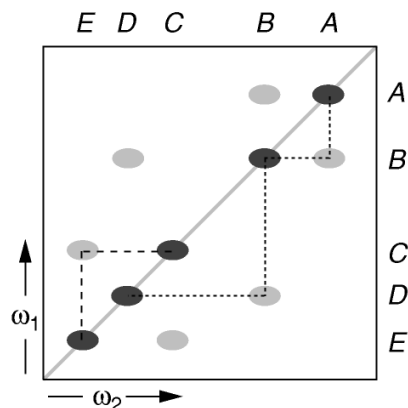


**Figura 4.17.** Esquema representativo del procesamiento de los datos para obtener un espectro de 2D. Diagrama modificado de la referencia [100].

Los experimentos bidimensionales deberían ser representados como gráficos tridimensionales. Sin embargo, para facilitar su interpretación se grafican como diagramas de contornos. Un espectro 2D homonuclear presenta una serie de señales que tienen la misma coordenada en los dos ejes, llamadas señales en la diagonal. Además, muestra las señales llamadas puntos de cruce que se encuentran fuera de la diagonal y cuyas coordenadas corresponden a los desplazamientos químicos de los núcleos que generan las coherencias observadas.

#### 4.8.2 Experimento COSY (Correlated Spectroscopy).

El experimento COSY fue el primer tipo de experimento 2D desarrollado [101]. Es un experimento homonuclear muy utilizado para analizar espectros de  $^1\text{H}$ . Los puntos de cruce del espectro COSY surgen de la transferencia de coherencia entre núcleos acoplados escalarmente. El acoplamiento escalar también se conoce como acoplamiento indirecto debido a que se lleva a cabo mediado por los electrones de enlace. En la práctica, las señales observadas están limitadas a protones separados por dos o hasta cuatro enlaces de distancia, ver **figura 4.18**.



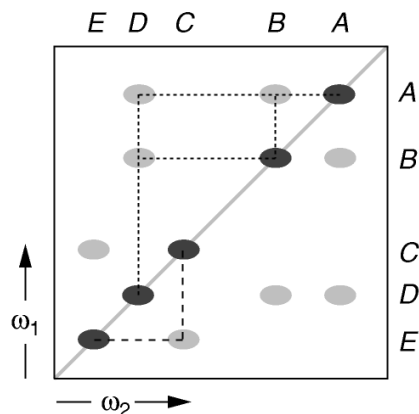
**Figura 4.18.** Esquema de un espectro COSY. Se ejemplifican cinco espines cuyo desplazamiento está indicado en las dos dimensiones. Hay dos tipos de señales, las de la diagonal en color negro y los puntos de cruce en color gris. Los picos de la diagonal tienen las mismas coordenadas (desplazamiento,  $\omega$ ) en ambas dimensiones. En este ejemplo, la aparición de señales en las coordenadas de  $\omega_1$  de B y  $\omega_2$  de A indican que A y B están acoplados a dos o tres enlaces de distancia. Haciendo un análisis similar podemos determinar que el núcleo D está acoplado con B; y, C con E. Diagrama modificado de la referencia [100].

En el análisis de proteínas, las regiones de interés son: la zona de puntos de cruce de protones de amida y protones  $\alpha$ ,  $^1\text{H}^{\text{N}}-^1\text{H}^{\alpha}$ ; los puntos de cruce de  $^1\text{H}^{\alpha}-^1\text{H}^{\beta}$ , la zona de correlaciones de protones aromáticos como tirosina, triptófano o fenilalanina y la zona de correlaciones entre protones de cadenas alifáticas de residuos como leucina, isoleucina o valina.

#### 4.8.3 Experimento TOCSY (Total Correlation Spectroscopy).

Este experimento es conocido también por el acrónimo HOHAHA (homonuclear Hartman - Hahn) spectroscopy. En el experimento TOCSY se utiliza un mezclado isotrópico para transferir magnetización en fase entre espines a través del Hamiltoniano de acoplamiento escalar, dando como resultado que la magnetización puede ser transferida a través de varios acoplamientos durante el periodo de mezclado. En ausencia de relajación, los puntos de cruce potenciales son los generados por los núcleos resonantes dentro de un mismo sistema de espines, ver **figura 4.19**. Así, en proteínas, las señales TOCSY generadas son puntos de cruce entre todos los protones de un mismo aminoácido o sistema de espines. Gracias a la gran dispersión de señales en la región de los protones de amida, es posible asignar el sistema de espines completo de un aminoácido. La asignación se realiza identificando las señales cuyas coordenadas son  $(\omega_{2i}, \delta_{\text{HN}_i})$  o  $(\delta_{\text{HN}_i}, \omega_{2i})$ , en donde  $\delta_{\text{HN}}$  es el desplazamiento químico del protón de amida del sistema analizado.





**Figura 4.19.** Esquema de un espectro TOCSY. Además de las señales que se observan en el COSY debidas al acoplamiento entre A-B, B-D y C-E, se observan señales entre los núcleos que no están acoplados A y D. El espectro TOCSY contiene puntos de cruce entre estos dos núcleos ya que están unidos por una cadena ininterrumpida de acoplamientos. Diagrama modificado de la referencia [100].

#### 4.8.4 Experimento NOESY (Nuclear Overhauser-Effect Spectroscopy).

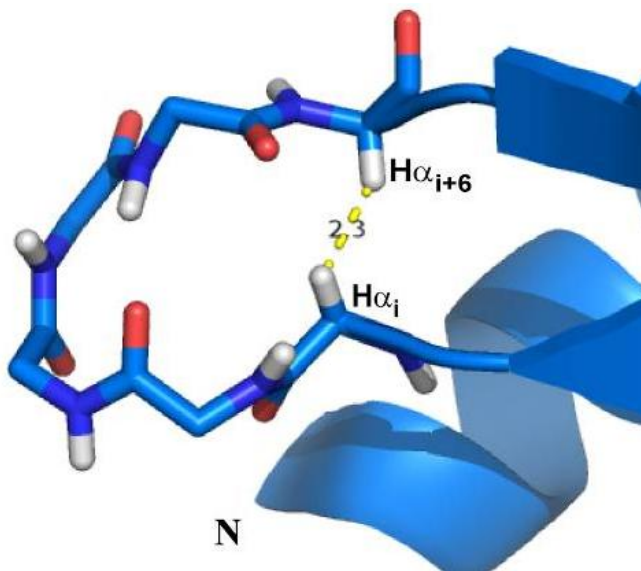
El espectro NOESY usado para la determinación estructural es muy parecido a un espectro TOCSY, la diferencia radica en que en el espectro NOESY los puntos de cruce no son generados por transferencia de coherencia vía acoplamiento escalar, sino a través del acoplamiento dipolar. El acoplamiento dipolar se presenta a través del espacio y depende tanto de la proximidad de los núcleos involucrados como de la orientación con respecto al campo magnético del equipo,  $B_0$ . La intensidad de las señales debidas al nOe puede ser relacionada con la distancia entre los núcleos que la generan por medio de la ecuación:

$$I_{(\text{nOe})} = k / (r_{AB})^6 \quad \text{ecuación (2)}$$

Donde  $k$  es una constante de proporcionalidad y  $r_{AB}$  es la distancia entre el núcleo A y el núcleo B. Es posible observar señales nOe entre núcleos que se encuentran relativamente cerca en el espacio, esto es, a menos de 5 Å de distancia.

El espectro NOESY provee información tal que se puede realizar la asignación secuencial de los aminoácidos de una proteína. El proceso de asignación secuencial se realiza observando la existencia de señales de cruce entre el  $\delta$  del protón de amida,  $^1\text{HN}$ , del aminoácido  $i$  y los protones  $^1\text{HN}$ ,  $^1\text{H}\alpha$  y  $^1\text{H}\beta$  del aminoácido  $i-1$ . Además de los nOe's secuenciales, en el espectro se observan nOe's a larga distancia que definirán la estructura terciaria de la proteína. Los nOe's a larga distancia son correlaciones entre protones que se encuentran alejados en la secuencia,

pero cercanos en el espacio, como se muestra en la **figura 4.20**, en donde se muestra la distancia entre dos protones de la cadena principal de la toxina tamapina, que generan una señal nOe característica en plegamiento de hoja  $\beta$ .

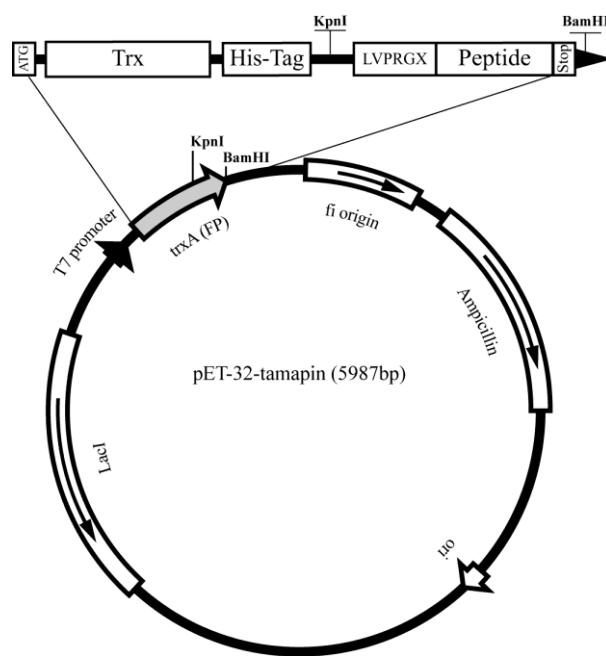


**Figura 4.20.** Parte de la estructura de una  $\alpha$  toxina en listones y tubos. La sección representada en tubos muestra la cadena principal de la toxina. Se señala la distancia en Å entre dos hidrógenos  $\alpha$  que se encuentran a seis aminoácidos en la secuencia primaria, pero cercanos en el espacio, por lo que generan señales nOe en el espectro NOESY. Se omitieron las cadenas laterales para mayor claridad.

## 5 Metodología

### 5.1 Construcción del vector de clonación

En la **figura 5.1** se muestra la construcción general de los plásmidos usados. El vector que contiene la secuencia nativa de la tamapina fue obtenido durante mi trabajo de maestría “Expresión, caracterización y determinación estructural por RMN de la GS-tamapina”. Los péptidos estudiados fueron obtenidos por mutaciones puntuales con PCR, usando como molde el pET32a\* que contiene la secuencia nativa de la tamapina.



**Figura 5.1.** Construcción del plásmido usado para la expresión de todos los péptidos dentro de una proteína de fusión (PF), en la zona agrandada se muestra el gen de expresión de la PF que contiene además de la secuencia del péptido de interés un dominio de tiorredoxina (Trx), una etiqueta de histidinas (His-Tag), el sitio de reconocimiento de trombina (LVPRGX) donde X es G para obtener GS-péptidos y M para obtener los r-péptidos.

La proteína de fusión (PF) generada, contiene un dominio de tiorredoxina (Trx), una etiqueta de 6 histidinas (His6) que le confiere afinidad a cationes metálicos, un sitio de seis aminoácidos (LVPRGS o LVPRGM) que reconoce la proteasa trombina y la secuencia de interés.

La proteasa trombina reconoció óptimamente la secuencia LVPRGS con rendimiento de corte en el enlace peptídico entre arginina y glicina cercano al 80% para las toxinas obtenidas. La reacción produce péptidos con los aminoácidos GS en el extremo amino terminal. Se utilizó

exitosamente la secuencia LVPRGM para obtener los péptidos con los aminoácidos GM en el amino terminal como residuo de la proteólisis con trombina. Estos residuos fueron eliminados posteriormente mediante una reacción con CNBr.

## 5.2 Expresión de proteína de Fusión

Bacterias de la cepa *E. coli* Rosetta gami transformadas con el plásmido correspondiente fueron utilizadas para expresar la PF de interés. El medio LB conteniendo ampicilina (100µg/mL), tetraciclina (12µg/mL), cloranfenicol (32µg/mL) y kanamicina (15µg/mL) fue inoculado con un cultivo incubado 16 horas (proporción 1:50 volumen de preinóculo:volumen de medio fresco) e incubado a 37° C hasta alcanzar una densidad óptica de  $0.7 \pm 0.05$ , momento en el cuál se adicionó IPTG hasta una concentración 0.5 mM, para inducir la producción de PF. El tiempo óptimo de incubación después de la inducción fue de 8 horas a 30°C o 6 horas a 37°C.

## 5.3 Purificación de la proteína de fusión

Después de incubar el tiempo necesario para obtener la mayor cantidad de PF, el paquete celular fue recuperado por centrifugación a  $8000 \times g$  por 15 minutos a 4° C. Las células fueron resuspendidas en buffer de lisis (Tris 50 mM y NaCl 300 mM pH=8.0) y lisadas por choque sónico usando un sonicador Misonix 3000 con un tiempo total de sonicado de 10 min a 60 Watts. La fracción soluble se filtró con membrana de PVDF de 0.45 µm antes de pasar por una columna HiTrap® GE Healthcare (1 o 5 mL), cargada con Ni<sup>2+</sup>. Dado que la PF es retenida en la columna gracias a la afinidad que le confiere la etiqueta His6, se realizó un lavado con 10 volúmenes de columna de buffer de lisis. Para eluir la PF se utilizó una disolución que contiene Tris 50mM, NaCl 300 mM e imidazol 0.5 M. Los pasos de la purificación fueron seguidos por electroforesis SDS-PAGE, en geles al 14% de acrilamida.

## 5.3 Reacción con trombina

La reacción para liberar el péptido de interés de la PF se realizó en disolución amortiguadora de corte (tris 50 mM, NaCl 300mM y CaCl<sub>2</sub> 2 mM, pH=8.0) a concentraciones de 1 a 5 mg/mL de PF en presencia de trombina inmovilizada en perlas de agarosa del *kit* Thrombin Clean Cleave™ de Sigma-Aldrich®. La mezcla de reacción se mantuvo en contacto con la trombina inmovilizada aproximadamente 4 horas a concentración de PF de 1 mg/mL y aproximadamente 16 horas a concentraciones de PF mayores de 3 mg/mL. La mezcla de reacción se separó de la trombina por

centrifugación a  $500\times g$  por 15 min. El progreso de la reacción se verificó en geles de SDS-PAGE al 14%.

#### 5.4 Purificación de péptidos tipo toxina

Después del paso de proteólisis con trombina, la mezcla de reacción se purificó por cromatografía de afinidad, usando la columna HiTrap® cargada con  $Ni^{2+}$ . El dominio de trombina que conserva la etiqueta de histidinas es afín a la columna, mientras que los péptidos de interés no son retenidos. La fracción no retenida se purificó usando una columna de fase reversa Jupiter C18 Phenomenex®, en un equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia, empleando un gradiente de 15% a 35% de B (Acetonitrilo, 0.05% TFA) en A ( $H_2O$ , 0.05% TFA).

#### 5.5 Reacción con CNBr

Para realizar la reacción con CNBr se utilizaron los péptidos previamente purificados por cromatografía líquida de alta eficiencia y liofilizados. Primero se preparó una disolución 10 mg/mL del péptido a reaccionar en una mezcla  $H_2O$  TFA 1:1. Posteriormente, se adicionó un volumen de la disolución de CNBr 2M (preparada en acetonitrilo) tal que se tuvieran 100 equivalentes de CNBr por metionina en el péptido. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación, libre de  $O_2$  y luz, por aproximadamente 17 horas. Por último, se suspendió la reacción con la adición de cuatro volúmenes de  $H_2O$  y se liofilizó el exceso de ácidos. La mezcla fue purificada por cromatografía de fase reversa empleando una columna Proteo de Phenomenex® con los disolventes A y B, previamente descritos. El gradiente usado se muestra en el cromatograma de la **figura 6.2**.

#### 5.6 Caracterización por MALDI-TOF

La determinación de masa molecular de todos los péptidos se realizó en un equipo Bruker Daltonics Microflex LT. Los datos se adquirieron en un intervalo de 2000 a 8000 m/z usando el modo reflectrón, colectando un total de 150 disparos por espectro. Las muestras fueron preparadas mezclando 1  $\mu L$  de una disolución 0.1 nM con 10  $\mu L$  de una disolución saturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico, preparada en una mezcla 2:1 de acetonitrilo:agua con 1% de ácido trifluoroacético, según el procedimiento descrito por Gobom y colaboradores [102].

## 5.7 Determinación de estructuras tridimensionales

### 5.7.1 Experimentos

Todos los experimentos de RMN se obtuvieron a 297 K en un equipo Varian Innova de 500 MHz. Para la obtención de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN en una y dos dimensiones, se prepararon disoluciones de 1 a 2.8 mM en  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada con 5% de  $\text{D}_2\text{O}$  (Cambridge Isotopes Laboratories). Los espectros se obtuvieron con matrices de 1024 puntos usando 16-32 escaneos, utilizando el método DPGSE [103] para supresión de agua. Se obtuvieron los espectros bidimensionales DQF-COSY, TOCSY ( $t_{\text{mix}}=75$  ms), NOESY ( $t_{\text{mix}}=100, 150$  y 300 ms). Los espectros fueron procesados usando NMRPipe [104], se aplicó una función de apodización sinusoidal, corrección de línea base, adición de ceros (zero filling) antes de realizar las transformadas de Fourier y una segunda corrección de la línea base posterior a la segunda transformada de Fourier. La identificación de los sistemas de espín de cada aminoácido y la asignación de las señales nOe se realizó usando la aplicación NEASY del programa CARA1.5 [105].

### 5.7.2 Cálculo de estructura

La identificación de los sistemas de espín y la asignación secuencial se realizaron siguiendo la estrategia descrita por Wagner y Wüthrich [106]. Los sistemas de espín se identificaron usando los espectros TOCSY y DQF-COSY, mientras que la asignación secuencial se realizó mediante el análisis de las correlaciones HN-HN, HN-H $\alpha$  y HN-H $\beta$  en los espectros NOESY obtenidos con 300 ms de tiempo de mezclado. Las restricciones de distancia y ángulos diedros se obtuvieron a partir de la integración de señales nOe en los experimentos con 100 y 150 ms de tiempo de mezclado usando el programa CYANA 2.1 [107, 108]. Para cada determinación, se calcularon un total de 200 estructuras, de las cuales se seleccionaron las 20 con menor valor de función objetivo.

### 5.7.3 Afinamiento

Las 20 estructuras seleccionadas del cálculo de dinámica de ángulos de torsión, obtenidas con CYANA 2.1, fueron afinadas independientemente usando AMBER9 [109-112]. Todos los cálculos de dinámica molecular y minimizaciones de energía se realizaron utilizando los parámetros de topología y campo de fuerza AMBER-99SB [112]. Se realizó el protocolo de afinamiento previamente descrito por Gurrola y colaboradores [113] que consta de los siguientes pasos:

- 1) Minimización de energía en vacío a volumen constante.
- 2) Recocido en vacío con restricciones de ángulos y distancias y tiempo de simulación de 30 ps.
- 3) Segundo recocido en vacío con restricciones de ángulos y distancias y tiempo de simulación de 30 ps.
- 4) Segunda minimización de energía en vacío a volumen constante y restricciones de ángulos y distancias.
- 5) Dinámica Molecular en caja de agua a volumen constante y rampa de temperatura de 0 a 50 K. Tiempo de simulación de 40 ps.
- 6) Dinámica Molecular en caja de agua a volumen constante y rampa de temperatura de 50 a 100 K. Tiempo de simulación de 40 ps.
- 7) Dinámica Molecular en caja de agua a volumen constante y rampa de temperatura de 100 a 300 K. Tiempo de simulación de 40 ps.
- 8) Dinámica Molecular en caja de agua a presión constante y temperatura de 300K. Tiempo de simulación de 40 ps.
- 9) Segunda Dinámica Molecular en caja de agua a presión constante y temperatura de 300K. Tiempo de simulación de 40 ps.
- 10) Dinámica Molecular en caja de agua a volumen constante y temperatura de 300K. Tiempo de simulación de 40 ps.
- 11) Dinámica Molecular en caja de agua a volumen constante y temperatura de 300K. Tiempo de simulación de 60 ps.
- 12) Dinámica Molecular final en caja de agua a volumen constante y temperatura de 300K. Tiempo de simulación de 100 ps.
- 13) Minimización de energía en caja de agua con restricciones de ángulos y distancias.

NOTA: Todos los pasos de Dinámica Molecular consideraron las restricciones de ángulos y distancias.

La evaluación de los ensamblajes, que contienen los empalmes de las 20 estructuras finales de cada péptido, se realizó con la herramienta PROCHECK del Validation Server of Protein Data Bank.

## 5.8 Pruebas de citotoxicidad

### 5.8.1 Cultivos celulares

Las líneas celulares Jurkat E6-1 y MDA-MB-231 se cultivaron 72 horas en medio RPMI 1640 con L-glutamina (RPMI 1640, GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, GIBCO) y 1% de gentamicina (sulfato de gentamicina 50mg/mL, Biosera). Posteriormente,  $3 \times 10^5$  células/pozo fueron colocadas en un volumen total de 300  $\mu$ L en presencia de las toxinas a diferentes concentraciones (0, 0.1, 1, 10 y 100 mM) para determinar la citotoxicidad.

### 5.8.2 Aislamiento de linfocitos de sangre periférica humana

Los linfocitos de sangre periférica humana se obtuvieron de la capa leucocitaria de sangre total usando un gradiente de densidad de Ficoll-Paque®, las muestras fueron donadas por el Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea y tratadas conforme a los protocolos de ética y bioseguridad de la SSA. Se diluyeron 10 mL de la capa leucocitaria en 10 mL de PBS (Disolución amortiguadora de fosfatos), posteriormente se colocó ésta disolución sobre 12 mL de Ficoll-Paque. Después de centrifugar el preparado a  $690 \times g$  por 25 minutos, los leucocitos se absorbieron con una pipeta Pasteur y se lavaron con PBS frío. Por último, las células se cuantificaron y se colocaron  $1 \times 10^6$  células por caja Petri con medio RPMI 1640 suplementado. Después de cuatro horas el sobrenadante fue transferido a cajas Petri con medio fresco para eliminar células adherentes. El proceso se repitió después de 24 horas de incubación y los linfocitos del sobrenadante se cuantificaron. Posteriormente,  $3 \times 10^5$  células/pozo fueron colocadas en un volumen total de 300  $\mu$ L en presencia de las toxinas a diferentes concentraciones (0, 0.1, 1, 10 y 100 mM) para determinar la citotoxicidad.

### 5.8.3 Ensayos de viabilidad

La viabilidad fue determinada empleando dos métodos de tinción: 1) marcador vital azul de tripano y 2) marcadores fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) y yoduro de propidio (PI). Se determinó la viabilidad contando las células viables a 0, 6, 12, 24, 30 y 36 horas de contacto con los péptidos. Se utilizaron tres pozos por cada concentración de péptido tipo toxina y cada tiempo. En cada tiempo evaluado, el contenido de cada pozo se homogeneizó y dividió en dos tubos Eppendorf, uno de los cuales se tiñó con azul de tripano (AT) y el otro con CFDA y PI. El conteo de células usando colorantes fluorescentes se realizó en un microscopio Olympus BX51, mientras que el conteo de células teñidas con AT se realizó en una cámara de Neubauer, en ambos casos se tomaron 10  $\mu$ L de las muestras previamente teñidas. Se contaron 3



volúmenes de 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra, por lo que se obtuvieron 9 conteos por cada método de tinción a un tiempo y concentración determinados. Los datos de las 18 mediciones realizadas por tiempo y concentración estudiada se promediaron. El número de células vivas en los controles (concentración de toxina=0) se consideró 100%. Para las líneas celulares de cáncer, los controles nunca tuvieron más del 5% de células muertas. Los datos de citotoxicidad se corrigieron con respecto al blanco y se normalizaron. Se determinó la diferencia estadísticamente significativa usando el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con un intervalo de confianza del 95%. Los valores de  $\text{CE}_{50}$  se estimaron con un intervalo de confianza del 95% usando regresión no lineal multivariable en el programa XLSTAT.

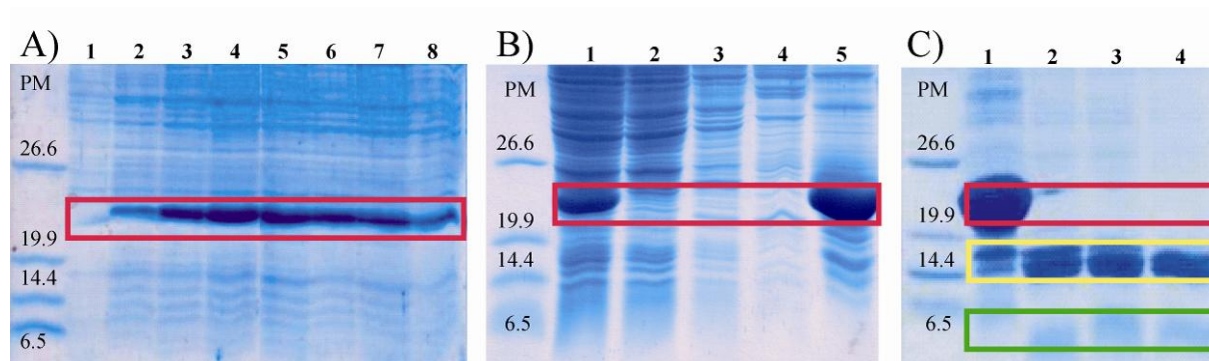
#### **5.8.4 Mecanismo de muerte celular**

El mecanismo de muerte celular se determinó realizando análisis por citometría de flujo, empleando el FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI (BioLegend, USA). Las células a probar se lavaron con PBS y se resuspendieron en la disolución amortiguadora del paquete a una concentración de  $0.5 \times 10^7$  células/mL. Posteriormente, 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión de células se colocaron en un tubo para citómetro de flujo; 5  $\mu\text{L}$  de la disolución de anexina-V FITC y 10  $\mu\text{L}$  de la disolución de yoduro de propidio se adicionaron. La mezcla se incubó en oscuridad por 15 min a temperatura ambiente. Por último, se adicionaron 400  $\mu\text{L}$  de annexin V Binding Buffer antes de realizar el análisis en un citómetro de flujo FACScan (BD, USA).

## 6 Resultados y Análisis

### 6.1 Obtención de péptidos tipo toxina

El sistema de expresión *E. coli* Rosetta gami/pET32a permitió la obtención de las PF diseñadas. Todos los péptidos biosintetizados fueron obtenidos de forma soluble a partir de la proteína de fusión correspondiente. Como se muestra en el gel SDS-PAGE (**figura 6.1A**), se obtuvo un máximo de expresión de PF 8 horas después de la inducción con IPTG a 30 °C. La purificación por cromatografía de afinidad a Ni<sup>2+</sup> permitió obtener una fracción enriquecida en PF. Los resultados del proceso de purificación se muestran en la **figura 6.1B**. En el carril 1 se muestra la fracción soluble del lisado bacteriano. El carril 2 corresponde al lisado bacteriano después de pasar por la columna de afinidad, donde la PF ha sido retenida. Los carriles 3 y 4 corresponden a lavados de la columna, donde se observa que proteínas de diversos tamaños son desplazadas, pero no la PF. En el carril 5 se muestra la fracción eluida de la columna con 500 mM de imidazol, esta fracción está enriquecida en PF.

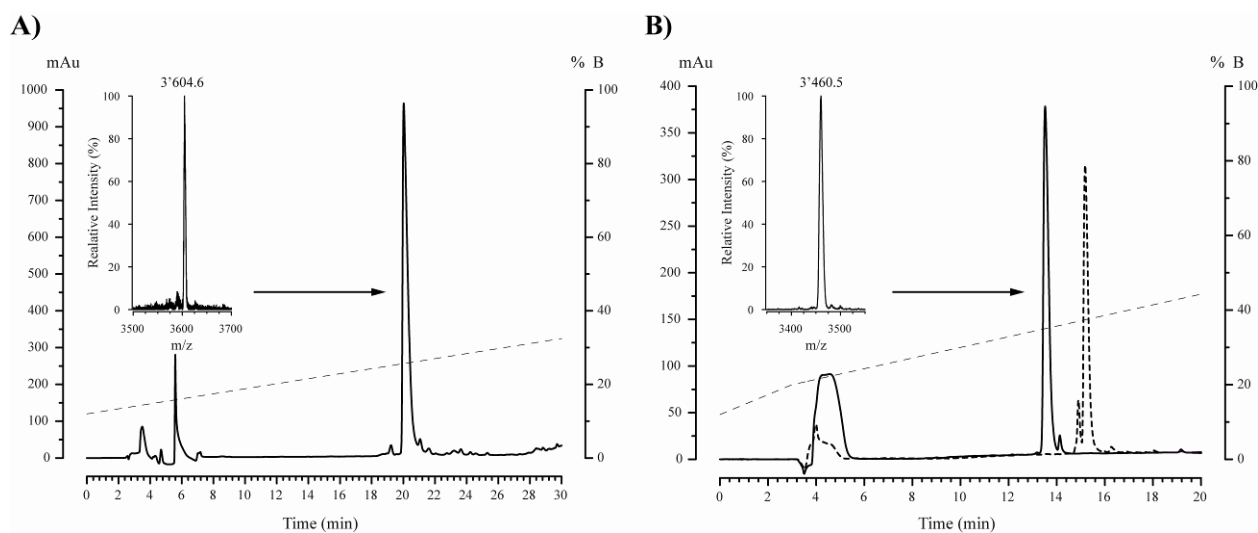


**Figura 6.1.** Geles de la expresión, purificación y corte de la PF de GS-tamapina. En los recuadros rojos se señalan las proteínas que tienen el peso molecular aproximado a la PF. A) Cinética de expresión a 30 °C en *E. Coli* Rosetta gami, en los carriles 1–8 se encuentran las fracciones solubles a 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 horas de inducción con IPTG. B) Purificación por cromatografía de afinidad. C) Gel de la cinética de corte de PF con trombina. Nota: El peso molecular de los marcadores se encuentran indicados en cada gel en KDa.

La fracción retenida por la columna HiTrap y eluida con 500 mM de imidazol se hidrolizó con la proteasa trombina con un alto rendimiento, en la **figura 6.1C** se muestra el seguimiento de una reacción de corte de PF 1 mg/mL a temperatura ambiente, en el carril 1 se muestra la fracción enriquecida con PF que se obtuvo de la cromatografía de afinidad. En los carriles 2–4 se muestra la misma fracción después de 2, 4 y 6 horas de corte con trombina; se observa un corte eficiente a partir de 4 horas de reacción. La reacción de proteólisis genera dos fragmentos, Trx-His6–

LVPR (recuadro amarillo, con masa aproximada de 17 KDa) y GS-péptido (recuadro verde, con masa aproximada de 3.6 KDa). Dado que el primer fragmento conserva la etiqueta de histidinas, la purificación del GX-péptido de la mezcla de reacción se realizó por cromatografía de afinidad a  $\text{Ni}^{2+}$ .

La fracción no retenida, que contiene el péptido de interés, fue purificada por cromatografía líquida en fase reversa usando las condiciones descritas en la metodología. En la **figura 6.2A** se puede observar que la muestra inyectada contiene pocas impurezas y que el componente mayoritario es el péptido de interés. Como se observa en la **tabla 6.1**, el rendimiento de los GX-péptidos que contienen mutaciones es mayor al del péptido que contiene la secuencia nativa.



**Figura 6.2.** A) Cromatograma de la purificación final de GS-tamapina usando una columna analítica de fase reversa, Jupiter C18 de Phenomenex. Dentro de la imagen se muestra el espectro de masas obtenido por MALDI del pico con 20.5 min de tiempo de retención, masa que corresponde a la del péptido de interés. En línea gris punteada se muestra el gradiente del disolvente B (Acetonitrilo con 0.05% de TFA) empleado. B) En línea negra punteada se muestra el cromatograma de purificación de GM-tamapina. En línea sólida se muestra el cromatograma de la purificación de r-tamapina obtenida al hidrolizar GM-tamapina por reacción con CNBr, la efectividad de la reacción se determinó verificando la masa molecular del producto por MALDI. Estos cromatogramas se obtuvieron en una columna analítica de fase reversa, Proteo de Phenomenex empleando el gradiente de disolvente B indicado en la línea gris punteada.

La purificación de la mezcla de reacción de GM-péptidos con CNBr incluyó un paso de neutralización del TFA y diálisis para eliminar el exceso de sales. La columna Proteo de Phenomenex® fue adecuada para la purificación de la especie sin GM ya que en todos los casos se logró una separación de más de un minuto con respecto al péptido con los residuos adicionales en el extremo amino terminal. En la **figura 6.2B** se observa que la diferencia de 1.5 min en  $t_R$  entre el GM-tamapina y r-tamapina es suficiente para separarlas. La disminución de  $t_R$

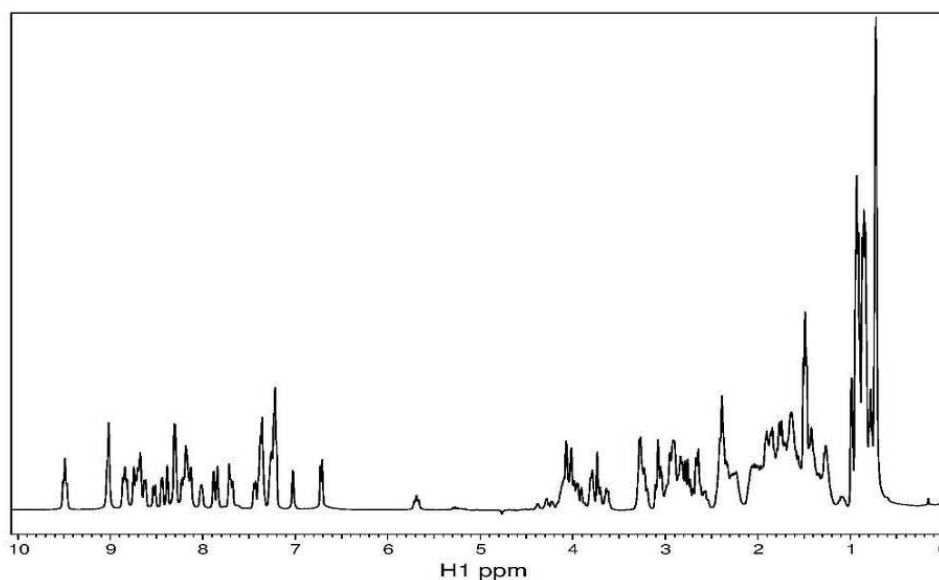
de r-tamapina con respecto al  $t_R$  de GM-tamapina es congruente con la pérdida de dos residuos. El rendimiento final de la obtención de r-peptidos se muestra en la **tabla 6.1**.

**Tabla 6.1.** Rendimiento de los péptidos a partir de un litro de medio LB y caracterización por MALDI-TOF

Péptido	Rendimiento mg/L ( $M \times 10^{-7}$ )	$M_{\text{promedio}}$ ( $[M+H]^+ 1$ experimental)	$M_{\text{Ox}}$ Valor esperado	$M_{\text{Red}}$ Valor esperado
GS-tamapina	1.7 (4.7)	(3604.6)	3603.2	3609.2
r-tamapina	1.5 (4.3)	(3460.5)	3459.1	3465.1
GS-R6A	2.1 (6.0)	(3519.7)	3518.2	3524.2
r-R6A	2.0 (5.9)	(3375.3)	3374.05	3380.05
GS-R7A	2.0 (5.7)	(3519.5)	3518.2	3524.2
r-R7A	1.5(4.5)	(3375.7)	3374.05	3380.05
GS-R13A	1.7(4.8)	(3518.8)	3518.2	3524.2
r-R13A	1.8 (5.3)	(3375.4)	3374.05	3380.05
GS-R6A/R7A	3.3 (9.6)	(3434.2)	3433.07	3439.07
r-R6A/R7A	2.8 (8.5)	(3290.1)	3288.9	3294.9

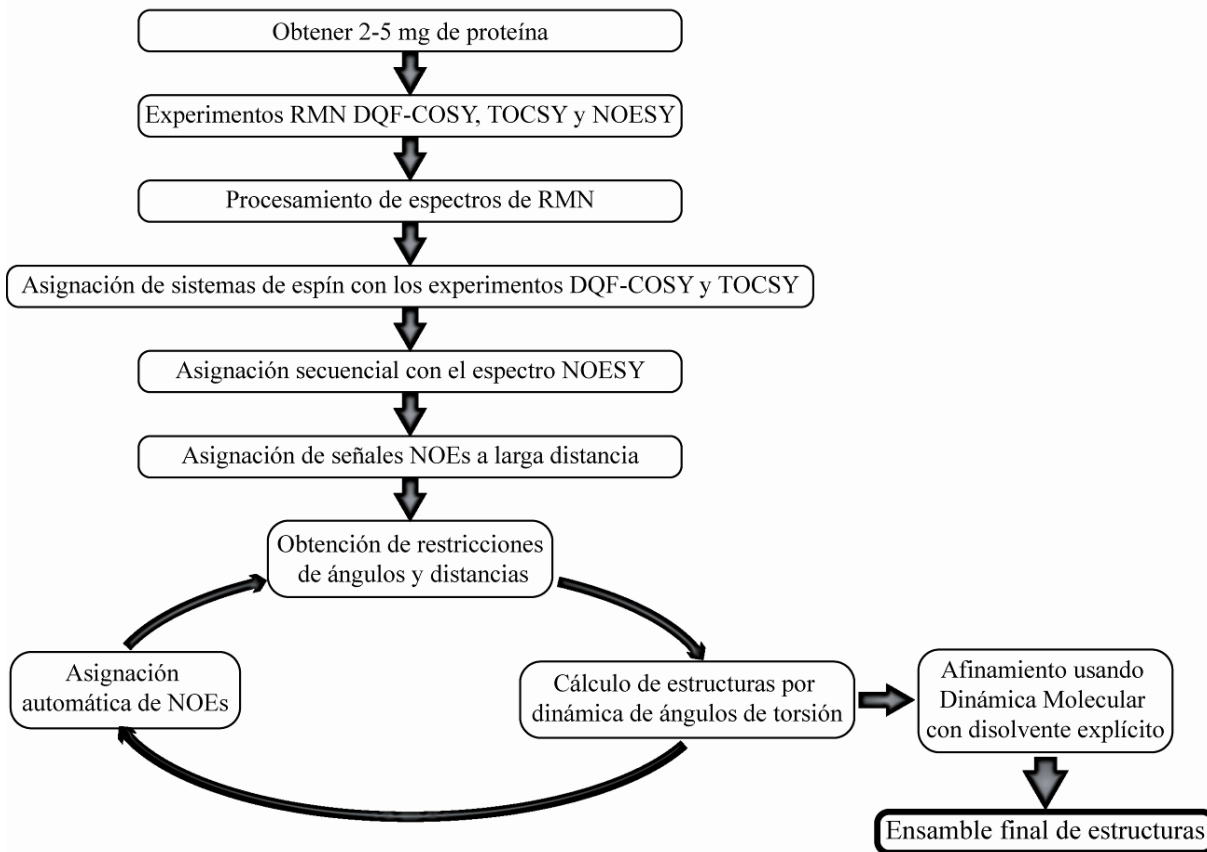
## 6.2 Determinación estructural por RMN

Para evaluar si los péptidos purificados tenían estructura terciaria aparente se obtuvieron los experimentos de  $^1\text{H}$ -RMN 1D. Los diferentes tipos de estructura secundaria se dan gracias a la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos HN y CO de la cadena principal. Péptidos sin estructura secundaria presentan un  $\delta$  de HN entre 6 y 7 ppm. En la **figura 6.3** se muestra el espectro de r-tamapina. Se observa una amplia dispersión de señales de protones de amida (HN) entre 6.5 y 9.5 ppm, lo cual es indicativo de que existe un plegamiento tridimensional bien definido, ya que la existencia de puentes de hidrógeno dentro de la cadena principal de la toxina provoca una modificación del entorno electrónico y, por consiguiente, un cambio en el  $\delta$  de los HN que están involucrados en la formación de estructura secundaria. Todos los péptidos purificados en este proyecto mostraron un patrón de dispersión de señales de HN similar.



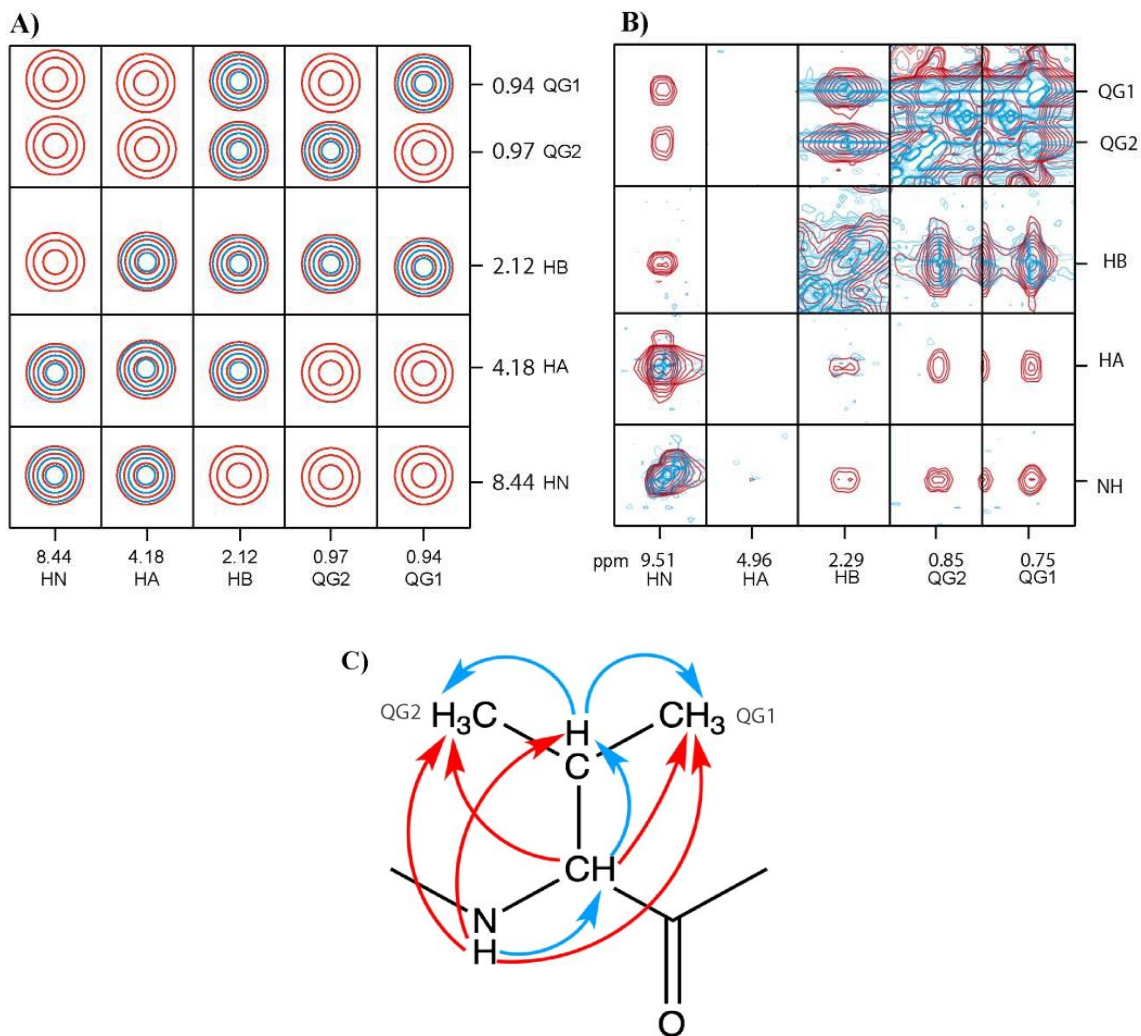
**Figura 6.3.** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN 1D de la r-tamapina. La dispersión de señales en la región de HN (6.5–9.5 para esta toxina) es evidencia de la existencia de estructura terciaria.

La determinación de las estructuras empleando RMN se resume en la **figura 6.4** e implicó la interpretación de los espectros DQF-COSY, TOCSY y NOESY, en el **Anexo A** se muestra un ejemplo del grupo de espectros obtenidos para el péptido R7A. La asignación se realizó identificando los diferentes tipos de sistemas de espines en los espectros DQF-COSY y TOCSY. Se emplearon como referencia los patrones TOCSY que se presentan en el **Anexo B** y la lista de desplazamientos químicos de la librería xeasy.lib.

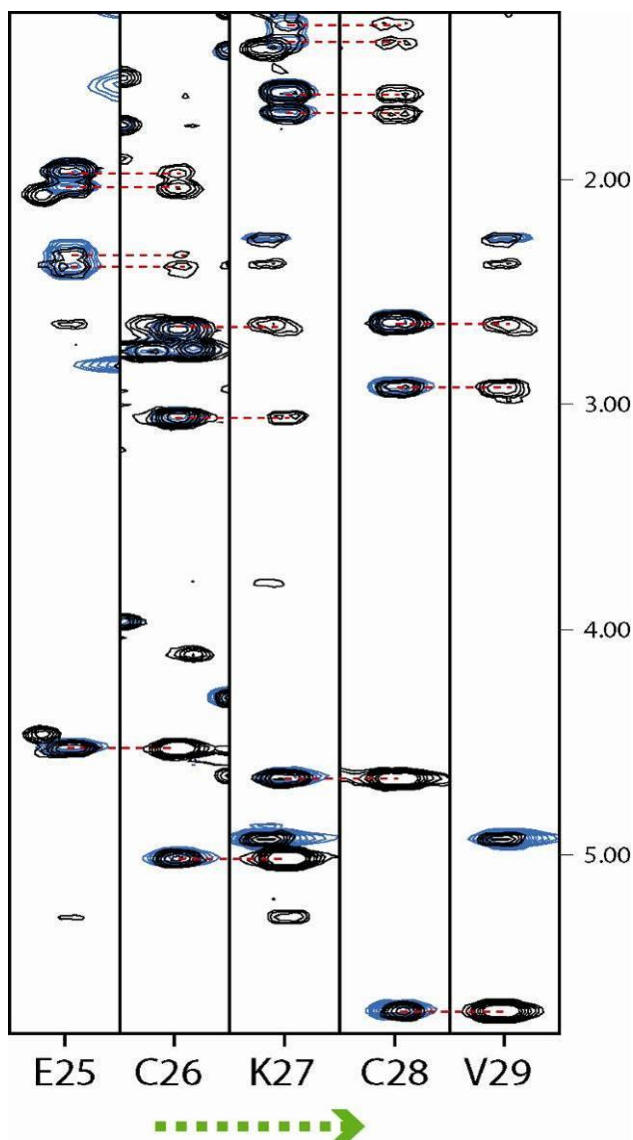


**Figura 6.4.** Diagrama general para la obtención de estructuras tridimensionales usando restricciones de RMN.

En la **figura 6.5** se muestra a manera de ejemplo la identificación del sistema de espines de Val29 de la GS-R6A, los contornos en rojo corresponden al espectro TOCSY, mientras que los contornos en azul corresponden al espectro DQF-COSY. Posteriormente, se realizó la asignación secuencial de los sistemas de espín en el espectro NOESY. Para realizar este procedimiento es imprescindible contar con la secuencia completa de la proteína a asignar. En la **figura 6.6** se muestra un ejemplo de la asignación de nOe's secuenciales.



**Figura 6.5.** A) Patrón de señales COSY (líneas azules) y TOCSY (líneas rojas) esperado para el aminoácido valina. B) Sobreposición de los espectros COSY (líneas azules) y TOCSY (líneas rojas) de valina 29, la identificación del sistema de espines se realizó comparando con el patrón esperado y los valores de desplazamientos químicos reportados. En los espectros no se observan señales en la franja del  $H_{\alpha}$  debido a su cercanía a la supresión de agua (4.75 ppm), sin embargo, las señales esperadas se pueden verificar en el lado opuesto de la diagonal. Las correlaciones entre protones  $\gamma$  (QG) se encuentran muy cercanas a la diagonal en la zona de protones alifáticos, por lo que el espectro COSY muestra mucho traslape de señales. C) Estructura de la valina. Las flechas azules indican las correlaciones que se observan en el espectro COSY. En el espectro TOCSY se observan las correlaciones indicadas tanto por flechas rojas como por flechas azules.

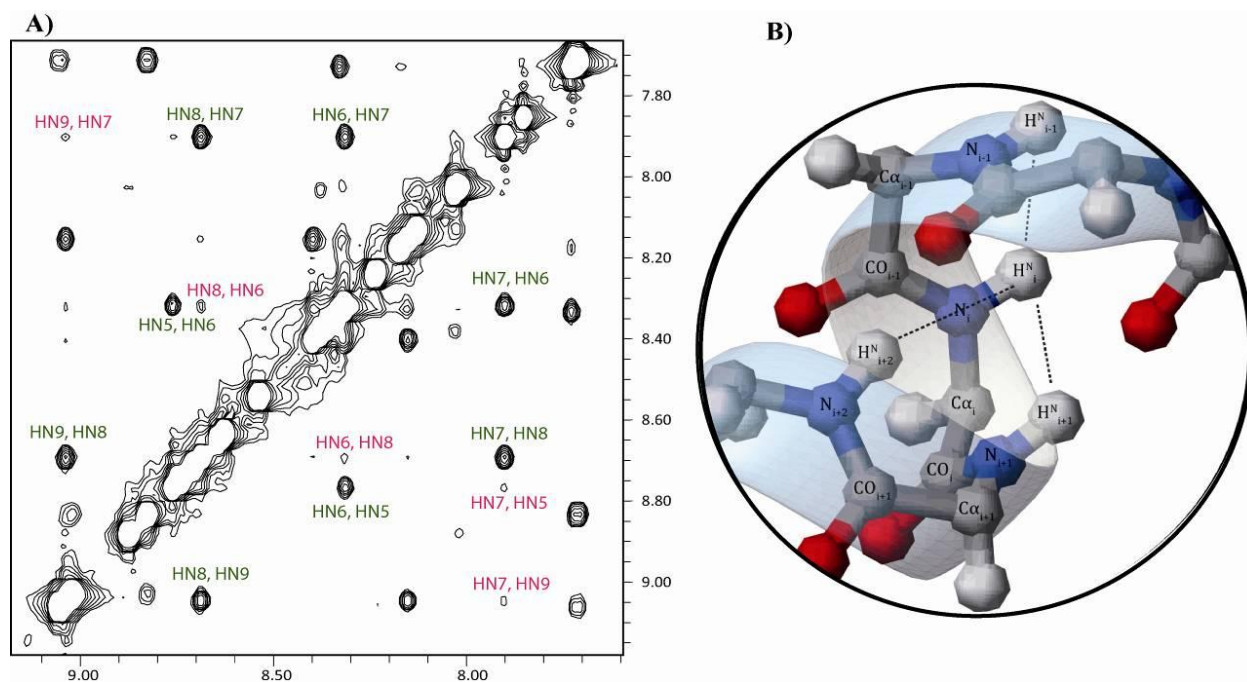


**Figura 6.6.** Asignación secuencial del aminoácido 25 al aminoácido 29 del péptido GS-R7A. Se muestran las franjas de los espectros TOCSY (líneas azules) y NOESY (líneas negras) sobrepuestas. Cada franja está centrada en el  $\delta$  del HN del aminoácido indicado, la asignación se realiza identificando las señales nOe intraresiduales, ya que son las que coinciden con las señales TOCSY, después se busca este patrón en la franja del aminoácido  $i+1$ , donde se diferencian de las señales intraresiduales por no tener señales TOCSY sobrepuestas. En la figura se señala la ubicación del patrón TOCSY en el aminoácido secuencial mediante líneas punteadas de color rojo.

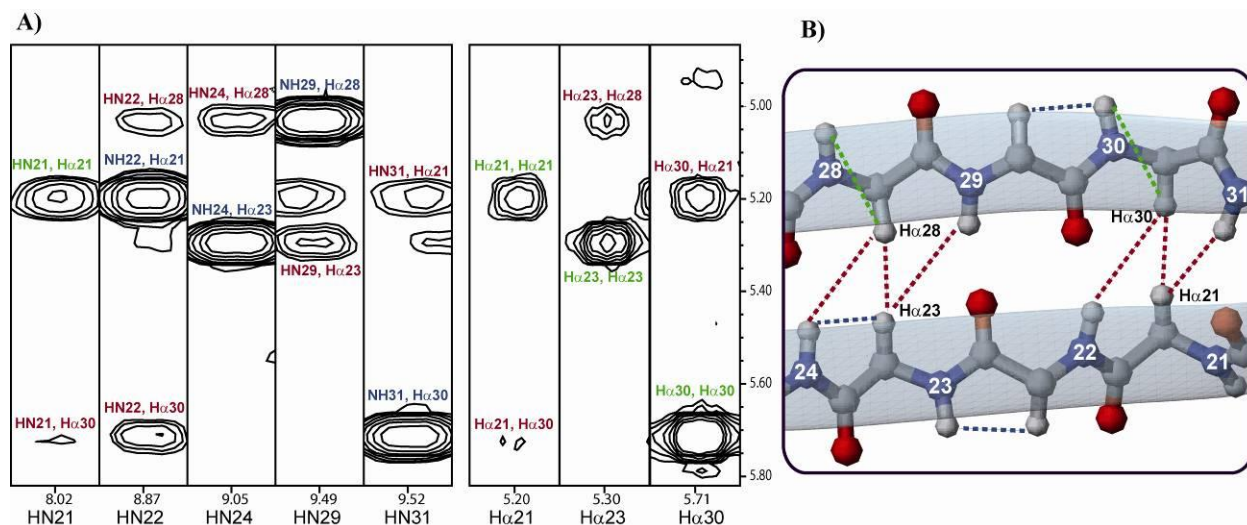
Una vez que las señales nOe vecinales fueron asignadas, se procedió a trabajar con las señales producidas por interacciones a larga distancia, es decir, entre residuos separados en la secuencia por más de cuatro aminoácidos. Este tipo de señal proporciona la información estructural, debido a que la intensidad del nOe es inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia entre los dos núcleos que generan esta señal. Al analizar los espectros NOESY de los péptidos purificados, se observan patrones que dan indicios de los elementos de estructura



secundaria presentes. En la región del desplazamiento químico de HN de amida de todos los espectros se observan señales características de la presencia de hélice  $\alpha$ . Como se muestra en la **figura 6.7B**, la corta distancia entre protones  $\text{HN}_i$  y  $\text{HN}_{i+2}$  de la cadena principal genera  $n\text{Oe}'s$  característicos. De forma similar, en la **figura 6.8** se muestran señales de correlaciones  $\text{H}\alpha\text{-HN}$  y entre  $\text{H}\alpha\text{-H}\alpha$  que son indicio de la presencia de hoja  $\beta$ .



**Figura 6.7.** A) Región de HN del espectro NOESY de GS-R7A. En color verde se indican asignaciones de señales entre aminoácidos vecinos ( $i, i\pm 1$ ) y en rosa se indican asignaciones entre aminoácidos a dos residuos de distancia ( $i, i\pm 2$ ), señales características en estructura de hélice  $\alpha$ . En el espectro se puede observar que las señales entre protones a dos residuos de distancia son más pequeñas que las vecinales, debido a que  $I_{(n\text{Oe})} \approx 1/r^6$ . B) Esquema donde se muestra la cercanía de los protones HN de la cadena principal en una hélice  $\alpha$ , figura modificada de la referencia [114].



**Figura 6.8.** A) Señales nOe características de estructura secundaria de hoja  $\beta$  antiparalela. En la sección de la izquierda se encuentran las franjas del espectro NOESY de GS-R7A centradas en el  $\delta$  de HN de los aminoácidos indicados, en la sección de la derecha se encuentran las franjas centradas en el  $\delta$  de  $H\alpha$  involucrados en la estructura de hoja  $\beta$ . En este tipo de estructura secundaria el espectro NOESY muestra señales entre los HN de cadena la principal de una hebra y los  $H\alpha$  de la hebra vecina, así como señales que correlacionan los  $H\alpha$  de una hebra con  $H\alpha$  de la hebra vecina. En color verde se indican las asignaciones de correlaciones intrarresiduo, en color azul las correlaciones vecinales y en color rojo las correlaciones a larga distancia características de hoja  $\beta$  antiparalela. B) Esquema de la estructura de hoja  $\beta$  antiparalela de GS-R7A, en líneas punteadas color rojo se señalan algunas correlaciones nOe a larga distancia, en líneas azules se muestran algunos ejemplos de correlaciones vecinales y en color verde se señalan algunas correlaciones intrarresiduo.

Para la asignación se utilizaron los espectros NOESY con tiempo de mezclado de 300 ms, mientras que para el establecimiento de restricciones de distancia se utilizó la integración de las señales de los espectros NOESY con 100 o 150 ms de tiempo de mezclado.

El cálculo de estructura terciaria usando CYANA se realizó empleando una lista de desplazamientos químicos (en todos los casos se logró una asignación mayor al 95% de los  $^1H$  presentes en los péptidos), una lista de los puntos de cruce integrados del espectro 2D [ $^1H$ - $^1H$ ] NOESY correspondiente y las restricciones de distancia entre los átomos de azufre que se encuentran formando enlaces disulfuro. El cálculo constó de siete ciclos donde se realizó la asignación automática de nOe's ambiguos con el algoritmo CANDID, seguido del cálculo de estructura por dinámica de ángulos de torsión. En el ciclo final se generó un ensamble con las 20 estructuras de menor valor de función objetivo V. La función objetivo de CYANA, está diseñada tal que su valor es cero si y solo si todas las restricciones experimentales de distancia y todas las restricciones de ángulos de torsión  $\theta$  se cumplen y todos los pares de átomos no enlazados satisfacen la condición de ausencia de traslape estérico [107].

En este trabajo se usaron únicamente restricciones de distancia, por lo que los ángulos permitidos son los ángulos estándar para aminoácidos en proteínas. El número de restricciones de distancia usadas para los cálculos de estructura con el programa CYANA para cada péptido se muestran en la **tabla 6.2**.

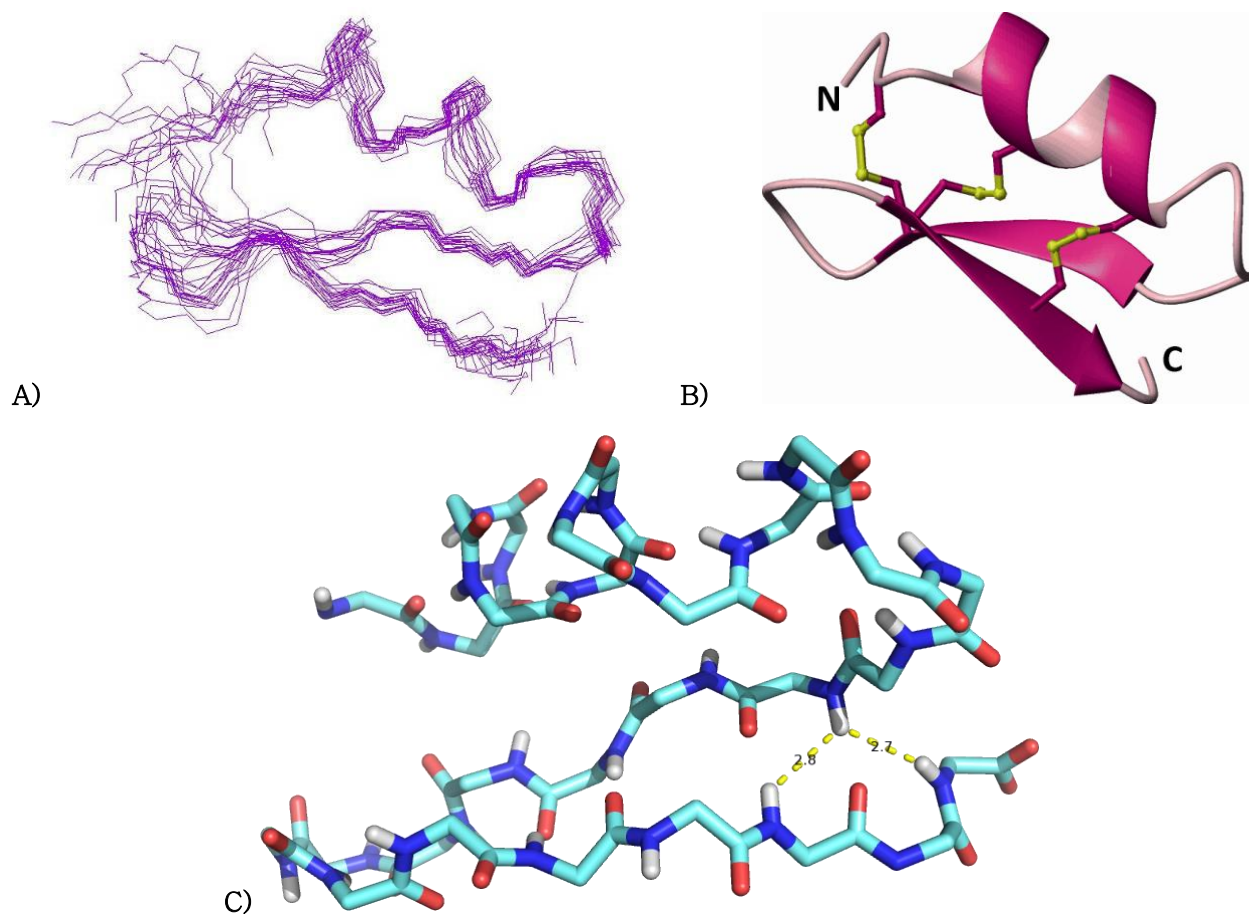
<b>Tabla 6.2.</b> Restricciones de distancia procedentes de los espectros NOESY correspondientes						
	r-tamapina	GS-tamapina	GS-R6A	GS-R7A	GS-R13A	GS-R6A/R7A
<b>Límites superiores de distancia</b>						
Total	301	414	458	524	446	517
Corto alcance	220	262	290	312	280	301
Alcance medio	44	80	83	115	90	108
Largo alcance	37	72	85	97	76	108
<b>RMSD</b>						
Promedio (Å)	0.75	0.35	0.51	0.72	1.05	0.88

Cada una de las 20 estructuras provenientes del cálculo con CYANA se sometió por separado al proceso de afinamiento usando AMBER9. En la **tabla 6.3** se muestran los valores de RMSD de cada ensamble de estructuras después de realizar este procedimiento. El RMSD de las tablas fue calculado considerando el esqueleto de los residuos 5–29 de la secuencia nativa ya que es la zona con estructura definida. Se observa que al aumentar el número de restricciones de distancia, CYANA arroja un conjunto de 20 estructuras con menor RMSD. El resultado del afinamiento con AMBER tiende a producir ensambles con un mayor RMSD que el de partida, al analizar las estructuras se puede observar que las regiones del asa y el giro se encuentran más dispersas después del afinamiento. Los resúmenes del cálculo de energía y análisis de violaciones de cada estructura después del afinamiento se encuentran en el **Anexo C**. En el caso de la mutante GS-R6A/R7A se observa un mayor desorden producido en el afinamiento, este efecto puede deberse a la falta de carga superficial lo cual desfavorece la estabilización de la estructura en un medio acuoso. En el **Anexo C** se presentan los gráficos de Ramachandran de las seis estructuras sometidas al PDB, en ellos se puede observar que la mayoría de los ángulos, de todas las estructuras, caen en las regiones permitidas.

**Tabla 6.3.** RMSD de los ensambles obtenidos con CYANA y AMBER

Péptido (PDB)	r-tamapina (2LU9)	GS-tamapina (2KY3)	GS-R6A (2ME7)	GS-R7A (2MEL)	GS-R13A (2MEN)	GS- R6A/R7A (2MEO)
RMSD <sub>CYANA</sub>	0.638	0.466	0.403	0.275	0.425	0.146
RMSD <sub>AMBER</sub>	0.818	0.751	0.443	0.462	0.524	0.828
Restricciones	301	414	458	524	446	517

Tanto la estructura determinada para la r-tamapina como las estructuras de las mutantes, muestran las características de estructura secundaria esperadas para una toxina de la subfamilia  $\alpha$ KTx5: una hélice  $\alpha$  conectada por una asa a una hoja  $\beta$  formada por dos hebras antiparalelas unidas por un giro  $\beta$ . En la **figura 6.9A** se presenta el ensamble final de la r-tamapina, se representa el esqueleto principal de las 20 estructuras en líneas. En la **figura 6.9B** se muestra la representación en listones de la estructura de menor energía del ensamble final de r-tamapina. Para este péptido, la estructura consta de una región desestructurada del residuo Ala1 a Asn4, una hélice  $\alpha$  formada por los aminoácidos Leu5 a Ser14 conectada a una la hoja  $\beta$  de dos hebras por una asa (Leu15 a Leu17). La primera hebra (Leu18 a Cys21) se une a la segunda hebra (Glu25 a Val29) por un giro  $\beta$  tipo II formado de la Ile22 a Glu25. En algunas de las estructuras de los ensambles finales, el tercer giro de la hélice es una vuelta  $3_{10}$  formada por los residuos Cys12 a Leu15.



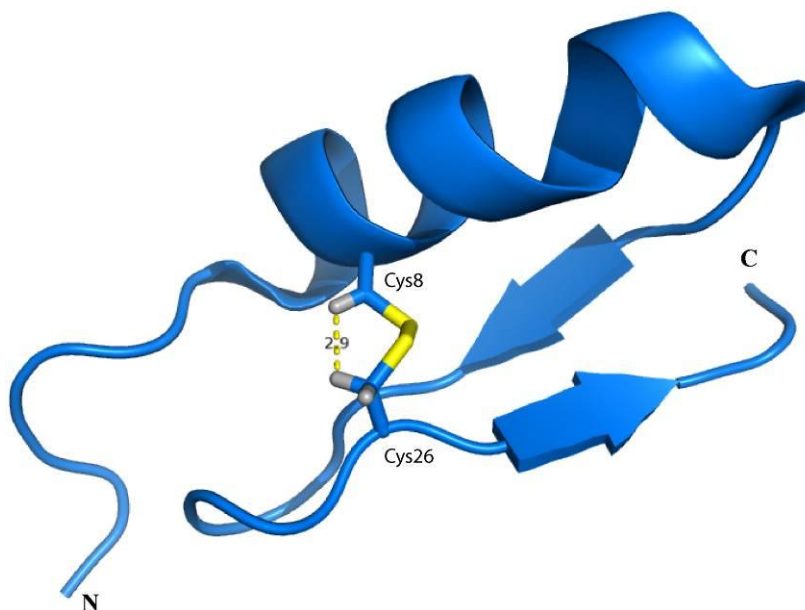
**Figura 6.9.** A) Ensamble final de 20 estructuras de *r*-tamapina. B) Representación en listones de la estructura de menor energía del ensamble final de la *r*-tamapina. C) Cadena principal de la estructura de menor energía del ensamble de *r*-tamapina mostrada en cilindros.

### 6.3 Conectividad de enlaces disulfuro

La determinación de la conectividad de enlaces disulfuro se realizó con ayuda de dos herramientas: los resultados de espectrometría de masas MALDI-TOF y el análisis de los espectros NOESY.

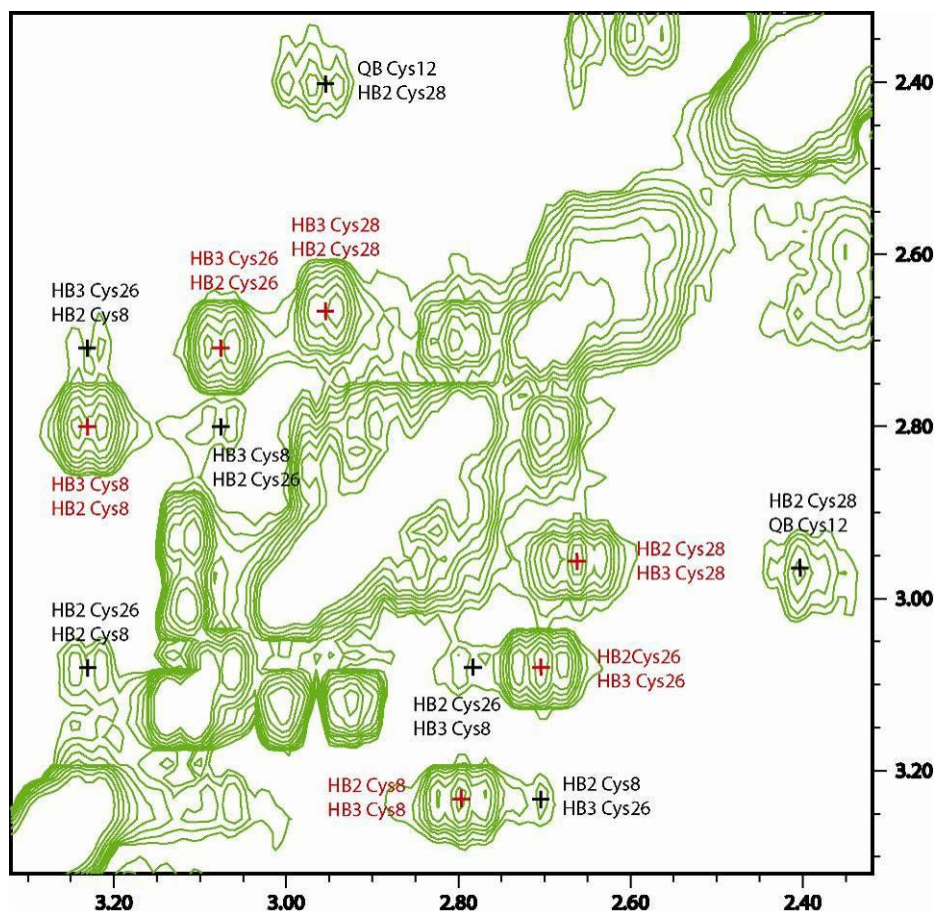
Por una parte los resultados de espectrometría de masas muestran valores de  $m/z$  del ión  $[M+1]^{+1}$  correspondientes con la masa de los péptidos totalmente oxidados lo que permitió confirmar la existencia de tres enlaces disulfuro en todos los péptidos obtenidos. En la **tabla 6.1** se muestra una comparación de los resultados de masa promedio experimental y calculada para cada péptido.

Las señales de los espectros NOESY pueden proporcionar información para la determinación de enlaces disulfuro. En este tipo de enlace, los  $H\beta$  de los dos aminoácidos involucrados se encuentran a una distancia aproximada de 3 Å, por lo que generan señales nOe. En la **figura 6.10** se muestra la distancia entre uno de los protones  $\beta$  de la Cys8 y la Cys26 en la estructura de menor energía de r-tamapina.



**Figura 6.10.** Estructura de menor energía del ensamble de GS-tamapina. Se muestra el enlace disulfuro Cys8–Cys26 (C2–C5) en tubos y se señala la distancia de 2.9 Å entre protones  $\beta$  que generan señales nOe.

En el espectro NOESY de r-tamapina no es posible observar señales que den indicios de la conectividad de puentes disulfuro ya que la región de  $\delta$  de los  $H\beta$  se encuentra muy traslapada. Sin embargo, la dispersión de señales en el espectro del péptido GS-R6A permite observar los puntos de cruce entre el  $\delta$  de los  $H\beta$  de la Cys8 (C2) y el de los  $H\beta$  de la Cys26 (C5), así como los puntos de cruce entre los  $\delta$  de los  $H\beta$  de la Cys12 (C3) y el de los  $H\beta$  de la Cys28 (C6) (**figura 6.11**) que dan indicio de la cercanía de dichos núcleos. De esta evidencia, se infirió la existencia de los enlaces disulfuro C2–C5 y C3–C6. Del enlace C1–C4, solo se tiene evidencia a través de una señal nOe entre el  $H\alpha$  de la Cys21 (C4) y los  $H\beta$  de la Cys3 (C1).



**Figura 6.11.** Asignación de las señales nOe que se generan entre H $\beta$  de cisteínas en puentes disulfuro. En color rojo se encuentra la asignación de correlaciones entre H $\beta$  intrarresiduo, en color negro se encuentra la asignación de señales interresiduo. Las señales entre H $\beta$  de la Cys8 (HB2 y HB3 Cys8, según la nomenclatura Xeasy) y Cys26 (HB2 y HB3 Cys26) corresponden al puente C2–C5, mientras que las correlaciones entre H $\beta$  Cys12 y Cys28 corresponden al puente C3–C6.

## 6.4 Ensayos de citotoxicidad

En este trabajo se determinó la viabilidad de tres tipos de células para estudiar indirectamente el efecto de la r-tamapina y péptidos derivados en canales KCa2.2. Las líneas celulares Jurkat E6-1 y MDA-MB-231, que expresan constitutivamente estos canales, y linfocitos de sangre periférica humana, que no los expresan, fueron las líneas celulares empleadas. Todos los péptidos fueron probados a cuatro concentraciones (0.1, 1, 1 y 100 nM) y cinco tiempos de exposición (6, 12, 24, 30 y 36 h) en los tres tipos de células para determinar el efecto de la tamapina y péptidos derivados en la viabilidad celular, como consecuencia de la posible interacción de las toxinas con los canales iónicos KCa2.2. Adicionalmente, se realizaron las mismas pruebas con la toxina de veneno de abeja, apamina, en las mismas concentraciones y tiempos de exposición. Las gráficas de los resultados se muestran en la **figura 6.12**.

*Linfocitos Jurkat E6-1.* Los péptidos probados provocaron un efecto fuertemente dependiente de la concentración, con alta toxicidad aún en la menor de las concentraciones probadas. El mayor efecto se observó a las primeras seis horas de exposición. A concentraciones altas (100 nM) se observó que la viabilidad celular disminuyó drásticamente a las seis horas de exposición (viabilidad entre 32-37% en todos los casos), a mayor tiempo de exposición se observó una disminución de viabilidad menos pronunciada, hasta 16-24% a 36 horas. En la **figura 6.12** se observa que sólo los péptidos GS-tamapina, GS-R7A y apamina produjeron una disminución considerable en la viabilidad celular después de 24 horas, presentándose una curva bifásica, claramente apreciable a altas concentraciones de toxina. Este efecto puede deberse a la desorción de toxina desde las células muertas; sin embargo, se necesitan más pruebas para comprobar esta explicación.

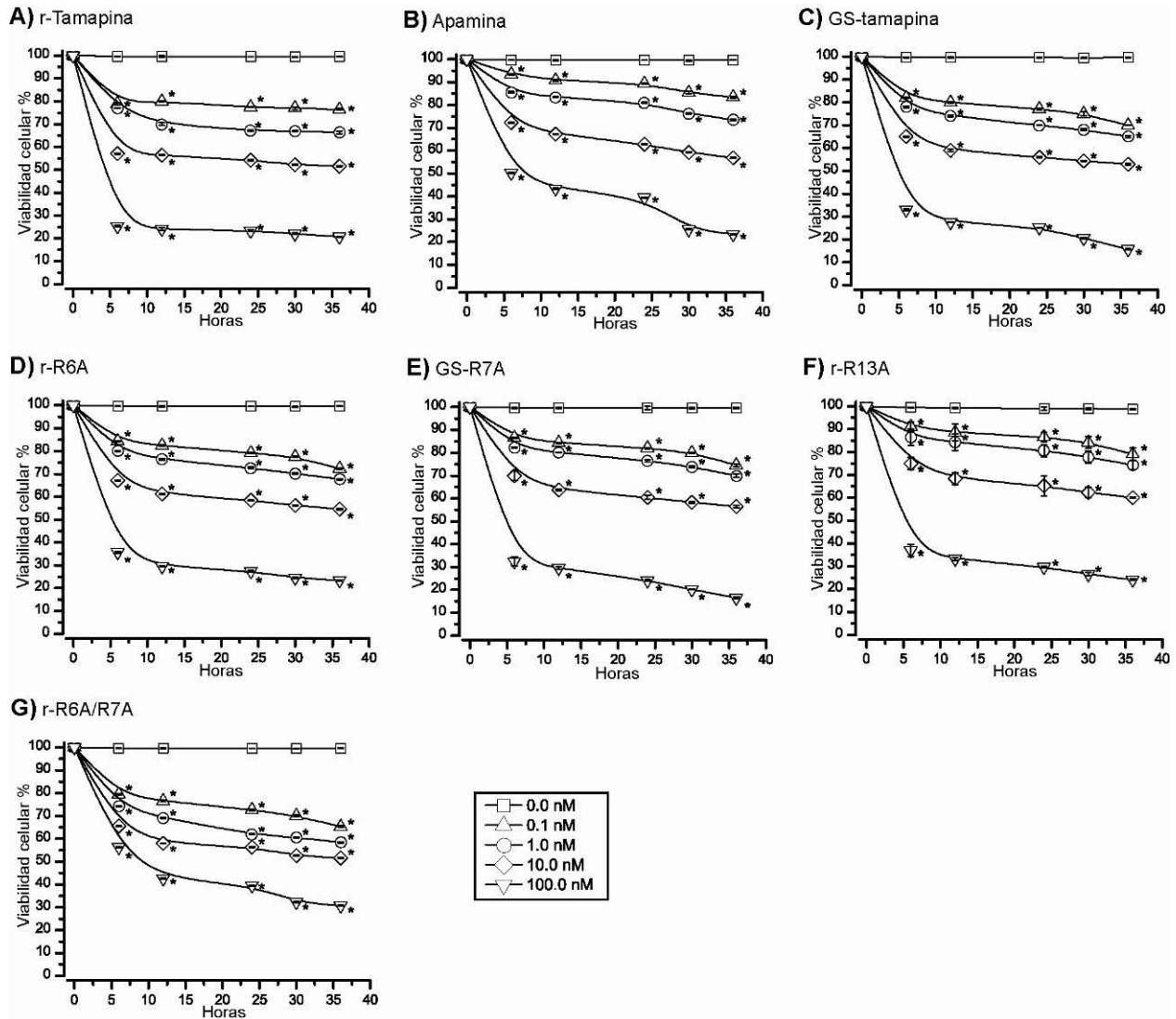
En la **tabla 6.4** se muestran los valores de CE<sub>50</sub> de todos los péptidos probados calculados para tener un 50% de células viables a 36 h de exposición. Se muestran los valores obtenidos con la técnica de tinción con CFDA/IP y con tinción con AT. El comportamiento de la viabilidad dependiente del tiempo de exposición y la concentración de las toxinas fue se analizó usando regresión no lineal múltiple. Las ecuaciones que representan dicho comportamiento tienen la forma:

$$Viabilidad = a + bC + ct^2 \quad \text{ecuación (3)}$$

Donde C es la concentración de la toxina y t es el tiempo de exposición. Los coeficientes *a*, *b* y *c* para cada toxina, que se obtuvieron al analizar los datos obtenidos en los ensayos con CFDA/IP, se muestran en la **tabla 6.4**. En el Anexo D se muestra la gráfica de viabilidad vs. viabilidad



predicha y el gráfico de residuales para el ensayo de citotoxicidad de GS-R7A. Se observa una buena correlación y aleatoriedad de residuales, lo que comprueba que el modelo usado es válido.



**Figura 6.12.** Actividad de los péptidos en linfocitos Jurkat. Todas las gráficas muestran dependencia de la concentración y un efecto importante a las primeras 6 horas de exposición. Los puntos que son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) al control correspondiente se señalan con un \*.

La r-tamapina es el péptido más tóxico, con  $CE_{50} = 13.6$  nM. Las diferentes mutaciones de arginina por alanina produjeron disminución en la toxicidad hasta un máximo de  $CE_{50}$  de 27.3 nM para el caso de la GS-R7A. Es importante señalar que a pesar de que hubo disminución de la toxicidad al mutar los residuos de arginina, los valores de  $CE_{50}$  se mantuvieron en el orden de nM. De esto se puede deducir que la toxicidad de los péptidos estudiados está escasamente afectada por las modificaciones en los aminoácidos 6, 7 y 13, por lo que los resultados de

citotoxicidad de apamina son de gran importancia para tener indicios de que los péptidos están afectando a las células mediante los canales KCa2.2.

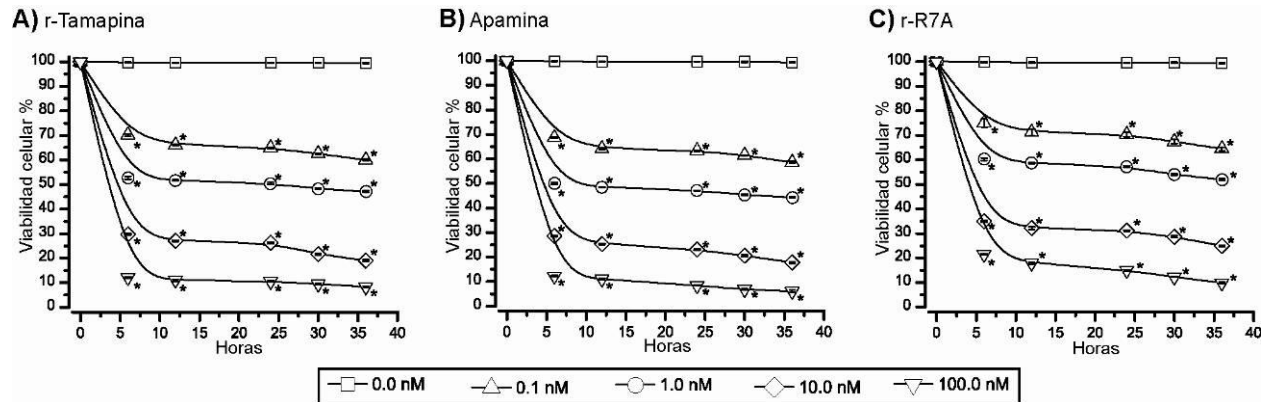
**Tabla 6.4.**  $CE_{50}^*$  en nM de las toxinas probadas en linfocitos Jurkat E6-1 y coeficientes de la ecuación de regresión multivariable encontrada con la técnica de tinción CFDA/IP (ecuación 3 página 61).

<b>Péptido</b>	Apamina	r-tamapina	GS-tamapina	r-R6A	r-R13A	r-R6A/R7A	GS-R7A
<b>CFDA/IP</b>	17.0	15.7	16.4	20.1	21.9	25.2	29.5
<b>AT</b>	13.6	11.5	14.6	16.3	17.5	22.0	25.1
<b>Promedio</b>	<b>15.3</b>	<b>13.6</b>	<b>15.5</b>	<b>18.2</b>	<b>19.7</b>	<b>23.6</b>	<b>27.3</b>
<b>DE</b>	2.40	2.97	1.27	2.69	3.11	2.26	3.11
<b>Coefficiente</b>							
<b>a</b>	29.1245	- 3.6749	26.2286	- 14.5205	48.3581	46.4649	46.4066
<b>b</b>	- 1.1810	- 4.0180	- 2.596	- 2.5440	- 1.760	- 2.035	- 3.590
<b>c</b>	0.03005	0.08358	0.04939	0.04693	0.02802	0.03747	0.07285

\*Concentraciones calculadas para tener 50% de células viables a 36 horas de exposición.

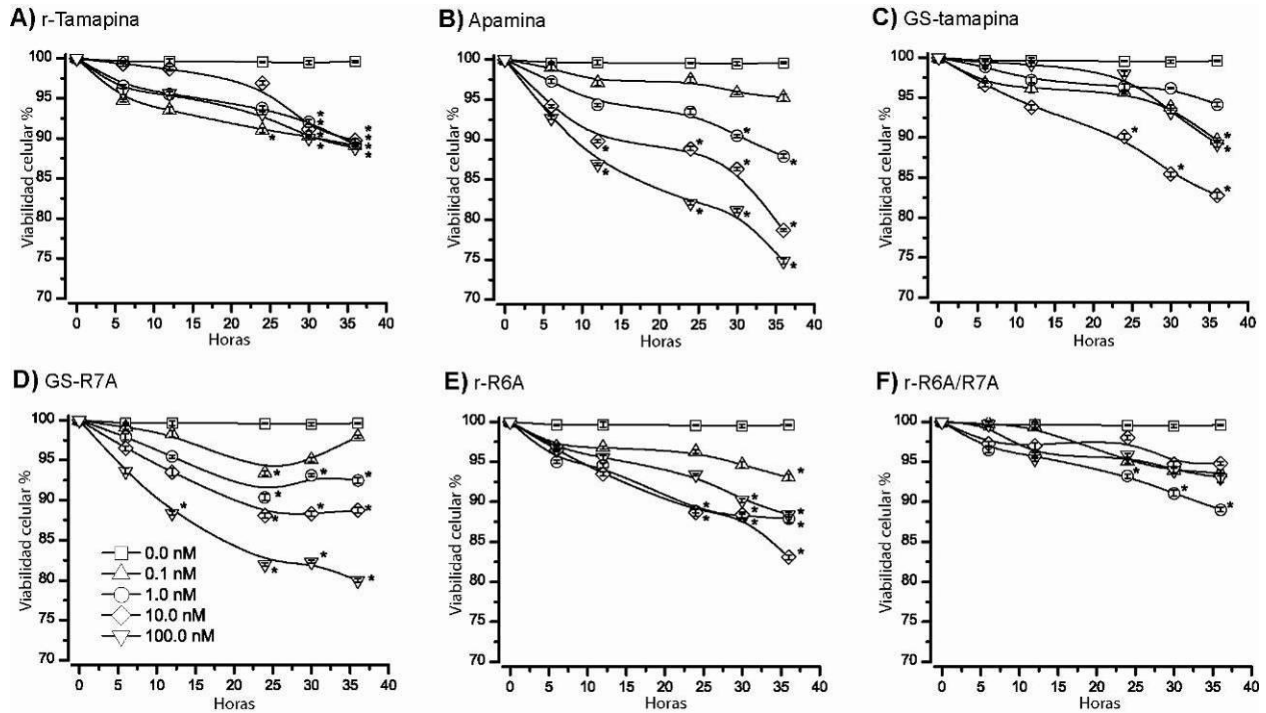
En la **figura 6.12** se observa que las curvas de citotoxicidad con apamina muestran un comportamiento parecido a las gráficas de los péptidos derivados de tamapina; adicionalmente, el valor de  $CE_{50}$  de apamina es muy parecido al de r-tamapina. Así, la similitud entre el efecto tóxico de los péptidos derivados de tamapina y el de la apamina sugiere que todos estos péptidos actúan con un mecanismo de acción similar.

*Células MDA-MB-231.* Los resultados en esta línea celular produjeron curvas de citotoxicidad con el mismo comportamiento de las curvas en linfocitos Jurkat. Como se observa en la **figura 6.13**, la toxicidad en estas células también es dependiente de la dosis y muestra un efecto drástico en las primeras seis horas de exposición, tal como ocurrió en las células Jurkat. En esta línea celular se probaron la r-tamapina, apamina y r-R7A, resultando valores de  $CE_{50}$  de 0.9, 0.7 y 2.5 respectivamente.



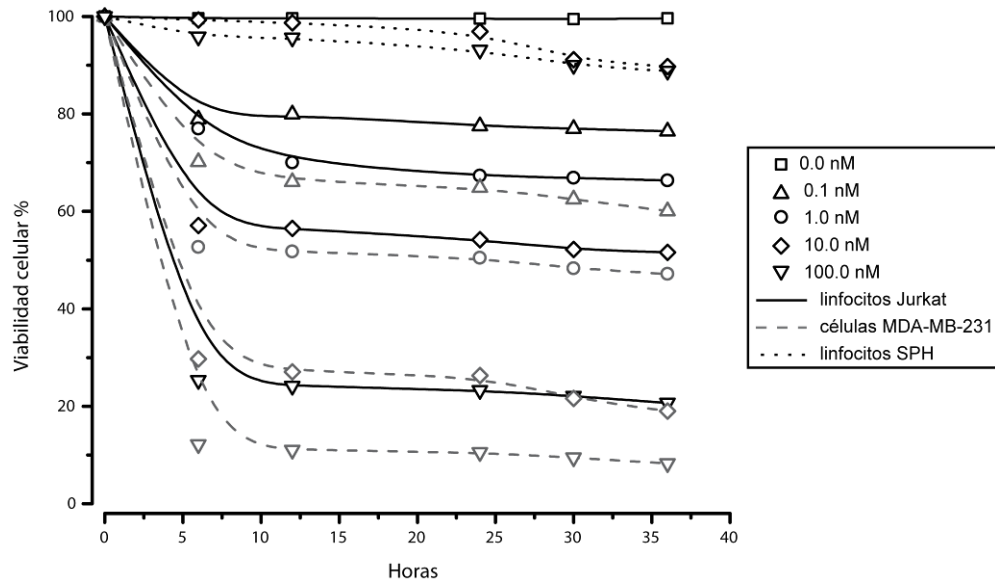
**Figura 6.13.** Actividad en células de cáncer de mama MDA-MB-231. Las tres toxinas muestran un comportamiento similar dependiente de la dosis y con una afectación importante a las primeras 6 horas de exposición. Los puntos que son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) al control correspondiente se señalan con un \*.

*Linfocitos de sangre periférica humana.* En estas células, todos los péptidos probados provocaron efecto dependiente de la dosis y del tiempo de exposición; sin embargo, la toxicidad fue baja (viabilidad entre 80–88 % a la concentración máxima y el mayor tiempo de exposición probado) en el intervalo de concentraciones estudiado, ver **figura 6.14**. Estos resultados concuerdan con lo esperado debido a la ausencia de canales KCa2.2 en este tipo de células, es decir, si la interacción de las toxinas con las células es preferentemente a través de los canales KCa2.2, células sin este tipo de canales se ven mínimamente afectadas por la presencia de los péptidos probados. Tal es el caso de los linfocitos SPH cuyo potencial de membrana está establecido por los canales de potasio dependientes de voltaje, activados por despolarización Kv1.3 y los canales de potasio dependientes de  $Ca^{2+}$  KCa3.1 [115]. En la **figura 6.15** se muestra el efecto de r-tamapina en los tres tipos de células probadas, se puede apreciar la similitud en el efecto que tiene sobre células con canales KCa2.2, mientras que el efecto es mínimo en linfocitos de SPH.



**Figura 6.14.** Actividad en linfocitos de SPH. La escala se muestra de 70 a 100% de viabilidad celular debido al bajo efecto que se tuvo en este tipo de células. Solo en los ensayos con apamina y GS-R7A se observa una clara dependencia de la dosis. Nótese que la escala del porcentaje de viabilidad celular es de 70 a 100%. Los puntos que son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) al control correspondiente se señalan con un \*.

Las  $CE_{50}$  tanto en células Jurkat como en MDA-MB-231 tuvieron valores en el rango nanomolar, siendo mayores en células Jurkat. La r-tamapina tiene una  $CE_{50}$  en células Jurkat aproximadamente 15 veces mayor que en células MDA-MB-231, lo que se debe a la diferente naturaleza de las líneas celulares, ya que la primera es una línea celular de linfocitos y la segunda de células de cáncer de mama, donde el papel de los canales KCa2.2 puede ser diferente. No obstante, en ambas líneas celulares la  $CE_{50}$  del péptido menos activo, que contiene la mutación R7A, es de la mitad de la  $CE_{50}$  del péptido nativo, de lo que se deduce que el efecto de las mutaciones se reproduce.

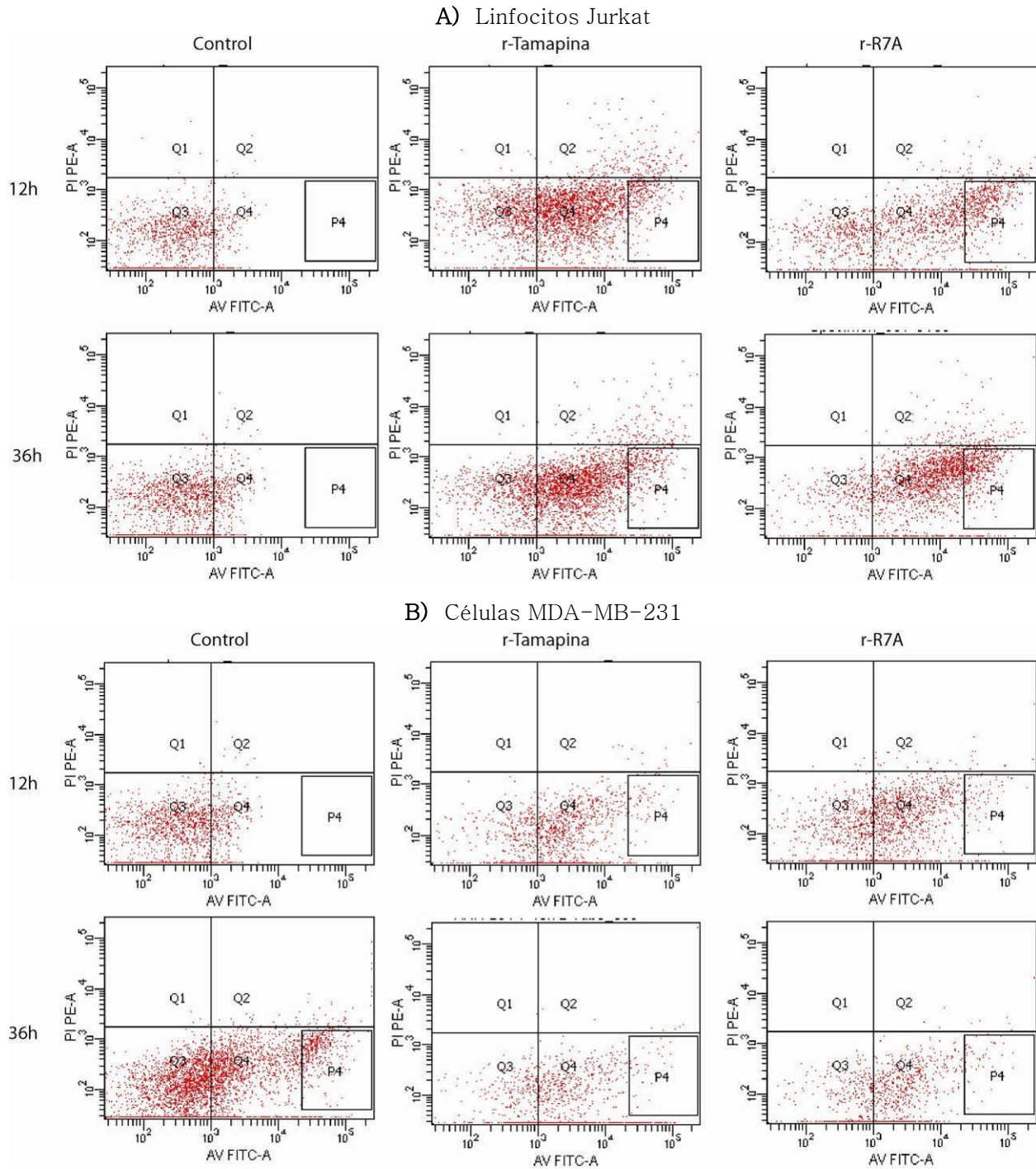


**Figura 6.15.** Actividad de r-tamapina en los tres tipos de células probadas. En esta gráfica se evidencia que el efecto en células Jurkat y MDA-MB-231 es similar, aunque para cada concentración probada la citotoxicidad es mayor en las células de cáncer de mama. El efecto en linfocitos de SPH es tan bajo que solo se graficaron las curvas de viabilidad a 10 y 100 nM.

## 6.5 Determinación de mecanismo de muerte celular

Para determinar el mecanismo de viabilidad, se probaron r-tamapina, r-R7A y apamina en células Jurkat y MDA-MB-231. Se probó la concentración de 100 nM a 12, 24 y 36 horas de exposición para todos los péptidos. En este experimento se usó yoduro de propidio y anexina V-FITC para diferenciar células necróticas de células apoptóticas. La anexina V es una proteína que se une selectivamente a una fosfatidilserina (PS), proteína que se encuentra en la cara interna de la membrana en células sanas. Durante apoptosis temprana, la asimetría de la membrana se pierde permitiendo la traslocación de PS a la cara externa. Entonces la anexina V, marcada con FITC, puede interactuar con la PS extracelular por lo que se usa para identificar específicamente células apoptóticas. Para ayudar a diferenciar células apoptóticas de las necróticas se usa el IP. Células sanas y apoptóticas tempranas excluyen PI, mientras que apoptóticas tardías y necróticas se tiñen positivamente debido al paso del colorante al núcleo, en donde se intercala en el ADN.

En los cultivos de células Jurkat E6-1 el péptido más activo fue la r-tamapina, aunque la apamina tuvo efecto similar, resultado consistente con los resultados de las pruebas de citotoxicidad. Los tres péptidos probados mostraron un mecanismo de muerte celular por apoptosis con 69.1%, 67.8% y 46.4% de células apoptóticas a las 36 horas para r-tamapina, apamina y r-R7A respectivamente. En el caso de los cultivos de células MDA-MB-231, también se determinó que el mecanismo es principalmente apoptótico, con porcentajes de apoptosis de 58.7, 57.7 y 53.8 para apamina, r-tamapina y r-R7A respectivamente. En la **figura 6.16** se muestran los diagramas de puntos resultantes para 12 y 36 horas de exposición a los péptidos. Se graficó la intensidad de fluorescencia de anexina V-FITC contra la intensidad de fluorescencia de IP, cada punto representa una célula medida. Se puede observar que las células tratadas con las toxinas presentan una mayor intensidad de fluorescencia de la anexina-V FITC que intensidad de IP, por lo que aparecen en el cuadrante Q4. Es importante señalar que, como se muestra en la **tabla 6.5**, en ningún caso hubo más de un 2.1% de células necróticas, que aparecen en el cuadrante Q1 de las gráficas de puntos, por lo que este mecanismo de muerte celular quedó descartado.



**Figura 6.16.** Diagramas de puntos de la citometría de los ensayos de citotoxicidad. A) linfocitos Jurkat. B) células MDA-MB-231. Los controles fueron realizados sin adición de toxina.

**Tabla 6.5.** Porcentaje de células en los diferentes cuadrantes de las gráficas de puntos del análisis citométrico

Células Jurkat												
Horas	Control			r-tamapina			r-R7A			Apamina		
	12	24	36	12	24	36	12	24	36	12	24	36
Q1 (necróticas)	1.1	0.8	1	0.4	0.2	0.9	2.1	0.1	0.5	0.1	1	0.3
Q2 (apoptóticas tardías)	1.1	0.9	1	4.3	8.1	9.5	4.7	3.3	3.8	6.7	14.9	8.6
Q3 (viables)	88.1	88.5	85.9	51	29	20.4	56.5	52.8	49.3	42.1	32.1	23.4
Q4 (apoptóticas)	9.7	9.7	12.1	44.3	62.7	69.1	36.7	43.8	46.4	51.1	52	67.8

Células MDA-MB-231												
Horas	Control			r-tamapina			r-R7A			Apamina		
	12	24	36	12	24	36	12	24	36	12	24	36
Q1 (necróticas)	0.7	0.4	0.4	0.2	0	0	0.1	0	0	0.1	0.1	0
Q2 (apoptóticas tardías)	1	1.3	1.5	33.4	33.7	31.6	27.9	31	34.9	29.5	42.1	25.6
Q3 (viables)	86.2	80.1	79.9	15.9	11.2	10.7	14.5	14.1	11.3	24.9	16.5	15.7
Q4 (apoptóticas)	12.1	18.3	18.2	50.4	55	57.7	57.5	54.9	53.8	45.5	41.3	58.7

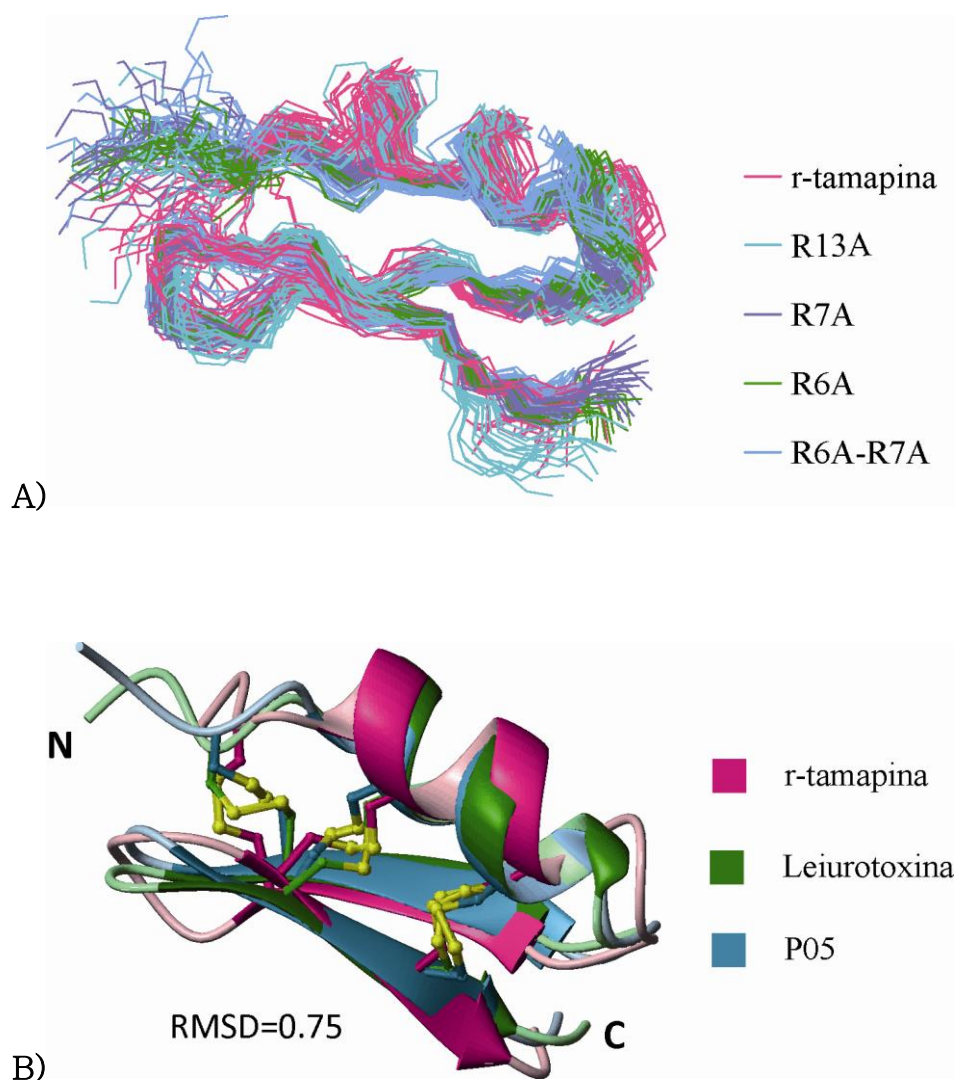


## 7 Discusión

A pesar de que el modelo publicado por Andreotti y colaboradores [2] predice la interacción de varios residuos de la tamapina con el canal KCa2.2, en este proyecto se decidió mutar sólo las argininas como una primera aproximación para el estudio de su actividad ya que son los residuos que contribuyen con un mayor número de contactos electrostáticos y puentes de hidrógeno en el modelo. Otro aminoácido que tiene efecto importante en la interacción con canales KCa2.2 es la lisina 20, ya que ancla a la toxina sobre el canal al introducirse en el poro e interaccionar con los residuos del filtro de selectividad. Este mecanismo se asemeja a la forma en que interacciona el residuo básico de la teoría de la diada funcional [116], la cual propone una toxina bloqueará canales de potasio activados por voltaje (Kv) si contiene un residuo de lisina y un residuo aromático separados por  $6.6 \pm 1.0$  Å. Sin embargo, ninguno de los residuos aromáticos de la tamapina se encuentra a la distancia propuesta por esta teoría, lo que podría explicar la falta de actividad de ésta toxina sobre canales Kv.

### 7.1 Análisis estructural

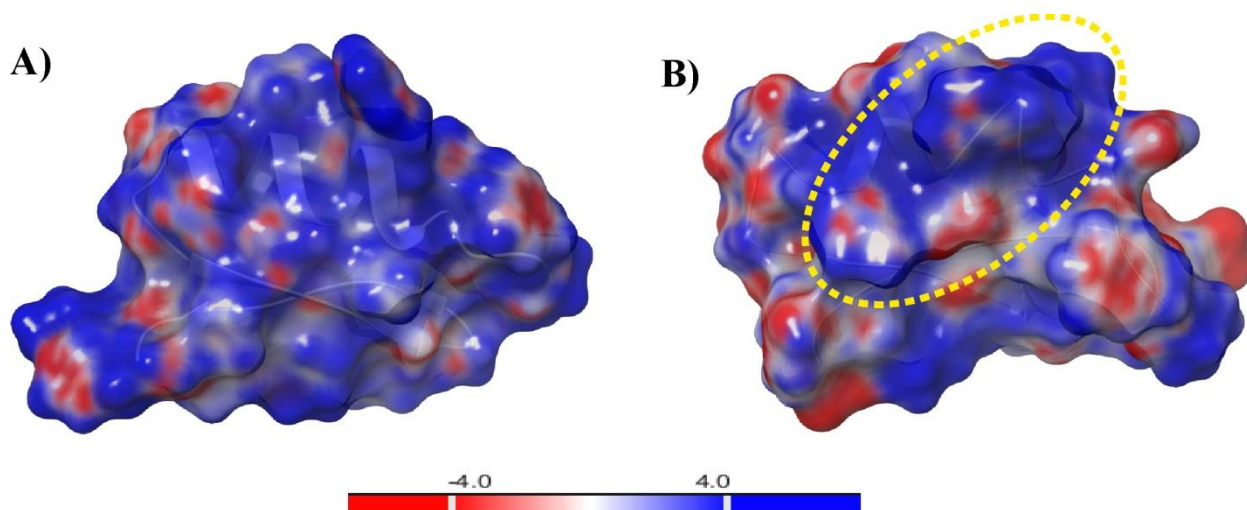
Como se describió en la sección anterior, las estructuras terciarias de la r-tamapina y todos los péptidos derivados que se obtuvieron en este proyecto coinciden con la estructura esperada para la familia  $\alpha$ KTx5. En la **figura 7.1A** se muestran los ensamblajes de cinco de los péptidos obtenidos. En esta figura se observan claramente las regiones con estructura bien definida, siendo la región amino terminal la de mayor dispersión. Como se esperaba, la mutación de residuos de arginina por alanina no provocó cambios en los elementos de estructura secundaria, ya que las cadenas laterales de alanina son relativamente cortas y no producen alguna interacción que desestabilice la formación de puentes de hidrógeno de la cadena principal que estabilizan la hélice alfa. La sobreposición de r-tamapina con leiurotoxina y P05, dos miembros de la familia  $\alpha$ KTx5, se muestra en la **figura 7.1B**. Se observan claramente tanto la similitud en estructura tridimensional, como en la posición de los enlaces disulfuro.



**Figura 7.1.** A) Alineamiento de los ensambles de las estructuras determinadas para algunas de las toxinas obtenidos en este estudio. Se presentan en líneas los esqueletos principales de cada estructura. B) Sobre posición de las estructuras de menor energía de los ensambles de r-tamapina, leiuoroxina y P05, tres miembros de la subfamilia  $\alpha$ KTx5.

Considerando la estructura altamente conservada en la familia  $\alpha$ KTx5, las diferencias en actividad y sobre todo en la selectividad de las toxinas de esta familia pueden deberse a la constitución de aminoácidos. La leiuoroxina es la toxina de la familia  $\alpha$ KTx5 que guarda una mayor identidad con la tamapina (74%); sin embargo, tiene una menor selectividad al bloqueo de canales KCa2.2. En la **figura 7.2** se muestran las superficies de potencial electrostático de leiuoroxina y tamapina para buscar las posibles causas de ésta diferencia de selectividad. La primera presenta una densidad de carga positiva en toda la región que se ha propuesto como zona de interacción con canales KCa2.2 y KCa2.3, mientras que la tamapina presenta una

superficie positiva menos amplia y más centrada alrededor de los residuos de arginina 6, 7 y 13 señalados, el área señalada en el ovalo amarillo. Ésta sutil diferencia en la superficie de potencial puede permitir que la interacción entre tamapina y el canal KCa2.2 esté dominada por la distribución de carga positiva en una región más reducida de la toxina.

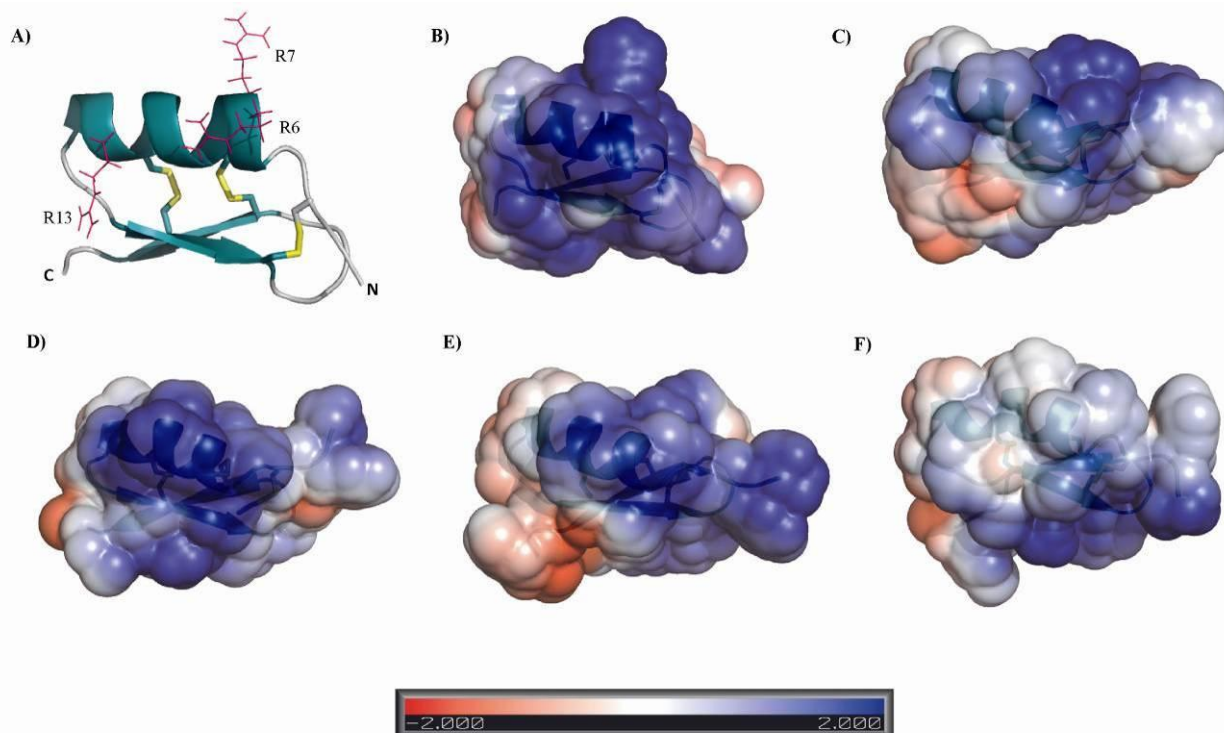


**Figura 7.2.** Superficies de potencial electrostático de A) Leiurotoxina y B) r-tamapina. Con una línea punteada se señala la región de las cadenas laterales de Arg 6, 7 y 13 de r-tamapina. Figura hecha en Maestro versión 9.9.

## 7.2 Relación Estructura–Actividad

En este proyecto, la selección del modelo *in vitro* empleado se basó en dos hechos. En primer lugar, el bloqueo de canales por toxinas reduce la proliferación en varias líneas celulares de cáncer [117]; por ejemplo, el bloqueo de canales KCa produce inhibición del crecimiento en células de melanoma humano [88]. El mecanismo por el cual se presume que los canales iónicos establecen el ciclo celular aún está en discusión, pero se cree que puede estar relacionado con la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ . En células Jurkat, el bloqueo de canales KCa2.2 causa la despolarización de la membrana e inhibe la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . En segundo lugar, la selección del modelo *in vitro* se basó en que los linfocitos T Jurkat expresan constitutivamente dos tipos de canales de potasio, uno dependiente de voltaje (Kv1.3) y uno de baja conductancia activado por  $\text{Ca}^{2+}$ , el KCa2.2, que también se encuentra en la línea de cáncer de mama MDA-MB-231 [4]. Por lo anterior, estas dos líneas celulares son buenos modelos para probar la toxicidad de los péptidos debida al bloqueo de canales KCa2.2.

Las pruebas en la línea celular de linfocitos T Jurkat mostraron que la toxicidad de todos los péptidos es fuertemente dependiente de la concentración y tiende a aumentar con el incremento en la carga total del péptido. Los ensayos se realizaron a pH 7, por lo que los residuos de arginina deben estar cargados positivamente. En estas condiciones, la carga total de r-tamapina es de 2+, mientras que los péptidos con una mutación por alanina deben tener carga total de 1+ y el péptido con doble mutación r-R7A/R6A tiene carga total de cero. Péptidos con carga similar, tienen ligeras diferencias en su actividad tóxica. Por ejemplo, r-R6A y r-R13A, tienen valores de CE<sub>50</sub> de 18.2 nM y 19.7 nM respectivamente, mientras que r-tamapina cuya carga total es de 2+, tiene un CE<sub>50</sub> de 13.6 nM, y r-R6A/R7A que es neutra en las condiciones experimentales, tiene un CE<sub>50</sub> de 23.6 nM. Estas diferencias sugieren que el mecanismo responsable de la toxicidad de los péptidos en las células Jurkat está determinado por interacciones electrostáticas y posiblemente interacciones específicas. Para apoyar esta idea, se calcularon las superficies de potencial electrostático de todos los péptidos probados. Estos mapas mostraron diferencias de carga sustanciales dependiendo de las mutaciones. En la **figura 7.3** se puede observar que los péptidos r-R6A y r-R13A muestran una zona reducida de superficie de potencial cargada positivamente en comparación con la ampliamente distribuida superficie positiva que muestra la superficie de potencial de r-tamapina en la posible zona de interacción. La doble mutante r-R6A/R7A muestra una superficie mínimamente cargada en esta misma zona. Sorpresivamente, la actividad de este péptido es similar a la del péptido nativo y mayor a la actividad de GS-R7A. A pesar de que éste es un péptido neutro, tiene una distribución electrónica heterogénea, como se puede observar en la **figura 7.3F**, que lo hace ser muy soluble. Otro dato interesante es que ésta doble mutante fue la que mejor rendimiento tuvo al expresarse en *E. coli*, lo que puede explicarse por la falta de carga, la cual podría minimizar el efecto tóxico sobre las bacterias y favorecer niveles de expresión superiores a los de las toxinas cargadas.



**Figura 7.3.** A) Representación en listones de r-tamapina, las cadenas laterales de los residuos de arginina 6, 7 y 13 se presentan en líneas de color rosa y los enlaces disulfuro en color amarillo. Las superficies de potencial electrostático de r-tamapina B), r-R6A C), r-R7A D), r-R13A E) y r-R6A/R7A F) se muestran en la misma pose que r-tamapina en el panel A) para evidenciar la modificación en carga superficial de la región de la hélice  $\alpha$ .

Las estructuras tridimensionales de todos los péptidos estudiados son superponibles, como se muestra en la **figura 7.1A**, por lo que aún en los péptidos mutados, las cadenas laterales que circundan la supuesta zona de interacción están expuestas al disolvente. Es importante resaltar que las mutaciones por alanina que se introdujeron no producen ningún impedimento estérico para la interacción con aminoácidos en las zonas cercanas; por lo tanto, si la interacción con la célula no está directamente relacionada con los residuos mutados, dichas mutaciones afectarán mínimamente en la toxicidad de los péptidos, tal como se observa en los resultados.

En contraste, los ensayos en linfocitos SPH mostraron una baja toxicidad de los péptidos. Las curvas de viabilidad en linfocitos SPH (ver **figura 6.13**) mostraron que la toxicidad de los péptidos tiene un mínimo efecto con el tiempo. En estos ensayos sólo GS-R7A presentó una toxicidad con ligera dependencia de la concentración. Este péptido tiene la mayor actividad en linfocitos SPH (80% de viabilidad a 100 nM). No existe correlación entre la carga total del péptido y su actividad; por ejemplo, GS-R7A, con carga 1+ presentó mayor toxicidad que los péptidos doblemente cargados r-tamapina y GS-tamapina. Adicionalmente, la apamina reveló una

baja toxicidad y un comportamiento similar comparado con los péptidos derivados de tamapina. Todos estos resultados evidencian la falta de correlación entre la carga y la actividad, lo que sugiere que existe una mínima interacción electrostática entre toxinas y células de linfocitos SPH. La baja actividad que mostraron los péptidos imposibilitó la determinación de  $CE_{50}$  en estas células.

Los valores de  $CE_{50}$  de la apamina tanto en células Jurkat como en MDA-MB-231 son muy cercanos a los valores de r-tamapina, las curvas de viabilidad de ambas toxinas muestran un comportamiento similar en dichas líneas celulares, además de que ambas toxinas producen muerte celular por apoptosis, estas evidencias sugieren que ambas toxinas actúan a través de un mecanismo similar. En reportes previos se ha demostrado que la apamina actúa sobre los canales KCa2.2 interactuando con el segmento extracelular desestructurado S3-S4 y la región extracelular del poro de una subunidad adyacente [118]; sin embargo, el mecanismo exacto de interacción para tamapina no ha sido detallado. Se ha propuesto que el mecanismo de interacción tamapina-canal se da mediante un bloqueo simple del poro [13]. Similitudes en los resultados utilizando dos líneas celulares diferentes que expresan canales KCa2.2 permite proponer que el mecanismo de toxicidad involucra la interacción de las toxinas con esta macromolécula. En contraste a los péptidos con mutaciones del tipo RXA, los GS-péptidos presentaron menor actividad que sus análogos sin residuos adicionales; lo que sugiere que una región amino terminal más larga puede causar dificultades en la interacción con las células. Los resultados sugieren que la toxicidad de la tamapina es debida a la estructura global de la toxina más que a interacciones específicas entre los residuos de argininas y la célula. Sin embargo, la comparación realizada entre células que expresan canales KCa2.2 y células que no los expresan, permitió determinar que las últimas se ven poco afectadas por las toxinas probadas. Estos resultados permiten proponer que la toxicidad tanto de r-tamapina como de sus péptidos derivados es específica a células con canales KCa2.2. En estudios previos se ha demostrado que el bloqueo de canales KCa2.2 produce despolarización del potencial de membrana en células Jurkat, teniendo como consecuencia una disminución de la entrada de calcio extracelular [3]. Es posible que esta modificación en la entrada de  $Ca^{2+}$  desencadene una o varias cadenas de señalización que desemboquen en apoptosis celular tanto en células Jurkat como en células MDA-MB-231. Para comprobar la explicación previa, es necesario realizar más estudios.

## 8 Conclusiones

La determinación estructural de la r-tamapina por RMN mostró que contiene un motivo CS- $\alpha/\beta$  característico de las toxinas  $\alpha$ . El análisis del plegamiento y la conectividad de enlaces disulfuro permitió establecer que la estructura de la toxina recombinante corresponde al de la familia  $\alpha$ KTx5. La comparación de las estructuras de las toxinas Leiurotoxina y P05 con la tamapina confirma el plegamiento establecido para esta subfamilia de toxinas.

Todos los péptidos derivados conservan las características estructurales de la r-tamapina, por lo que se concluye que los residuos mutados Arg6, Arg7 y Arg13 no son residuos esenciales para el plegamiento de esta toxina.

Los resultados de espectrometría de masas aunados a la asignación de señales nOe de H $\beta$ s de cisteínas, fueron evidencia suficiente para determinar inequívocamente la conectividad de los enlaces disulfuro de las toxinas estudiadas.

Aunque las mutaciones realizadas no modifican el plegamiento de la r-tamapina, la distribución de densidad electrónica en la superficie cambia, principalmente en la doble mutante.

Los péptidos estudiados mostraron citotoxicidad con valores de CE<sub>50</sub> del orden nanomolar en células Jurkat y MDA-MB-231 las cuales expresan constitutivamente canales KCa2.2, mientras que no tuvieron efecto importante en linfocitos de sangre periférica humana, los cuales no expresan canales KCa2.2. Estos resultados son evidencia del alto potencial farmacológico de la tamapina como inhibidor de la proliferación de células que expresan canales KCa2.2 sin afectar células que no los contienen.

Las pruebas de citometría usando anexina V-FITC/IP sugieren fuertemente que los péptidos estudiados provocan apoptosis como mecanismo de muerte celular en células Jurkat y MDA-MB-231.

El efecto tóxico de la r-tamapina y los péptidos derivados es parecido al efecto de apamina en las líneas celulares probadas, por lo que se concluye que actúan mediante un mecanismo similar. El cual puede involucrar el bloqueo de canales KCa2.2.

Los péptidos con mutaciones por alanina en los residuos Arg6, Arg7 y Arg13 mostraron efecto citotóxico similar al de la toxina con secuencia nativa, por lo que se concluye que estos residuos no son esenciales para esta actividad. Sin embargo, el aumento de CE<sub>50</sub> observado en ambas

líneas celulares, Jurkat y MDA-MB-231 al mutar estos residuos, sugiere que dichos residuos están involucrados en el mecanismo de acción.



## 9 Referencias

- [1] Pedarzani, P., Dhoedt, D., Doorty, K. B., Wadsworth, J. D. F., Jhosep, J. S., Jeyaseelan, K., Kini, R. M., Gadre, S. V., Sapatnekar, S. M., Stocker, M., Strong, P. N. (2002) Tamapin, a venom peptide from the Indian red scorpion (*Mesobuthus tamulus*) that targets small conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels and afterhyperpolarization currents in central neurons. *J. Biol. Chem.* 277(48), 46101-46109.
- [2] Andreotti, N., di-Luccio, E., Sampieri, F., Waard, M., Sabatier, J. M. (2005) Molecular modeling and docking simulations of scorpion toxins and related analogs on human SKCa2 and SKCa3 channels. *Peptides.* 26(7), 1095-1108.
- [3] Jäger, H., Adelman, J. P., Grissmer, S. (2000) SK2 encodes the apamin-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels in the human leukemic T cell line, Jurkat. *FEBS Lett.* 469(2-3), 196-202.
- [4] Potier, M., Joulin, V., Roger, S., Besson, P., Jourdan, M.-L., LeGuennec, J.-Y., Bougnoux, P., Vandier, C. (2006) Identification of SK3 channel as a new mediator of breast cancer cell migration. *Mol. Cancer Ther.* 5(11), 2946-2953.
- [5] Hoffman A. (1993) El Maravilloso Mundo de los Arácnidos. Fondo de Cultura Económica: La Ciencia desde México. México D.F.
- [6] Cracraft J., Donoghue M. J. eds. (2004) Assembling the Tree of Life. Oxford University Press.
- [7] Carboney A., Jasso Villazul C. E. (2012) Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Intoxicación por Picadura de Alacrán. Secretaría de Salud, México.
- [8] Anuarios de morbilidad de la Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología. <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html> consultado en julio de 2015.
- [9] Ma Y., Zhao R., He Y., Li S., Liu J., Wu Y., Cao Z., Li W. (2009) Transcriptome analysis of the venom gland of the scorpion *Scorpiops jendeki*: implication for the evolution of the scorpion venom arsenal. *BMC Genomics.* 10, 290.
- [10] Possani L.D., Alagón A. C., Fletcher P. L., Erickson B. W. (1997) Purification and Properties of Mammalian Toxins from the Venom of the Brazilian Scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. *Arch. Biochem. Biophys.* 180(2), 394-403.
- [11] Rodríguez de la Vega R. C., Schwartz E. F., Possani L. D. (2010) Mining on scorpion venom biodiversity. *Toxicon.* 56(7), 1155-1161.
- [12] <http://www.uniprot.org> Consultado en junio de 2015.
- [13] Rodríguez de la Vega R. C., Merino E., Becerril B., Possani L.D. (2003) Novel interactions between  $\text{K}^+$  channels and scorpion toxins. *Trends Pharmacol. Sci.* 24(5), 222-227.
- [14] Quintero-Hernández V., Jiménez-Vargas J. M., Gurrola G. B., Valdivia H. H., Possani L. D. (2013) Scorpion venom components that affect ion-channels function. *Toxicon.* 76, 328-342.
- [15] Tytgat J., Chandy K. G., Garcia M. L., Gutman G. A., Martin-Eauclaire M. F., van der Walt J. J., Possani, L. D. (1999) A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms.  $\alpha$ -KTx molecular subfamilies. *Trends Pharmacol. Sci.* 20(11), 444-447.

- [16] Kumar G. S., Sarma S. P. (2010) Cloning, overexpression, folding and purification of a biosynthetically derived three disulfide scorpion toxin (BTK-2) from *Mesobuthus tamulus*. *Protein Expr. Purif.* 70(2), 137-142.
- [17] Diego-García E., Abdel-Mottaleb Y., Schwartz E. F., Rodríguez de la Vega R. C., Tytgat J., Possani L. D. (2008) Cytolytic and K<sup>+</sup> channel blocking activities of beta-KTx and scorpine-like peptides purified from scorpion venoms. *Cell Mol. Life Sci.* 65(1), 187-200.
- [18] Srinivasan K. N., Sivaraja V., Huys I., Sasaki T., Cheng B., Kumar T. K., Sato K., Tytgat J., Yu C., San B. C., Ranganathan S., Bowie H. J., Kini R. M., Gopalakrishnakone P. (2002) kappa-Hefutoxin1, a novel toxin from the scorpion *Heterometrus fulvipes* with unique structure and function. Importance of the functional diad in potassium channel selectivity. *J. Biol. Chem.* 277(33), 30040-30047.
- [19] Saucedo A. L., Flores-Solis D., Rodríguez de la Vega R. C., Ramírez-Cordero B., Hernández-López R., Cano-Sánchez P., Noriega Navarro R., García-Valdés J., Coronas-Valderrama F., de Roodt A., Brieba L. G., Possani L. D., del Río-Portilla F. (2012) New tricks of an old pattern: structural versatility of scorpion toxins with common cysteine spacing. *J. Biol. Chem.* 287(15), 12321-12330.
- [20] King G. F., Gentz M. C., Escoubas P., Nicholson G. M. (2008) A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals. *Toxicon.* 52(2), 264-276.
- [21] Wu, J. J., He, L. L., Zhou, Z., Chi., C. W. (2002) Gene expression, mutation, and structure-function relationship of scorpion toxin BmP05 active on SKCa channels. *Biochemistry.* 41(8), 2844-2849.
- [22] Weatherall, K. L., Goodchild, S. J., Jane, D. E., Marrion, N.V. (2010) Small conductance calcium-activated potassium channels: From structure to function. *Prog. Neurobiol.* 91(3), 242-255.
- [23] Pedarzani, P., Stocker, M. (2008) Molecular and cellular basis of small and intermediate-conductance, calcium-activated potassium channel function in the brain. *Cell Mol. Life Sci.* 65(20), 3196-3217.
- [24] Schlichter L. C., Kaushal V., Moxon-Emre I., Sivagnanam V., Vincent C. (2010) The Ca<sup>2+</sup> activated SK3 channel is expressed in microglia in the rat striatum and contributes to microglia-mediated neurotoxicity in vitro. *J. Neuroinflammation.* 7, 4.
- [25] Siddiqui T., Lively S., Ferreira R., Wong R., Schlichter L. C. (2014) Expression and contributions of TRPM7 and KCa2.3/SK3 channels to the increased migration and invasion of microglia in anti-inflammatory activation states. *PLoS One.* 9(8), e106087.
- [26] Hübner C. A., Jentsch T. J. (2002) Ion channel diseases. *Hum. Mol. Genet.* 11 (20), 2435-2445.
- [27] Grunnet M., Strøbæk D., Hougaard C., Christophersen P. (2014) Kv7 channels as targets for anti-epileptic and psychiatric drug-development. *Eur. J. Pharmacol.* 726, 133-137.
- [28] Shah N. H., Aizenman E. (2014) Voltage-gated potassium channels at the crossroads of neuronal function, ischemic tolerance, and neurodegeneration. *Transl. Stroke Res.* 5(1), 38-58.
- [29] Schmitt N., Grunnet M., Olesen S. P. (2014) Cardiac potassium channel subtypes: new roles in repolarization and arrhythmia. *Physiol. Rev.* 94(2), 609-653.

- [30] Luján R., Marron Fernandez de Velasco E., Aguado C., Wickman K. (2014) New insights into the therapeutic potential of Girk channels. *Trends Neurosci.* 37(1), 20–29.
- [31] Leanza L., Biasutto L., Managò A., Gulbins E., Zoratti M., Szabò I. (2013) Intracellular ion channels and cancer. *Front. Physiol.* 4, 227.
- [32] Pardo L.A., Stühmer W. (2014) The roles of K<sup>+</sup> channels in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 14(1), 39–48.
- [33] Wong H. K., Bauer P. O., Kurosawa M., Goswami A., Washizu C., Machida Y., Tosaki A., Yamada M., Knöpfel T., Nakamura T., Nukina N. (2008) Blocking acid-sensing ion channel 1 alleviates Huntington's disease pathology via an ubiquitin-proteasome system-dependent mechanism. *Hum. Mol. Genet.* 17(20), 3223–3235.
- [34] Tsantoulas C., McMahon S.B. (2014) Opening paths to novel analgesics: the role of potassium channels in chronic pain. *Trends Neurosci.* 37(3), 146–158.
- [35] Gutman G. A., Chandy K. G., Grissmer S., Lazdunski M., McKinnon D., Pardo L. A., Robertson G. A., Rudy B., Sanguinetti M. C., Stühmer W., Wang X. (2005) International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol. Rev.* 57(4), 473–508.
- [36] Pardo, L. A., Stühmer, W. (2014) The roles of K<sup>+</sup> channels in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 14, 39–48.
- [37] Choe S. (2002) Potassium channel structures. *Nat. Rev. Neuroscience.* 3, 115–121.
- [38] Heginbotham L., Lu Z., Abramson T., MacKinnon R. (1994) Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence. *Biophys. J.* 66(4), 1061–1067.
- [39] Doyle D. A., Morais Cabral J., Pfuetzner R. A., Kuo A., Gulbis J. M., Cohen S. L., Chait B. T., MacKinnon R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science.* 280(5360), 69–77.
- [40] Furini S., Domene C. (2013) K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> Conduction in selective and nonselective ion channels via Molecular Dynamics simulations. *Biophys. J.* 105(8), 1737–1745.
- [41] Bernèche S., Roux B. (2000) Molecular Dynamics of the KcsA K<sup>+</sup> channel in a bilayer membrane. *Biophys. J.* 78(6), 2900–2917.
- [42] Shrivastava I. H., Sansom M. S. P. (2000) Simulations of ion permeation through a potassium channel: molecular dynamics of KcsA in a phospholipid bilayer. *Biophys. J.* 78(2), 557–570.
- [43] Allen T. W., Bliznyuk A., Rendell A. P., Kuyucak S., Chung S.-H. (2000) The potassium channel: Structure, selectivity and diffusion. *J. Chem. Phys.* 112, 8191–8204.
- [44] Aqvist J., Luzhkov V. (2000) Ion permeation mechanism of the potassium channel. *Nature.* 414(6780), 881–884.
- [45] Bernèche S., Roux B. (2001) Energetics of ion conduction through the K<sup>+</sup> channel. *Nature.* 414(6859), 73–77.
- [46] Ando H., Kuno M., Shimizu H., Muramatsu I., Oiki S. (2005) Coupled K<sup>+</sup>-water flux through the HERG potassium channel measured by an osmotic pulse method. *J. Gen. Physiol.* 126(5), 529–538.

- [47] Iwamoto M., Oiki S. (2011) Counting ion and water molecules in a streaming file through the open-filter structure of the K channel. *J. Neurosci.* 31(34), 12180–12188.
- [48] Marty A. (1981) Ca-dependent K channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature.* 291(5815), 497–500.
- [49] Pallota B. S., Magleby K. L., Barrett J. N. (1981) Single channel recordings of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  currents in rat muscle cell culture. *Nature.* 293(5832), 471–474.
- [50] Kohler M., Hirschberg B., Bond C. T., Kinzie J. M., Marrion N. V., Maylie J., Adelman J. P. (1996) Small conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science.* 273(5282), 1709–1714.
- [51] Joiner W. J., Wang L. Y., Tang M. D., Kaczmarek L. K. (1997) hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94(20), 11013–11018.
- [52] Logsdon N. J., Kang J., Togo J. A., Christian E. P., Aiyar J. (1997) A novel gene, hKCa4, encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 272(52), 32723–32726.
- [53] Ishii T. M., Silvia C., Hirschberg B., Bond C. T., Adelman J. P., Maylie J. (1997) A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 11651–11656.
- [54] Hirschberg B., Maylie J., Adelman J. P., Marrion N. V. (1998) Gating of recombinant small-conductance Ca-activated  $\text{K}^+$  channels by calcium. *J. Gen. Physiol.* 111(4), 565–581.
- [55] Xia X. M., Fakler B., Rivard A., Wayman G., Johnson-Pais T., Keen J. E., Ishii T., Hirschberg B., Bond C. T., Lutsenko S., Maylie J., Adelman J. P. (1998) Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature.* 395(6701), 503–507.
- [56] Keen J. E., Khawaled R., Farrens D. L., Neelands T., Rivard A., Bond C. T., Janowsky A., Fakler B., Adelman J.P., Maylie J. (1999) Domains responsible for constitutive and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent interactions between calmodulin and small-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated potassium channels. *J. Neurosci.* 19(20), 8830–8838.
- [57] Fanger C. M., Ghanshani S., Logsdon N. J., Rauer H., Kalman K., Zhou J., Beckingham K., Chandy K. G., Cahalan M. D., Aiyar J. (1999) Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance KCa channel, IKCa1. *J. Biol. Chem.* 274(9), 5746–5754.
- [58] Schumacher M. A., Rivard A. F., Bachinger H. P., Adelman J. P. (2001) Structure of the gating domain of a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel complex with  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin. *Nature.* 410(6832), 1120–1124.
- [59] Shah M., Haylett D. G. (2000) The pharmacology of hSK1  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels expressed in mammalian cell lines. *Br. J. Pharmacol.* 129(4), 627–630.
- [60] Benton D. C., Monaghan A. S., Hosseini R., Bahia P. K., Haylett D. G., Moss G. W. (2003) Small conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels formed by de expression of rat SK1 and SK2 genes in HEK293 cells. *J. Physiol.* 553(1), 13–19.

- [61] Monaghan A. S., Benton D. C., Bahia P. K., Hosseini R., Shah Y. A., Haylett D. G., Moss G. W. (2004) The SK3 subunit of small conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels interacts with both SK1 and SK2 subunits in a heterologous expression system. *J. Biol. Chem.* 279(2), 1003-1009.
- [62] Grunnet M., Jensen B. S., Olesen S. P., Klaerke D. A. (2001) Apamin interacts with all subtypes of cloned small-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels. *Plüg. Arch.* 441(4), 544-550.
- [63] Strobaek D., Hougaard C., Johansen T. H., Sorensen U. S., Nielsen E. O., Nielsen K. S., Taylor R. D., Pedarzani P., Christophersen P. (2006) Inhibitory gating modulation of small conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels by the synthetic compound (R)-N-(benzimidazol-2-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthylamine (NS8593) reduces afterhyperpolarizing current hippocampal CA1 neurons. *Mol. Pharmacol.* 70(5), 1771-1782.
- [64] Dreixler J. C., Bian J., Cao Y., Roberts J. D., Houamed K. M. (2000) Block of rat brain recombinant SK channels by tricyclic antidepressants and related compounds. *Eur. J. Pharmacol.* 401(1), 1-7.
- [65] Terstappen G. C., Paula G., Carignani C., Chen M. X., Roncarati R. (2001) Pharmacological characterization of the human small conductance calcium-activated potassium channel hSK3 reveals sensitivity to tricyclic antidepressants and antipsychotic phenothiazines. *Neuropharmacology.* 40(6), 772-783.
- [66] Terstappen G. C., Pellacani A., Aldegheri L., Graziani F., Carignani C., Paula G., Virginio C. (2003) The antidepressant fluoxetine blocks the human small conductance calcium-activated potassium channels SK1, SK2 and SK3. *Neurosci. Lett.* 346(1-2), 85-88.
- [67] Devor D. C., Singh A. K., Frizell R. A., Bridges T. J. (1996) Modulation of  $\text{Cl}^-$  secretion by benzimidazolones. 1. Direct activation of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  channel. *Am. J. Physiol.* 271(5 pt 1), L775-L784.
- [68] Pedersen K. A., Schroder R. L., Skaaning-Jensen B., Strobaek D., Olesen S. P., Christophersen P. (1999) Activation of the human intermediate-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel by 1-ethyl-2-benzimidazolinone is strongly  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent *Biochim. Biophys. Acta* 1420(1-2), 231-240.
- [69] Cao Y., Dreixler J. C., Roizen D. J., Roberts J. D., Houamed K. M. (2001) Modulation of recombinant small conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels by the muscle relaxant chlorzoxazone and structurally related compounds. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296(3), 683-639.
- [70] Pedarzani P., Mosbacher J., Rivard A., Cingolani L. A., Oliver D., Stocker M., Adelman J. P., Fakler B. (2001) Control of electrical activity in central neurons by modulating the gating of small conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels. *J. Biol. Chem.* 276(13), 9762-9769.
- [71] Hougaard C., Eriksen B. L., Jorgensen S., Johansen T. H., Dyhring T. (2007) Selective positive modulation of the SK3 and SK2 subtypes of small conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels. *Br. J. Pharmacol.* 151(5), 655-665.
- [72] Nolting A., Ferraro T., D'hoedt D., Stocker M. (2007) An amino acid outside the pore region influences apamin sensitivity in small conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels. *J. Biol. Chem.* 282(6), 3478-3486.

- [73] Bretschneider F., Wrisch A., Lehmann-Horn F., Grissmer S. (1999) External tetraethylammonium as a molecular caliper for sensing the shape of the outer vestibule of potassium channels. *Biophys. J.* 76(5), 2351-2360.
- [74] Lamy C., Goodchild S. J., Weatherall K. L., Jane D. E., Liegeois J. F., Seutin V., Marrion N. V. (2010) Allosteric block of  $K_{Ca2}$  channels by apamin. *J. Biol. Chem.* 285(35), 27067-27077.
- [75] Shakkottai, V. G., Regayas, I., Wulff, H., Fajloun, Z., Tomita, H., Fathallah, M., Cahalan, M. D., Gargus, J. J., Sabatier, J. M., Chandy, K. G. (2001) Design and characterization of a highly selective peptide inhibitor of the small conductance calcium-activated  $K^+$  channel,  $SkCa2$ . *J. Biol. Chem.* 276(46), 43154-43151.
- [76] Jiang Y., Lee A., Chen J., Cadene M., Chait B. T., MacKinnon R. (2002) Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature.* 417(6888), 515-522.
- [77] Long S. B., Campbell E. B., Mackinnon R. (2005) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family  $K^+$  channel. *Science.* 309(5736), 897-903.
- [78] Long S. B., Campbell E. B., Mackinnon R. (2005) Voltage sensor of  $Kv1.2$ : structural basis of electromechanical coupling. *Science.* 309(5736), 903-908.
- [79] Bruening-Wright A., Lee W. S., Adelman J. P., Maylie J. (2007) Evidence for a deep pore activation gate in small conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels. *J. Gen. Physiol.* 130(6), 601-610.
- [80] Sabatier, J. M., Zerrouk, H., Darbon, H., Mabrouk, K., Benslimane, A., Rochat, H., Martin-Euclaire, M. F., Van Rietschoten, J. (1993) P05, a new leiurotoxin I-like scorpion toxin: synthesis and structure-activity relationship of the alpha-amidated analog, a ligand of  $Ca^{2+}$  activated  $K^+$  channels with increased affinity. *Biochemistry.* 32(11), 2763-2770
- [81] Sabatier J. M., Fremont V., Mabrouk K., Crest M., Darbon H., Rochat H., Van Rietschoten J., Martin-Euclaire M. F. (1994) Leiurotoxin I, a scorpion toxin specific for  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels. Structure-activity analysis using synthetic analogs. *Int. J. Pept. Protein Res.* 43(5), 486-495.
- [82] Prevarskaya N., Skryma R., Shuba Y. (2010) Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends Mol. Med.* 16(3), 107-121.
- [83] Wonderlin W. F., Strobl J. S. (1996) Potassium channels, proliferation and G1 progression. *J. Membr. Biol.* 154(2), 91-107.
- [84] Marino A. A., Iliev I. G., Schwalke M. A., Gonzalez E., Marler K. C., Flanagan C.A. (1994) Association between cell membrane potential and breast cancer. *Tumour Biol.* 15(2), 82-89.
- [85] Desai, R., Peretz, A., Idelson, H., Lazarovici, P., Attali, B. (2000)  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels in human leukemic Jurkat T cells. Molecular cloning, biochemical and functional characterization. *J. Biol. Chem.* 275(51), 39954-39963.
- [86] Carignani C., Roncarati R., Rimini R., Terstappen G. C. (2002) Pharmacological and molecular characterisation of SK3 channels in the TE671 human medulloblastoma cell line. *Brain Res.* 939(1-2), 11-18.

- [87] Chantome A., Girault A., Potier M., Collin C., Vaudin P., Pagès J. C., Vandier C., Joulin V. (2009) KCa<sub>2.3</sub> channel-dependent hyperpolarization increases melanoma cell motility. *Exp. Cell Res.* 315(20), 3620–3360.
- [88] Tajima, N., Schönherr, K., Niedling, S., Kaatz, M., Kanno, H., Schönherr, R., Heinemann, S. H. (2006) Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in human melanoma cells are up-regulated by hypoxia involving hypoxia-inducible factor -1 $\alpha$  and the von Hippel-Lindau protein. *J. Physiol.* 571(2), 349–359.
- [89] Weaver A. K., Bomben V. C., Sontheimer H. (2006) Expression and function of calcium-activated potassium channels in human glioma cells. *Glia.* 54(3), 223–233.
- [90] Abdullaev I. F., Rudkouskaya A., Mongin A. A., Kuo Y. H. (2010) Calcium activated potassium channels BK and KI are functionally expressed in human gliomas but do not regulate cell proliferation. *PLoS One.* 5(8), e12304.
- [91] Fanger, C., Rauer, H., Neben, A. L., Miller, M. J., Rauer, H., Wulff, H., Campos, J., Ganellin, C. R., Chandy, K. G., Calahan, M. D. (2001) Calcium-activated potassium channels sustain calcium signaling in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 276(15), 12249–12256.
- [92] Lewis R. S., Cahalan M. D. (1995) Potassium and calcium channels in lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 13, 623–653.
- [93] Fomina A. F., Fanger C. M., Kozak J. A., Cahalan M. D. (2000) Single channel properties and regulated expression of Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> (CRAC) channels in human T cells. *J. Cell Biol.* 150(6), 1435–1444.
- [94] del Río-Portilla F., Ramírez-Cordero B. E. (2008) en *Advances in protein physical chemistry.* (García-Hernández E., Fernández-Velasco A. eds.) Transworld Research Network, India.
- [95] Ernst R. R., Anderson W. A. (1966) Application of Fourier transform spectroscopy to magnetic resonance. *Rev. Sci. Instrum.* 37, 93– 102.
- [96] Jeener J. (1971) Lecture notes from Ampere Summer School in Basco Polje, Yugoslavia. In
- [97] Jeener J. (1994) en *NMR and More.* In honour of Anatole Abragam. (Goldman M., Porneuf M. eds.) Les Editions de Physique, les Ulis, Francia.
- [98] Li C., Liu M. (2013) Protein dynamics in living cells studied by in-cell NMR spectroscopy. *FEBS Lett.* 587(8), 1008–1011.
- [99] Cavanagh, J. (1996) *Protein NMR Spectroscopy.* Academic Press EUA.
- [100] Keeler, J. (2005) *Understanding NMR spectroscopy.* John Wiley & Sons, England.
- [101] Pastore, A., Saudek, V. (1994) The relationship between chemical shift and secondary structure in proteins. *J. Magn. Reson.* 90(1), 165–176.
- [102] Gobom, J., Schuerenberg, M., Mueller, M., Theiss, D., Lehrach, H., Nordhoff, E. (2001)  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid affinity sample preparation. A protocol for MALDI-MS peptide analysis in proteomics. *Anal. Chem.* 73(3), 434–438.
- [103] Hwang, T. L., Shaka, A. J. (1995) Water suppression that works. Excitation sculpting using arbitrary wave-forms and pulsed-field gradients. *J. Magn. Reson.* 112(2), 275–279.

- [104] Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J., Bax, A. (1995) NMRPipe. A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR.* 6(3), 277–293.
- [105] Bartels, C., Xia, T., Billeter, M., Güntert, P., Wüthrich, K. (1995) The program XEASY for computer-supported NMR spectral analysis of biological macromolecules. *J. Biomol. NMR.* 6(1), 1–10.
- [106] Wagner, G., Wüthrich, K. (1982) Sequential resonance assignments in protein  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance spectra. Basic pancreatic trypsin inhibitor. *J. Mol. Biol.* 155(3), 347–366.
- [107] Gunter, P. (2004) Automated NMR structure calculation with CYANA. *Methods Mol. Biol.* 278, 353–378.
- [108] Herrmann, T., Günter P., Wuthrich, K. (2002) Protein NMR structure determination with automated NOE assignment using the new software CANDID and the torsion angle dynamics algorithm DYANA. *J. Mol. Biol.* 319(1), 209–227.
- [109] Case, D. A., Darden, T. A., Cheatham III, T. E., Simmerling, C. L., Wang, J., Duke, R. E., Luo, R., Merz, K. M., Pearlman, M. A., Crowley, M., Walker, R. C., Zhang, W., Wang, B., Hayik, S., Roitberg, A., Seabra, G., Wong, K. F., Paesani, F., Wu, X., Brozell, S., Tsui, V., Gohlke, H., Yang, L., Tan, C., Mongan, J., Hornak, V., Cui, G., Beroza, P., Mathews, D. H., Schafmeister, C., Ross, W. S., Kollman, P. A. (2006) AMBER 9, University of California, San Francisco.
- [110] Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., Dinola, A., Haak, J. R. (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* 81, 3684–3690.
- [111] Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J., Klein, M.L. (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* 79, 926–935.
- [112] Hornak, V., Abel, R., Okur, A., Strockbine, B., Roitberg, A., Simmerling, C. (2006) Comparison of multiple AMBER force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins.* 65(3), 712–725.
- [113] Gurrola, G. B., Hernández-López, R. A., Rodríguez de la Vega, R. C., Varga, Z., Batista, C. V. F., Salas-Castillo, S. P., Panyi, G., del Río-Portilla, F. (2012) Structure, function and chemical of Vaejovis mexicanus peptide 24: A novel potent blocker of Kv1.3 potassium channels of human T lymphocytes. *Biochemistry.* 51(19), 4049–4061.
- [114] Flores-Solís, D. (2012) Biosíntesis, purificación caracterización y determinación estructural por RMN de la toxina de alacrán Ts16. Tesis doctoral, UNAM, México.
- [115] Feske, S., Skolnik E. Y., Prakriya, M., (2012) Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 12(7), 532–547.
- [116] Dauplais M., Lecoq A., Song J., Cotton J., Jamin N., Gilquin B., Roumestand C., Vita C., de Medeiros C. L., Rowan E. G., Harvey A. L., Ménez A. (1997) On the convergent evolution of animal toxins. Conservation of a diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structures. *J. Biol. Chem.* 272(7), 4302–4309.

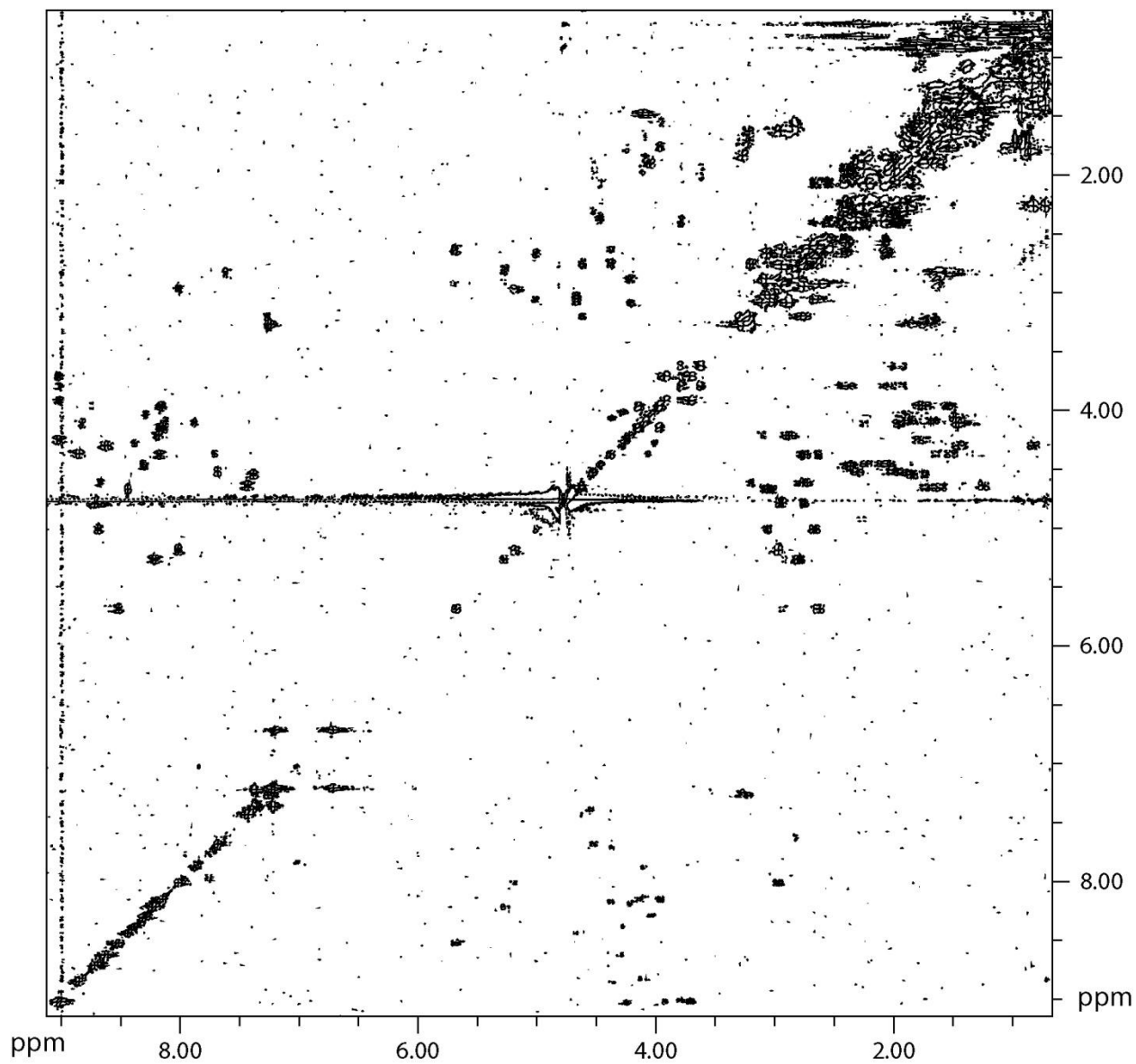


- [117] Girault, A., Haelters, J. P., Potier-Cartereau, M., Chantôme, A., Jaffrés, P. A., Bougnoux, P., Joulin, V., Vandier C. (2012) Targeting SKCa channels in cancer: potential new therapeutic approaches. *Curr. Med. Chem.* 19(5), 697-713.
- [118] Weatherall, K. L., Seutin, V., Liégeois, J.-F., Marrion, N. V. (2011) Crucial role of a shared extracellular loop in apamin sensitivity and maintenance of pore shape of small conductance calcium-activated potassium (SK) channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108(45), 18494-18499.

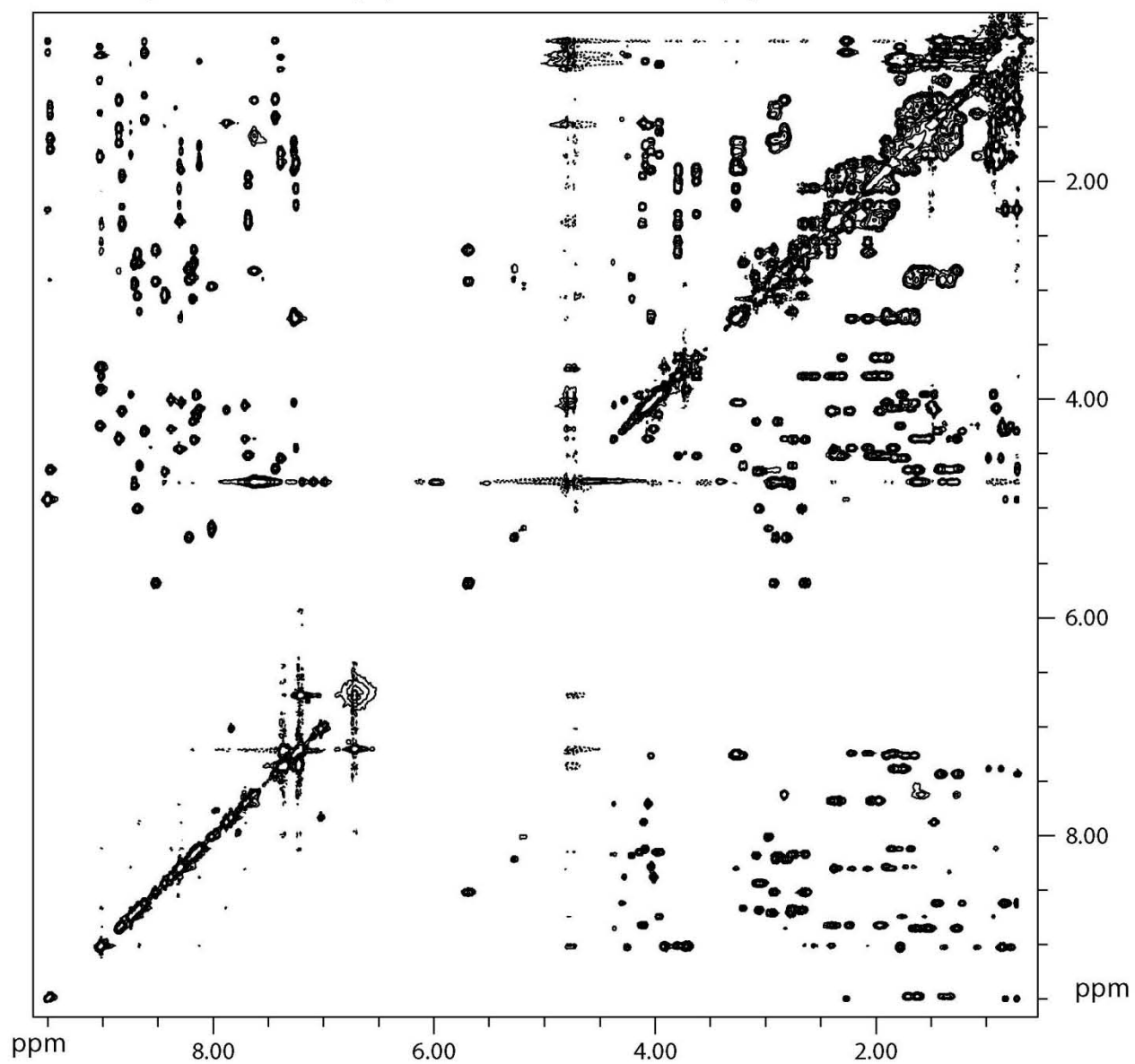
# Anexo A

## Espectros DQF-COSY, TOCSY y NOESY de R7A

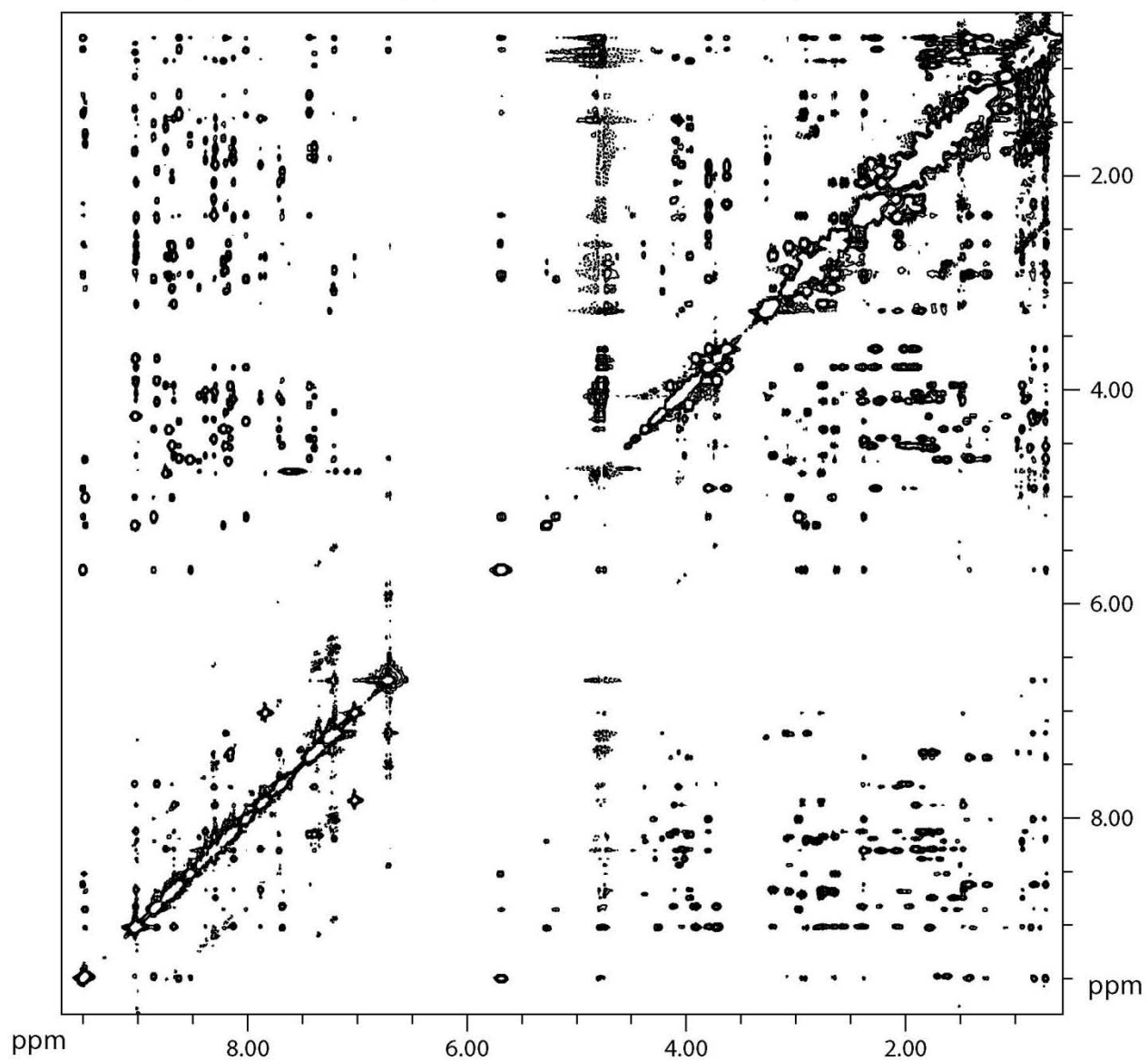
Espectro DQF-COSY del péptido R7A obtenido en un equipo de 500 MHz



Espectro TOCSY del péptido R7A obtenido en un equipo de 500 MHz



Espectro NOESY del péptido R7A obtenido en un equipo de 500 MHz



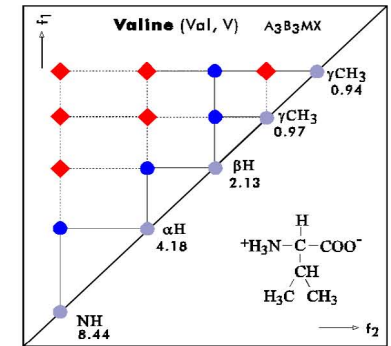
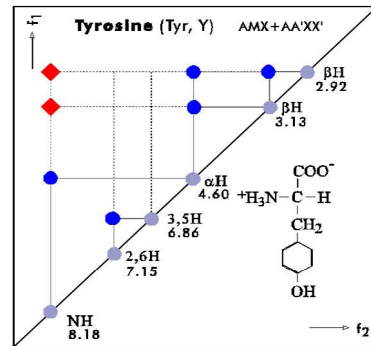
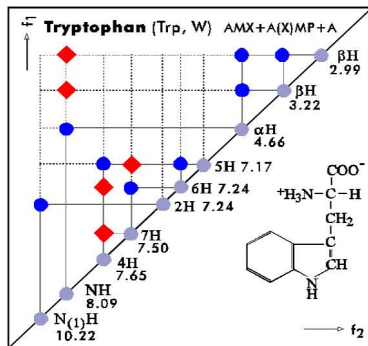
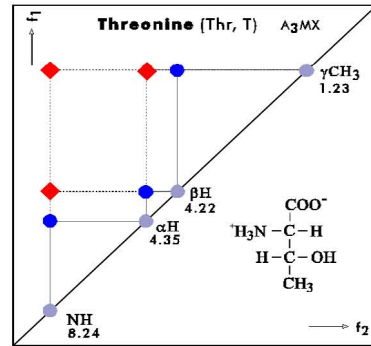
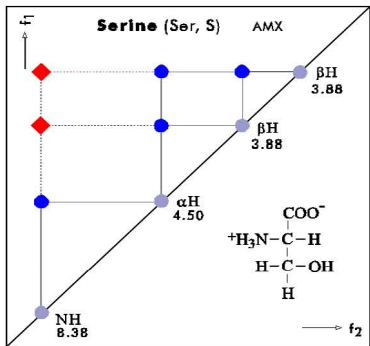
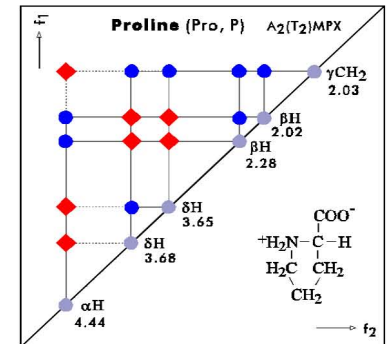
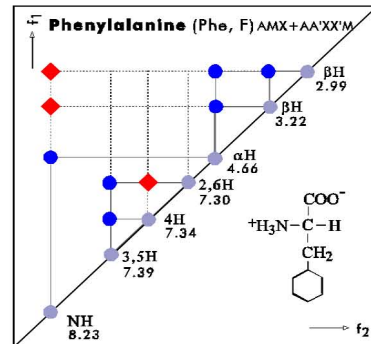
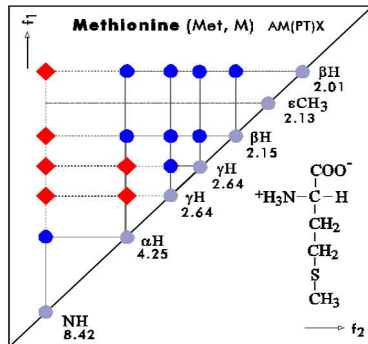
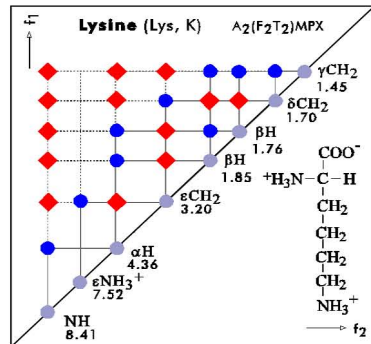
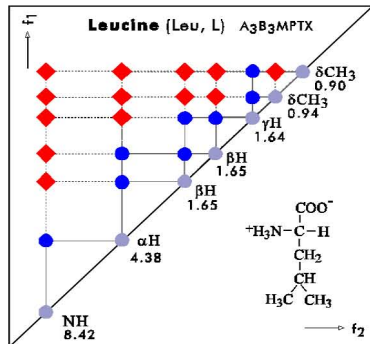
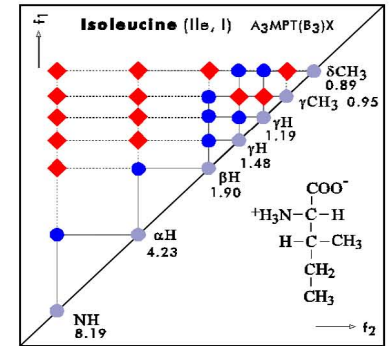
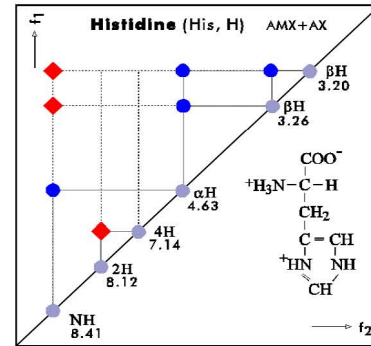
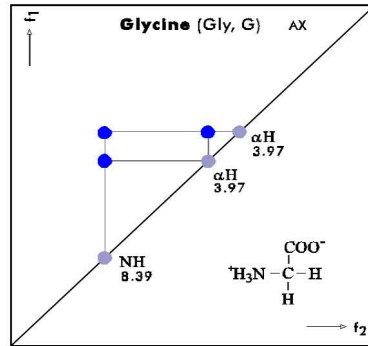
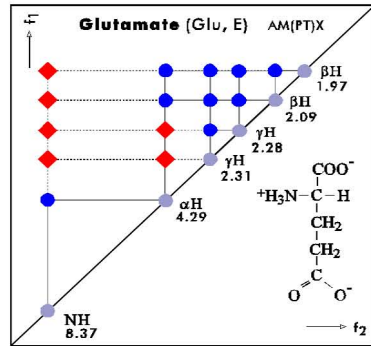
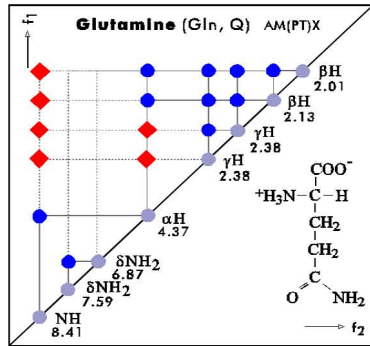
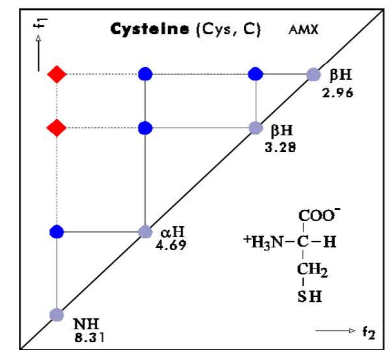
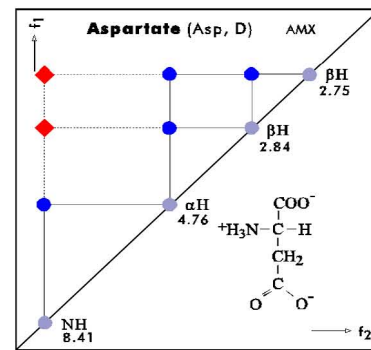
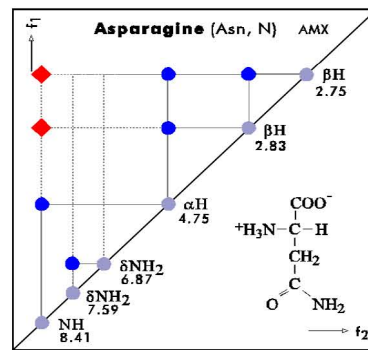
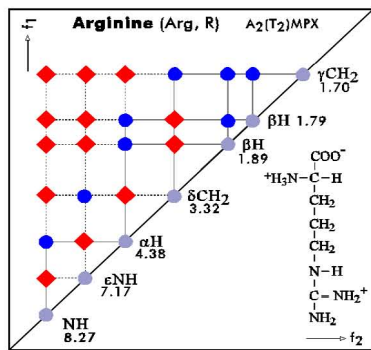
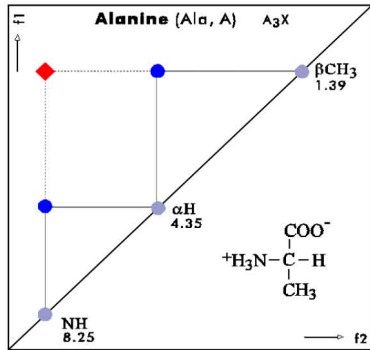
# Anexo B

Patrones COSY-TOCSY

de los 20 aminoácidos más comunes

TOCSY PATTERNS

● Diagonal    ● COSY peaks    ◆ TOCSY peaks



## Anexo C

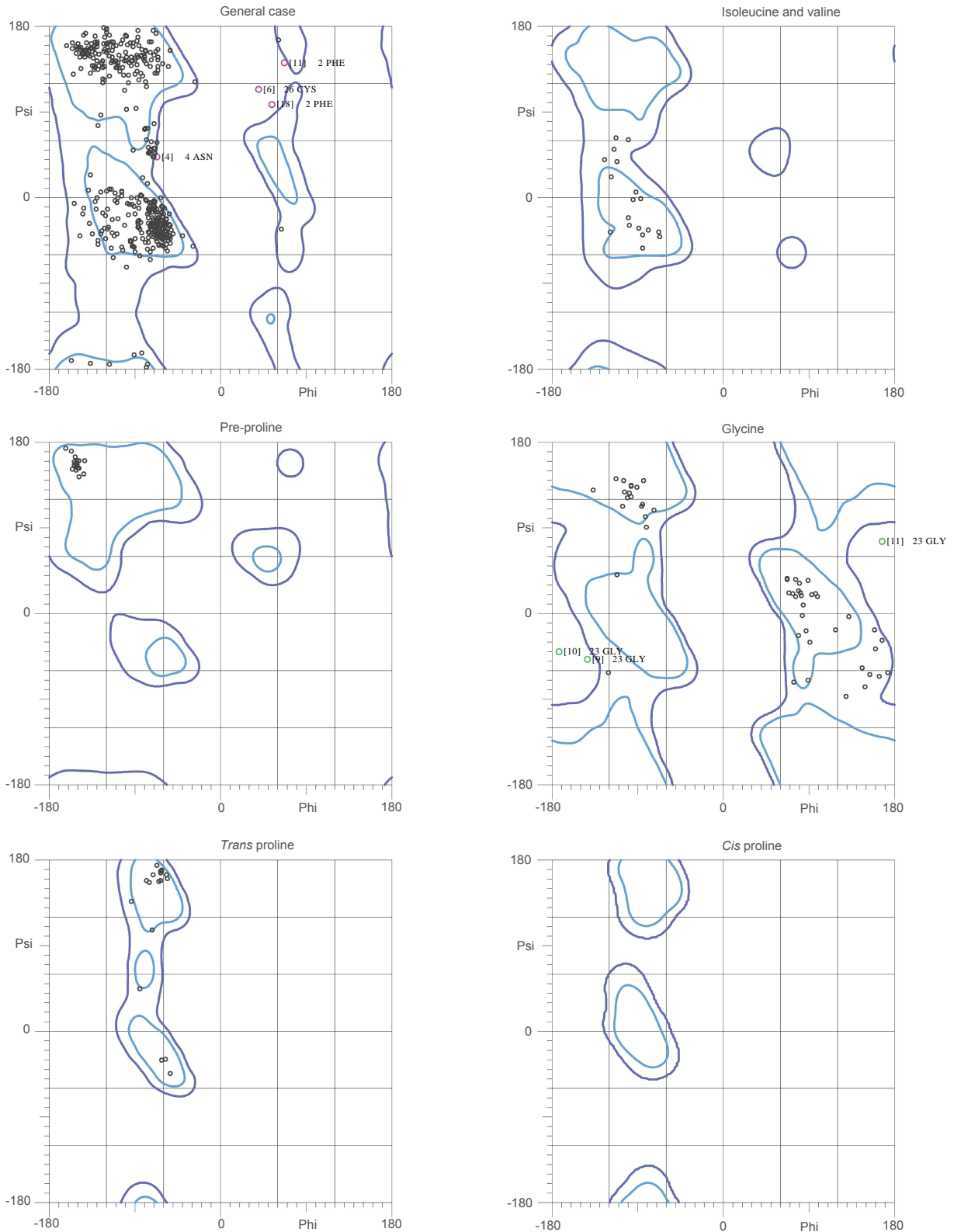
Tablas de los resultados del afinamiento de estructuras por AMBER y Gráficos de Ramachandran de las estructuras depositadas en el PDB





# MolProbity Ramachandran analysis

2LU9, all models



87.4% (456/522) of all residues were in favored (98%) regions.  
 98.7% (515/522) of all residues were in allowed (>99.8%) regions.

There were 7 outliers (phi, psi):  
 [4] 4 ASN (-67.2, 43.5)

[6] 26 CYS (40.8, 114.9)  
 [9] 23 GLY (-143.1, -48.5)  
 [10] 23 GLY (-173.8, -40.8)  
 [11] 2 PHE (67.7, 142.9)  
 [11] 23 GLY (167.9, 76.8)  
 [18] 2 PHE (54.7, 98.9)

Resultados para el afinamiento de GS-tamapina (PDB:2KY3).

#	Filename	nvio	max	<0.1	0.2	0.3	0.4	>0.4	Amber energy	Constraint	b-dev	a-dev	align	Distance	Torsion	Noesy
1	min_01.o	10	0.32	3	4	1	2	0	-38222.07	12.39	0.0000	0.00	0.00	7.746	4.647	0.000
2	min_02.o	8	0.29	0	6	2	0	0	-33437.86	10.29	0.0000	0.00	0.00	5.605	4.686	0.000
3	min_03.o	9	0.26	3	5	1	0	0	-35003.49	8.33	0.0000	0.00	0.00	3.947	4.388	0.000
4	min_04.o	9	0.24	3	5	1	0	0	-36339.35	8.28	0.0000	0.00	0.00	3.781	4.502	0.000
5	min_05.o	11	0.26	3	4	4	0	0	-35172.22	11.74	0.0000	0.00	0.00	7.107	4.628	0.000
6	min_06.o	11	0.22	5	5	1	0	0	-35030.20	8.06	0.0000	0.00	0.00	3.662	4.400	0.000
7	min_07.o	6	0.16	2	4	0	0	0	-39244.96	6.84	0.0000	0.00	0.00	1.897	4.944	0.000
8	min_08.o	7	0.18	3	4	0	0	0	-33984.01	7.43	0.0000	0.00	0.00	2.922	4.513	0.000
9	min_09.o	6	0.23	0	5	1	0	0	-36208.77	7.38	0.0000	0.00	0.00	3.152	4.231	0.000
10	min_10.o	8	0.31	1	5	1	1	0	-35596.86	9.29	0.0000	0.00	0.00	5.069	4.220	0.000
11	min_11.o	9	0.25	1	7	1	0	0	-34433.06	9.01	0.0000	0.00	0.00	4.662	4.349	0.000
12	min_12.o	7	0.27	1	5	1	0	0	-37834.77	7.72	0.0000	0.00	0.00	3.409	4.316	0.000
13	min_13.o	9	0.21	2	6	1	0	0	-39140.58	9.01	0.0000	0.00	0.00	4.406	4.601	0.000
14	min_14.o	8	0.21	1	6	1	0	0	-35891.64	9.47	0.0000	0.00	0.00	4.873	4.594	0.000
15	min_15.o	14	0.26	4	7	3	0	0	-40701.81	12.51	0.0000	0.00	0.00	7.907	4.605	0.000
16	min_16.o	5	0.26	1	3	1	0	0	-36565.59	7.70	0.0000	0.00	0.00	3.120	4.581	0.000
17	min_17.o	12	0.34	3	7	1	1	0	-40071.81	11.50	0.0000	0.00	0.00	6.987	4.514	0.000
18	min_18.o	8	0.17	2	6	0	0	0	-34276.25	6.99	0.0000	0.00	0.00	2.482	4.508	0.000
19	min_19.o	12	0.24	2	7	3	0	0	-37767.43	10.55	0.0000	0.00	0.00	5.890	4.665	0.000
20	min_20.o	10	0.20	2	8	0	0	0	-36565.13	8.39	0.0000	0.00	0.00	4.110	4.281	0.000

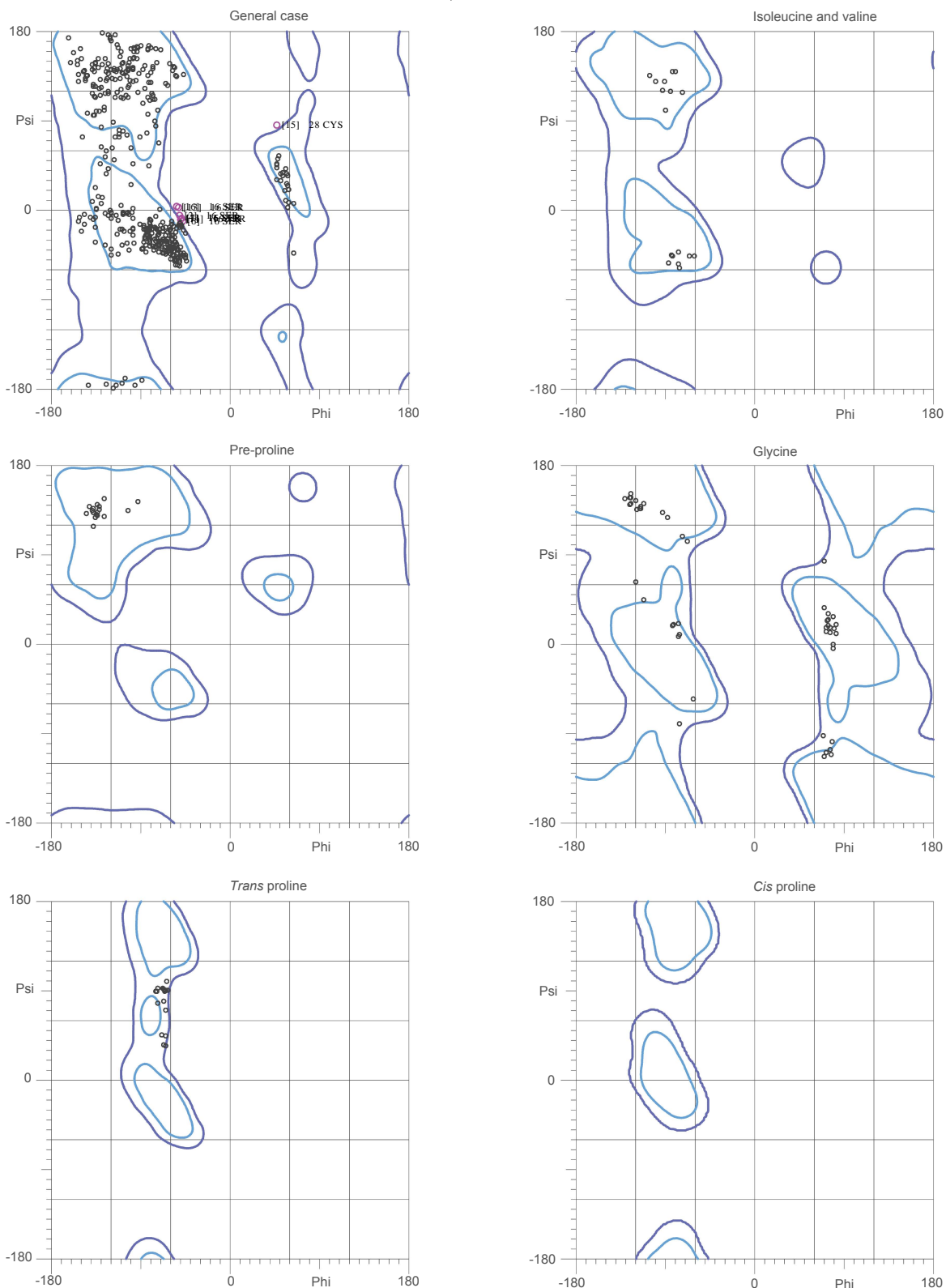
Averages: -36574.39 9.15 0.0000 0.00 0.00 4.637 4.509 0.000

Distance and angle violations:

First atom	Last atom	target	Key: . = 0.0 - <= 0.1 + <= 0.2 * <= 0.5 0 <= 1.0 8 <= 2.0 @ > 2.0	Stats: Ave	<std>	min/max/#
CA SER	2 -- C SER	2 :	55.00 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.@	111.74	< 15.39>	83.08 / 138.32 18
CA ALA	3 -- C ALA	3 :	105.00 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	119.20	< 15.22>	95.42 / 139.59 13
CA PHE	4 -- C PHE	4 :	55.00 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	113.30	< 15.42>	88.93 / 135.05 14
CA CYX	5 -- C CYX	5 :	55.00 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	108.39	< 23.40>	82.69 / 138.59 9
CA ASN	6 -- C ASN	6 :	55.00 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	103.82	< 0.00>	103.82 / 103.82 1
CA LEU	7 -- C LEU	7 :	185.00 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	132.56	< 4.38>	121.83 / 139.62 20
CA ARG	8 -- C ARG	8 :	185.00 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	131.45	< 4.16>	120.44 / 137.94 20
CA ARG	9 -- C ARG	9 :	185.00 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	135.26	< 4.34>	123.16 / 139.67 20
CA CYX	10 -- C CYX	10 :	185.00 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	130.10	< 3.90>	123.49 / 137.22 20
CA GLU	11 -- C GLU	11 :	185.00 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	126.46	< 4.39>	114.64 / 133.34 20
CA LEU	12 -- C LEU	12 :	105.00 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	134.62	< 4.67>	122.95 / 139.53 20
CA SER	13 -- C SER	13 :	185.00 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	133.41	< 4.15>	126.16 / 139.33 20
CA CYX	14 -- C CYX	14 :	105.00 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	131.38	< 5.94>	118.65 / 139.89 20
CA ARG	15 -- C ARG	15 :	105.00 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	130.61	< 7.19>	110.26 / 139.34 20
CA SER	16 -- C SER	16 :	105.00 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	123.49	< 6.80>	107.33 / 137.31 20
CA LEU	17 -- C LEU	17 :	105.00 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	101.24	< 10.23>	84.29 / 115.18 19
CA LEU	19 -- C LEU	19 :	55.00 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	118.51	< 7.31>	108.45 / 133.23 20
CA LEU	20 -- C LEU	20 :	55.00 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	100.25	< 8.40>	86.37 / 114.91 17
CA LYS	22 -- C LYS	22 :	55.00 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	103.83	< 12.62>	85.84 / 122.90 12
CA CYX	23 -- C CYX	23 :	55.00 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	86.55	< 3.12>	83.48 / 90.44 6
CA ILE	24 -- C ILE	24 :	185.00 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	122.83	< 18.01>	83.74 / 139.15 16
CA GLU	26 -- C GLU	26 :	105.00 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	116.05	< 18.01>	84.21 / 136.75 16
CA GLU	27 -- C GLU	27 :	55.00 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	104.77	< 16.82>	85.82 / 154.96 18
CA CYX	28 -- C CYX	28 :	55.00 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	88.37	< 4.95>	83.51 / 96.27 8
CA LYS	29 -- C LYS	29 :	55.00 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	96.58	< 9.08>	83.43 / 113.02 18
CA CYX	30 -- C CYX	30 :	55.00 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	91.81	< 14.42>	83.27 / 126.36 8
H ALA	3 -- H PHE	4 :	4.12 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.13	< 0.04>	0.09 / 0.16 3
H PHE	4 -- H CYX	5 :	3.98 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.15	< 0.05>	0.08 / 0.21 4
H CYX	5 -- HB2 CYX	5 :	3.38 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.10	< 0.00>	0.10 / 0.10 1
H CYX	5 -- HB3 CYX	5 :	3.38 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.10	< 0.00>	0.10 / 0.10 1
HB3 ASN	6 -- H ARG	9 :	4.40 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.17	< 0.00>	0.17 / 0.17 1
HB2 ASN	6 -- H ARG	9 :	4.40 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.13	< 0.05>	0.07 / 0.21 7
H LEU	7 -- HG LEU	7 :	4.39 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.08	< 0.00>	0.08 / 0.08 2
HB2 ARG	8 -- H ARG	9 :	3.78 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.10	< 0.02>	0.09 / 0.11 2
H ARG	8 -- H CYX	10 :	4.08 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.09	< 0.00>	0.09 / 0.09 1
*HG3 ARG	8 -- H CYX	10 :	6.17 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.12	< 0.03>	0.08 / 0.16 6
H CYX	10 -- HB3 CYX	10 :	3.12 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.31	< 0.02>	0.29 / 0.32 2
HB2 CYX	10 -- H GLU	11 :	3.85 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.09	< 0.00>	0.09 / 0.09 1
H CYX	10 -- H SER	13 :	4.52 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.12	< 0.02>	0.11 / 0.13 2
H CYX	10 -- H CYX	14 :	5.50 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.21	< 0.04>	0.10 / 0.27 20
HG LEU	12 -- H SER	13 :	4.26 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.13	< 0.03>	0.07 / 0.17 12
H LEU	12 -- *HB3 SER	13 :	5.47 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.09	< 0.00>	0.09 / 0.09 1
HA LEU	12 -- *HD3 ARG	15 :	4.32 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.08	< 0.01>	0.07 / 0.08 2
*HB3 SER	13 -- H CYX	14 :	3.70 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.12	< 0.01>	0.12 / 0.13 3
H ARG	15 -- HB3 ARG	15 :	3.17 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.22	< 0.07>	0.14 / 0.31 4
H LEU	17 -- HG LEU	19 :	5.47 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.15	< 0.06>	0.08 / 0.34 18
HG LEU	17 -- H LEU	19 :	5.15 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.13	< 0.00>	0.13 / 0.13 1
H LEU	19 -- HG LEU	19 :	4.17 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.14	< 0.04>	0.08 / 0.17 5
HG LEU	19 -- H VAL	31 :	4.01 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.13	< 0.02>	0.09 / 0.17 15
*HB3 LEU	19 -- H VAL	31 :	4.65 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.16	< 0.06>	0.12 / 0.21 2
*HD13 LEU	20 -- H GLY	21 :	5.56 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.09	< 0.00>	0.09 / 0.09 1
HG LEU	20 -- H GLY	21 :	4.44 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.14	< 0.02>	0.12 / 0.15 2
H LEU	20 -- HA CYX	30 :	4.86 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.09	< 0.00>	0.09 / 0.09 1
H LEU	20 -- HB2 CYX	30 :	5.50 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.11	< 0.02>	0.07 / 0.14 19
*HB3 LEU	20 -- H VAL	31 :	4.21 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.08	< 0.00>	0.08 / 0.08 1
H LYS	22 -- *HD3 LYS	22 :	4.42 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.21	< 0.00>	0.21 / 0.21 1
H LYS	22 -- *HE3 LYS	22 :	6.17 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.13	< 0.00>	0.13 / 0.13 1
*HD3 LYS	22 -- H CYX	23 :	4.60 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.14	< 0.04>	0.09 / 0.19 6
*HG3 LYS	22 -- H CYX	23 :	4.98 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.09	< 0.00>	0.09 / 0.09 1
*HD3 LYS	22 -- H LYS	29 :	6.17 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.14	< 0.05>	0.08 / 0.26 10
H LYS	22 -- *HG23 VAL	31 :	5.84 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.15	< 0.00>	0.15 / 0.15 1
HG13 ILE	24 -- H GLY	25 :	5.50 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.18	< 0.00>	0.18 / 0.18 1
HA ILE	24 -- H GLU	26 :	5.50 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.13	< 0.04>	0.09 / 0.17 3
H ILE	24 -- H GLU	27 :	3.90 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.10	< 0.02>	0.09 / 0.11 2
H GLY	25 -- H GLU	26 :	3.79 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.29	< 0.04>	0.26 / 0.31 2
H GLU	26 -- HG3 GLU	26 :	4.06 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.17	< 0.06>	0.11 / 0.23 3
H GLU	27 -- HB3 GLU	27 :	3.73 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.17	< 0.13>	0.08 / 0.26 2
H CYX	28 -- HB3 CYX	28 :	3.29 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.16	< 0.04>	0.14 / 0.19 2
H LYS	29 -- *HE3 LYS	29 :	5.60 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.10	< 0.04>	0.07 / 0.13 2
H CYX	30 -- *HG23 VAL	31 :	5.85 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.07	< 0.00>	0.07 / 0.07 1
H VAL	31 -- *HG23 VAL	31 :	3.71 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.	0.22	< 0.00>	0.22 / 0.22 1

# MolProbity Ramachandran analysis

2KY3, all models



86.3% (455/527) of all residues were in favored (98%) regions.  
 98.5% (519/527) of all residues were in allowed (>99.8%) regions.

There were 8 outliers (phi, psi):

- [1] 16 SER (-49.3, -8.3)
- [2] 16 SER (-51.9, -5.9)

- [6] 16 SER (-48.9, -11.3)
- [7] 16 SER (-49.4, -8.3)
- [13] 16 SER (-52.4, 3.5)
- [14] 16 SER (-50.4, -9.4)
- [15] 28 CYS (47.7, 86.8)
- [16] 16 SER (-54.2, 4.2)

Resultados para el afinamiento de R6A (PDB: 2ME7).

0.1- 0.2- 0.3-

#	Filename	nvio	max	<0.1	0.2	0.3	0.4	>0.4	Amber energy	Constraint	b-dev	a-dev	align	Distance	Torsion	Noesy
1	min_01.o	15	0.30	7	6	0	2	0	-37659.73	12.47	0.0000	0.00	0.00	8.208	4.261	0.000
2	min_02.o	20	0.27	10	6	4	0	0	-36116.44	13.86	0.0000	0.00	0.00	9.376	4.482	0.000
3	min_03.o	23	0.26	10	9	4	0	0	-34924.26	13.96	0.0000	0.00	0.00	9.436	4.526	0.000
4	min_04.o	15	0.30	6	6	2	1	0	-33088.40	11.93	0.0000	0.00	0.00	7.612	4.316	0.000
5	min_05.o	13	0.23	1	10	2	0	0	-33861.87	11.27	0.0000	0.00	0.00	6.938	4.332	0.000
6	min_06.o	13	0.25	7	2	4	0	0	-38664.31	10.76	0.0000	0.00	0.00	6.460	4.305	0.000
7	min_07.o	16	0.26	8	5	3	0	0	-34349.93	11.86	0.0000	0.00	0.00	7.588	4.268	0.000
8	min_08.o	18	0.26	9	7	2	0	0	-38317.72	11.28	0.0000	0.00	0.00	7.051	4.233	0.000
9	min_09.o	18	0.29	8	7	3	0	0	-37179.28	12.87	0.0000	0.00	0.00	8.473	4.400	0.000
10	min_10.o	17	0.29	7	7	3	0	0	-36184.46	12.41	0.0000	0.00	0.00	7.965	4.442	0.000
11	min_11.o	12	0.20	6	6	0	0	0	-39289.21	8.56	0.0000	0.00	0.00	4.243	4.314	0.000
12	min_12.o	18	0.32	9	6	2	1	0	-37855.71	12.93	0.0000	0.00	0.00	8.568	4.364	0.000
13	min_13.o	18	0.28	7	10	1	0	0	-34673.50	11.78	0.0000	0.00	0.00	7.404	4.374	0.000
14	min_14.o	17	0.30	7	8	2	0	0	-39271.81	11.76	0.0000	0.00	0.00	7.418	4.342	0.000
15	min_15.o	17	0.28	7	8	2	0	0	-36907.37	12.16	0.0000	0.00	0.00	7.837	4.320	0.000
16	min_16.o	18	0.29	9	6	3	0	0	-37638.39	12.57	0.0000	0.00	0.00	8.295	4.274	0.000
17	min_17.o	15	0.28	5	7	3	0	0	-39785.46	12.56	0.0000	0.00	0.00	8.168	4.389	0.000
18	min_18.o	14	0.26	8	4	2	0	0	-37116.63	10.59	0.0000	0.00	0.00	6.255	4.336	0.000
19	min_19.o	23	0.27	10	10	3	0	0	-37787.28	13.15	0.0000	0.00	0.00	8.768	4.380	0.000
20	min_20.o	15	0.34	8	5	1	1	0	-35061.42	11.55	0.0000	0.00	0.00	7.030	4.524	0.000
Averages:									-36786.66	12.01	0.0000	0.00	0.00	7.655	4.359	0.000

Distance and angle violations:

First atom	Last atom	target	Key:	= 0.0	- <= 0.1	+ <= 0.2	* <= 0.5	0 <= 1.0	8 <= 2.0	@ > 2.0	Stats: Ave	<std>	min/max/#
CA	SER	2	--	C	SER	2	: 55.00	: @@@@.@@@.@@@@.@@	115.98	< 14.79>	90.14	/ 135.21	16
CA	ALA	3	--	C	ALA	3	: 105.00	: .@@@.@@.@@@@@@@@.e	107.20	< 14.41>	84.95	/ 137.96	15
CA	PHE	4	--	C	PHE	4	: 55.00	: ..@.....@.@@.....	93.70	< 9.88>	84.13	/ 103.87	3
CA	CYX	5	--	C	CYX	5	: 55.00	: .....@.@@@@.@@.@@	99.39	< 24.76>	86.48	/ 164.04	9
CA	ASN	6	--	C	ASN	6	: 55.00	: .....e.....	95.85	< 0.00>	95.85	/ 95.85	1
CA	LEU	7	--	C	LEU	7	: 185.00	: @@@@@@@@@@@@@@@@@@	136.21	< 2.68>	129.75	/ 139.97	20
CA	ALA	8	--	C	ALA	8	: 105.00	: @@@@@@@@@@@@@@@@@@	131.89	< 4.73>	123.37	/ 139.70	20
CA	ARG	9	--	C	ARG	9	: 185.00	: @@@@@@@@@@@@@@@@@@	134.87	< 3.04>	129.92	/ 138.92	20
CA	CYX	10	--	C	CYX	10	: 185.00	: @@@@@@@@@@@@@@@@@@	132.40	< 3.73>	124.00	/ 138.64	20
CA	GLU	11	--	C	GLU	11	: 185.00	: @@@@@@@@@@@@@@@@@@	127.37	< 3.09>	122.50	/ 131.92	20
CA	LEU	12	--	C	LEU	12	: 185.00	: @@@@@@@@@@@@@@@@@@	133.54	< 4.64>	124.21	/ 139.79	20
CA	SER	13	--	C	SER	13	: 185.00	: @@@@@@@@@@@@@@@@@@	131.58	< 4.70>	123.97	/ 139.14	20
CA	CYX	14	--	C	CYX	14	: 105.00	: @@@@@@@@@@@@@@@@@@	136.67	< 2.64>	132.14	/ 139.94	20
CA	ARG	15	--	C	ARG	15	: 185.00	: @@@@@@@@@@@@@@@@@@	134.78	< 4.71>	124.59	/ 139.42	20
CA	SER	16	--	C	SER	16	: 105.00	: @@@@@@@@@@@@@@@@@@	119.83	< 7.33>	104.42	/ 136.07	20
CA	LEU	17	--	C	LEU	17	: 105.00	: @@@@@@@@@@@@@@@@@@	114.84	< 10.30>	102.76	/ 137.89	20
CA	LEU	19	--	C	LEU	19	: 55.00	: @@@@@@@@@@@@@@@@@@	129.98	< 5.87>	118.50	/ 141.84	20
CA	LEU	20	--	C	LEU	20	: 55.00	: @@@@@@.@@@@.@@@@	99.90	< 7.99>	85.76	/ 109.65	18
CA	LYS	22	--	C	LYS	22	: 55.00	: .e.@@.@@@.@@@@	98.16	< 7.85>	84.12	/ 118.66	15
CA	CYX	23	--	C	CYX	23	: 55.00	: ..@@@.....@.....	88.12	< 6.50>	82.93	/ 96.65	4
CA	ILE	24	--	C	ILE	24	: 55.00	: .....@.....e.....	132.12	< 6.15>	127.78	/ 136.47	2
CA	GLU	26	--	C	GLU	26	: 105.00	: @@@@@@@@@@.@@@@@.e	97.26	< 10.99>	83.90	/ 116.04	17
CA	GLU	27	--	C	GLU	27	: 55.00	: @@@@@@@@@@@@@@@@@@.e	96.45	< 6.60>	84.83	/ 113.17	19
CA	CYX	28	--	C	CYX	28	: 55.00	: ..@...@.@@.....	86.97	< 3.96>	83.08	/ 91.00	3
CA	LYS	29	--	C	LYS	29	: 55.00	: @@@.@@@@@@@@@.e	96.53	< 8.46>	83.50	/ 110.85	15
CA	CYX	30	--	C	CYX	30	: 55.00	: @@@@@@.@@@@@@@@	92.86	< 5.07>	84.70	/ 101.73	19
H	ALA	3	--	H	PHE	4	: 4.18	: .....+..+..+..+..+	0.15	< 0.03>	0.12	/ 0.18	5
HA	ALA	3	--	H	PHE	4	: 3.11	: ..+.*.....+.....+	0.15	< 0.06>	0.08	/ 0.23	5
H	PHE	4	--	H	CYX	5	: 4.02	: ...*..+..+..+..+	0.17	< 0.06>	0.09	/ 0.26	6
HA	CYX	5	--	H	ASN	6	: 2.74	: .....+.....+	0.19	< 0.00>	0.19	/ 0.19	1
HB3	CYX	5	--	H	ASN	6	: 4.22	: ...+.....+.....	0.13	< 0.02>	0.11	/ 0.15	3
H	CYX	5	--	HA	GLU	26	: 3.70	: .....+.....	0.08	< 0.01>	0.07	/ 0.10	2
H	ASN	6	--	H	LEU	7	: 4.26	: .....+.....	0.08	< 0.00>	0.08	/ 0.08	2
HB2	ASN	6	--	H	ARG	9	: 4.35	: ...+...+...+...+	0.11	< 0.03>	0.08	/ 0.14	13
HB2	ASN	6	--	HB3	ARG	9	: 4.63	: .....+.....	0.11	< 0.00>	0.11	/ 0.11	1
HA	LEU	7	--	HA	GLU	11	: 5.50	: ...+...+...+...+	0.15	< 0.03>	0.10	/ 0.20	18
HB3	LEU	7	--	H	GLU	11	: 5.45	: .....+.....	0.08	< 0.00>	0.08	/ 0.08	1
*HB3	ALA	8	--	H	CYX	10	: 5.37	: .....+.....	0.08	< 0.01>	0.07	/ 0.10	8
H	ARG	9	--	HG2	ARG	9	: 4.07	: **.*...*.*.*.....*	0.24	< 0.04>	0.12	/ 0.30	16
H	ARG	9	--	HG3	ARG	9	: 4.07	: ...+...+...+...+	0.14	< 0.05>	0.08	/ 0.22	10
HB2	ARG	9	--	H	CYX	10	: 3.59	: ...+...+...+...+	0.10	< 0.02>	0.07	/ 0.13	13
HB2	CYX	10	--	H	GLU	11	: 3.78	: .....+.....	0.08	< 0.00>	0.07	/ 0.08	3
H	CYX	10	--	H	CYX	14	: 5.50	: *****+*****	0.27	< 0.03>	0.20	/ 0.34	20
HB3	CYX	10	--	*HB3	CYX	14	: 6.17	: ...+...+...+...+	0.08	< 0.01>	0.07	/ 0.10	12
HA	GLU	11	--	HG3	GLU	11	: 3.51	: ...+...+...+...+	0.09	< 0.01>	0.07	/ 0.11	14
H	GLU	11	--	HB2	LEU	12	: 4.87	: .....+.....	0.09	< 0.01>	0.07	/ 0.10	3
HB3	GLU	11	--	H	SER	13	: 5.50	: .....+.....	0.08	< 0.01>	0.07	/ 0.09	3
HB2	LEU	12	--	H	SER	13	: 3.70	: .....+.....	0.10	< 0.03>	0.07	/ 0.12	2
HA	LEU	12	--	*HD3	ARG	15	: 4.92	: ...+...+...+...+	0.13	< 0.02>	0.09	/ 0.14	4
*HB3	SER	13	--	H	ARG	15	: 5.29	: .....+.....	0.09	< 0.00>	0.09	/ 0.09	1
*HB3	CYX	14	--	*HB3	LEU	19	: 5.25	: ...+...+...+...+	0.11	< 0.03>	0.07	/ 0.16	9
*HB3	CYX	14	--	HB2	CYX	30	: 4.15	: ...+...+...+...+	0.10	< 0.02>	0.08	/ 0.14	20
H	ARG	15	--	*HG3	ARG	15	: 4.47	: .....+.....	0.07	< 0.00>	0.07	/ 0.07	1
HG	LEU	17	--	H	GLY	18	: 4.17	: .....+.....	0.09	< 0.02>	0.07	/ 0.11	6
HG	LEU	17	--	*HD23	LEU	19	: 4.08	: ...+...+...+...+	0.11	< 0.04>	0.07	/ 0.23	10
H	LEU	17	--	HG	LEU	19	: 5.50	: .....+.....	0.08	< 0.01>	0.07	/ 0.08	3
HG	LEU	17	--	H	LEU	19	: 4.95	: .....+.....	0.09	< 0.00>	0.09	/ 0.09	1
H	LEU	19	--	HG	LEU	19	: 3.30	: .....+.....	0.07	< 0.00>	0.07	/ 0.07	1
H	LEU	19	--	*HD2	TYR	33	: 6.02	: .....+.....	0.12	< 0.04>	0.09	/ 0.16	3
HG	LEU	20	--	H	GLY	21	: 4.77	: .....+.....	0.10	< 0.02>	0.07	/ 0.12	3
*HB3	LEU	20	--	HA	CYX	30	: 5.46	: .....+.....	0.09	< 0.01>	0.07	/ 0.10	4
H	LEU	20	--	HB2	CYX	30	: 5.50	: .....+.....	0.08	< 0.01>	0.08	/ 0.10	6
*HD13	LEU	20	--	*HD2	TYR	33	: 5.55	: .....+.....	0.08	< 0.00>	0.08	/ 0.08	1
HA	LYS	22	--	*HD3	LYS	22	: 4.15	: .....+.....	0.16	< 0.00>	0.16	/ 0.16	1
H	LYS	22	--	*HD3	LYS	22	: 4.61	: ...+...+...+...+	0.13	< 0.04>	0.08	/ 0.18	10
H	LYS	22	--	*HB3	LYS	22	: 6.17	: ...+...+...+...+	0.16	< 0.08>	0.08	/ 0.25	4
*HD3	LYS	22	--	H	CYX	23	: 4.43	: .....+.....	0.10	< 0.00>	0.10	/ 0.10	1
*HG3	LYS	22	--	H	CYX	23	: 4.85	: ...+...+...+...+	0.10	< 0.02>	0.08	/ 0.14	8
H	LYS	22	--	H	VAL	31	: 4.57	: .....+.....	0.07	< 0.00>	0.07	/ 0.08	2
H	CYX	23	--	HB3	CYX	23	: 3.28	: ***.*...*.*...*	0.21	< 0.03>	0.15	/ 0.26	12
HG12	ILE	24	--	H	GLY	25	: 5.50	: .....+.....	0.07	< 0.00>	0.07	/ 0.07	1
*HD13	ILE	24	--	H	GLY	25	: 6.61	: ...+...+...+...+	0.11	< 0.00>	0.11	/ 0.11	1

HA	IIE	24	--	H	GLU	26	:	5.22	:	..-.-.-.....	0.08	<	0.00>	0.08	/	0.09	3
HA2	GLY	25	--	H	GLU	27	:	4.98	:	.-.....	0.10	<	0.00>	0.10	/	0.10	1
HA	GLU	26	--	HG3	GLU	26	:	3.53	:	++++-.....+++..+	0.14	<	0.03>	0.08	/	0.17	10
H	GLU	26	--	HG2	GLU	26	:	3.96	:	.....	0.09	<	0.00>	0.09	/	0.09	1
HA	GLU	26	--	HG2	GLU	26	:	3.53	:	..+++..+.....+..+	0.14	<	0.03>	0.10	/	0.19	7
H	GLU	27	--	HG2	GLU	27	:	4.44	:	.....+..+..*	0.17	<	0.05>	0.12	/	0.23	3
H	GLU	27	--	HG3	GLU	27	:	4.44	:	.....-.-..	0.08	<	0.01>	0.07	/	0.09	3
HB3	GLU	27	--	H	CYX	28	:	3.79	:	.....+.....-.-..	0.12	<	0.04>	0.10	/	0.16	3
H	CYX	28	--	HB2	CYX	28	:	3.20	:	.....	0.10	<	0.00>	0.10	/	0.10	1
H	LYS	29	--	*HG3	LYS	29	:	4.71	:	.....-.-..	0.09	<	0.01>	0.08	/	0.10	2
HA	LYS	29	--	*HD3	LYS	29	:	3.97	:	.....-.-..	0.08	<	0.00>	0.08	/	0.08	1
H	LYS	29	--	HB3	LYS	29	:	3.71	:	..+.....-.-..	0.10	<	0.03>	0.07	/	0.15	6
*HD3	LYS	29	--	H	CYX	30	:	5.08	:	.....+	0.12	<	0.00>	0.12	/	0.12	1
H	CYX	30	--	*HG23	VAL	31	:	6.29	:	.....	0.08	<	0.00>	0.08	/	0.08	1
*HG13	VAL	31	--	*HG3	PRO	32	:	5.69	:	..+.....-.-..	0.09	<	0.01>	0.07	/	0.12	8
HD2	PRO	32	--	H	TYR	33	:	5.50	:	..+.....-.-..+..+..-.-	0.09	<	0.02>	0.07	/	0.12	10



Resultados para el afinamiento de R7A (2MEL).

#	Filename	nvio	0.1- 0.2- 0.3-					Amber energy	Constraint	b-dev	a-dev	align	Distance	Torsion	Noesy	
			max <0.1	0.2	0.3	0.4	>0.4									
1	min_01.o	36	0.78	10	13	10	0	2	-35182.19	47.46	0.0000	0.00	0.00	43.257	4.200	0.000
2	min_02.o	39	0.57	15	12	9	1	2	-36799.54	35.47	0.0000	0.00	0.00	31.270	4.200	0.000
3	min_03.o	31	0.77	7	12	9	1	2	-38708.48	42.55	0.0000	0.00	0.00	38.267	4.287	0.000
4	min_04.o	38	0.78	10	17	7	2	2	-38056.76	46.96	0.0000	0.00	0.00	42.681	4.275	0.000
5	min_05.o	44	0.55	11	20	8	3	2	-37315.25	42.65	0.0000	0.00	0.00	38.353	4.296	0.000
6	min_06.o	36	0.74	7	16	9	2	2	-36353.82	43.23	0.0000	0.00	0.00	39.056	4.173	0.000
7	min_07.o	37	0.72	7	15	11	2	2	-38415.19	45.66	0.0000	0.00	0.00	41.311	4.354	0.000
8	min_08.o	37	0.76	11	15	6	3	2	-35927.36	44.23	0.0000	0.00	0.00	39.991	4.242	0.000
9	min_09.o	42	0.59	10	20	9	1	2	-35309.39	41.38	0.0000	0.00	0.00	37.173	4.210	0.000
10	min_10.o	37	0.72	9	16	9	0	3	-37596.60	44.81	0.0000	0.00	0.00	40.498	4.310	0.000
11	min_11.o	32	0.83	3	17	9	1	2	-37618.45	46.27	0.0000	0.00	0.00	41.943	4.328	0.000
12	min_12.o	40	0.69	10	17	10	1	2	-39133.02	46.39	0.0000	0.00	0.00	41.978	4.409	0.000
13	min_13.o	32	0.81	9	10	9	2	2	-36921.18	45.79	0.0000	0.00	0.00	41.292	4.502	0.000
14	min_14.o	35	0.79	11	12	7	3	2	-36306.38	46.66	0.0000	0.00	0.00	42.356	4.303	0.000
15	min_15.o	33	0.77	7	13	9	2	2	-36249.32	45.97	0.0000	0.00	0.00	41.589	4.381	0.000
16	min_16.o	37	0.76	8	17	7	2	3	-36885.12	44.65	0.0000	0.00	0.00	40.481	4.168	0.000
17	min_17.o	31	0.74	6	11	10	2	2	-36064.03	45.55	0.0000	0.00	0.00	41.166	4.382	0.000
18	min_18.o	43	0.79	19	13	8	1	2	-37407.51	45.03	0.0000	0.00	0.00	40.854	4.173	0.000
19	min_19.o	33	0.71	7	14	8	2	2	-34211.49	43.78	0.0000	0.00	0.00	39.544	4.239	0.000
20	min_20.o	34	0.63	6	16	8	1	3	-37151.41	40.75	0.0000	0.00	0.00	36.637	4.113	0.000
Averages:								-36880.62	44.26	0.0000	0.00	0.00	39.985	4.277	0.000	

Distance and angle violations:

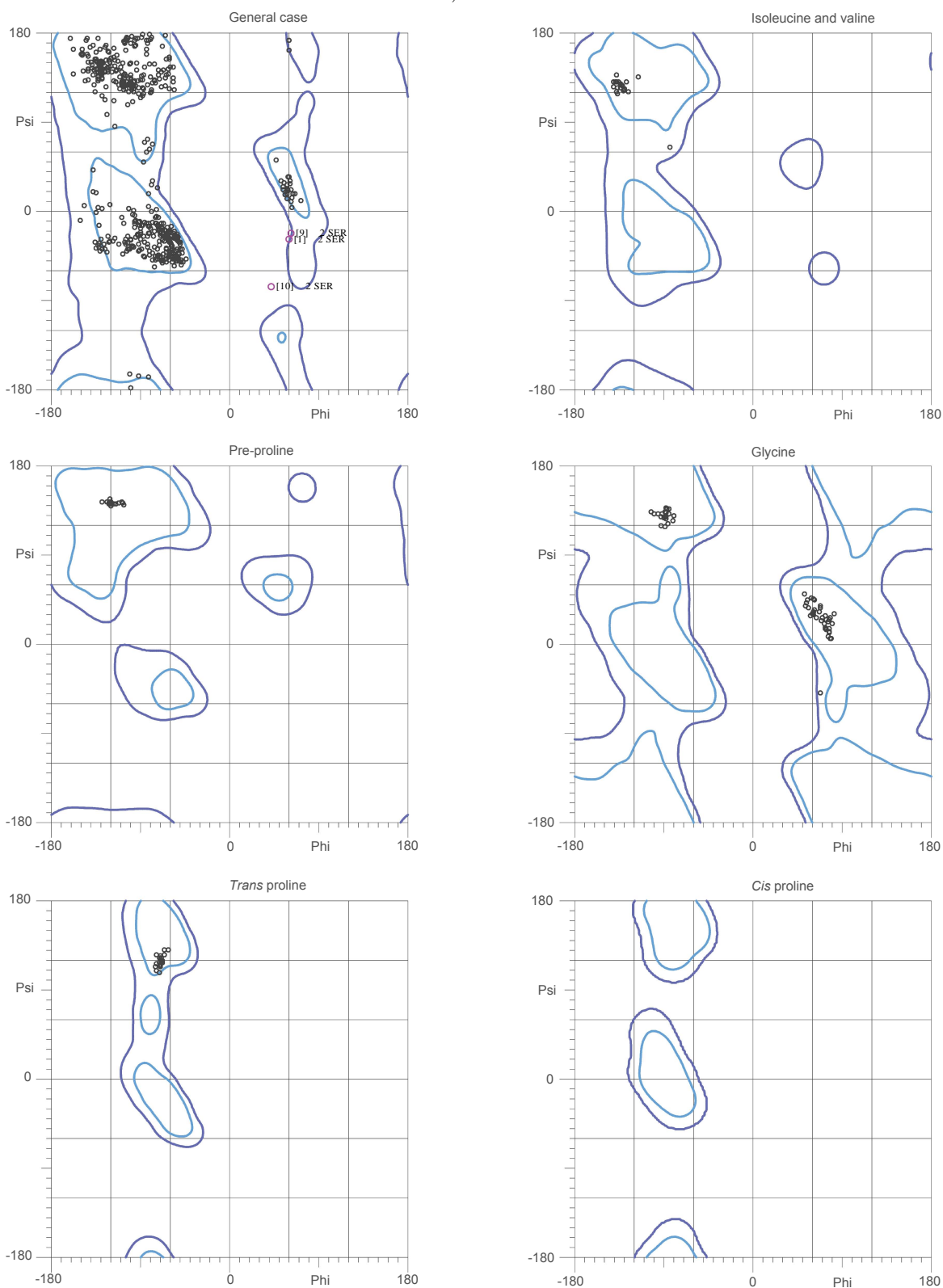
First atom	Last atom	target	Key:	Stats: Ave	<std>	min/max/#
CA	SER	2 -- C	SER 2 : 105.00 : @@@@@@@@.e.@@@@@@@@	117.32	< 16.64>	84.15 / 137.30 18
CA	ALA	3 -- C	ALA 3 : 55.00 : @e.@@@@@@@@@.e.@@@	111.57	< 15.39>	84.53 / 140.75 17
CA	PHE	4 -- C	PHE 4 : 55.00 : ..@e..@e.@@@@@@@@.e	101.41	< 10.39>	85.80 / 119.98 13
CA	CYX	5 -- C	CYX 5 : 55.00 : @.@@@@@.e.e.@@@.e	102.22	< 8.67>	87.17 / 115.16 12
CA	ASN	6 -- C	ASN 6 : 55.00 : @@@@@@.@@@@@.@@@	99.83	< 10.44>	88.02 / 119.00 17
CA	LEU	7 -- C	LEU 7 : 105.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@	136.72	< 2.29>	130.87 / 139.45 20
CA	ARG	8 -- C	ARG 8 : 105.00 : @.@@@@.@@@@@.e.e	124.53	< 10.58>	86.67 / 132.83 16
CA	ALA	9 -- C	ALA 9 : 185.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@	133.31	< 4.61>	121.03 / 139.03 20
CA	CYX	10 -- C	CYX 10 : 185.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@	126.68	< 3.34>	118.26 / 132.70 20
CA	GLU	11 -- C	GLU 11 : 185.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@	129.73	< 5.31>	120.26 / 136.92 20
CA	LEU	12 -- C	LEU 12 : 185.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@	124.03	< 10.35>	104.07 / 139.55 20
CA	SER	13 -- C	SER 13 : 105.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@	131.86	< 5.60>	120.62 / 138.66 20
CA	CYX	14 -- C	CYX 14 : 105.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@	128.26	< 2.82>	124.04 / 134.03 20
CA	ARG	15 -- C	ARG 15 : 105.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@	130.44	< 4.64>	117.76 / 138.26 20
CA	SER	16 -- C	SER 16 : 105.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@	129.40	< 5.48>	120.28 / 139.72 20
CA	LEU	17 -- C	LEU 17 : 105.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@	114.87	< 7.44>	97.41 / 130.29 20
CA	LEU	19 -- C	LEU 19 : 55.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@	120.65	< 5.07>	112.69 / 137.11 20
CA	LEU	20 -- C	LEU 20 : 55.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@	84.87	< 1.62>	83.88 / 86.75 3
CA	LYS	22 -- C	LYS 22 : 55.00 : @@@e.@e.e.@@@@@	93.78	< 6.26>	84.45 / 109.71 15
CA	CYX	23 -- C	CYX 23 : 55.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@	82.72	< 0.00>	82.72 / 82.72 1
CA	ILE	24 -- C	ILE 24 : 55.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@	83.71	< 0.00>	83.71 / 83.71 1
CA	GLU	26 -- C	GLU 26 : 105.00 : @.@@.@@.@@.@@@	90.61	< 7.12>	82.62 / 106.38 12
CA	GLU	27 -- C	GLU 27 : 55.00 : @@@.@@@@@@@@@.e	94.74	< 7.95>	86.15 / 113.46 17
CA	CYX	28 -- C	CYX 28 : 55.00 : @.e.@.@@.e.e.@@	87.13	< 4.25>	83.31 / 95.89 9
CA	LYS	29 -- C	LYS 29 : 55.00 : @@@@@@@@@@.@@@@@	90.71	< 5.82>	83.46 / 107.20 19
CA	CYX	30 -- C	CYX 30 : 55.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@	84.42	< 0.00>	84.42 / 84.42 1
CG	LEU	7 -- H	ARG 8 : 4.19 : -+++++*+*+*+*+*+*	0.16	< 0.08>	0.09 / 0.34 20
CG	LEU	7 -- H	CYX 10 : 5.01 : -+++++*+*+*+*+*+*	0.08	< 0.00>	0.07 / 0.08 3
CG	LEU	7 -- HB2	CYX 10 : 4.60 : -+++++*+*+*+*+*+*	0.08	< 0.01>	0.07 / 0.09 5
CG	LEU	7 -- HG3	GLU 11 : 4.40 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.11	< 0.00>	0.10 / 0.11 3
CG	LEU	7 -- HG2	GLU 11 : 4.40 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.10	< 0.03>	0.09 / 0.14 4
CG	LEU	7 -- H	GLU 11 : 4.29 : *+*+*+*+*+*+*+*+*	0.19	< 0.07>	0.07 / 0.28 18
CG	LEU	7 -- HA	LYS 22 : 3.33 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.19	< 0.06>	0.12 / 0.24 5
CG	LEU	7 -- H	LYS 22 : 5.38 : -+++++*+*+*+*+*+*	0.11	< 0.03>	0.07 / 0.13 4
CG	LEU	7 -- H	CYX 23 : 3.49 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.18	< 0.07>	0.07 / 0.32 18
CG	LEU	19 -- H	LEU 20 : 3.64 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.19	< 0.03>	0.13 / 0.23 20
CG	LEU	19 -- H	CYX 30 : 5.11 : 000000000000000000	0.65	< 0.06>	0.55 / 0.79 20
CG	LEU	19 -- HA	CYX 30 : 4.32 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.27	< 0.02>	0.23 / 0.31 20
CG	LEU	19 -- HB2	CYX 30 : 3.60 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.11	< 0.04>	0.08 / 0.14 2
CG	LEU	19 -- HD3	PRO 32 : 4.33 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.25	< 0.05>	0.13 / 0.32 20
CG	LEU	19 -- H	TYR 33 : 3.85 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.34	< 0.07>	0.20 / 0.44 20
HA	ASN	6 -- CG	LEU 7 : 5.50 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.22	< 0.05>	0.09 / 0.29 19
H	LEU	7 -- CG	LEU 7 : 3.94 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.15	< 0.06>	0.08 / 0.25 18
*HD3	ARG	8 -- CG	LEU 12 : 6.17 : -+++++*+*+*+*+*+*	0.09	< 0.01>	0.08 / 0.11 3
HE	ARG	8 -- CG	LEU 12 : 5.04 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.11	< 0.03>	0.08 / 0.15 5
H	ALA	9 -- CG	LEU 12 : 4.82 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.25	< 0.09>	0.07 / 0.35 20
HA	ALA	9 -- CG	LEU 12 : 3.30 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.09	< 0.00>	0.09 / 0.09 1
*HB3	CYX	14 -- CG	LEU 19 : 4.47 : -+++++*+*+*+*+*+*	0.09	< 0.01>	0.07 / 0.11 13
HG	LEU	17 -- CG	LEU 19 : 3.91 : 0.00.0.0.0000000000	0.75	< 0.05>	0.64 / 0.83 15
H	LEU	17 -- CG	LEU 19 : 4.58 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.24	< 0.04>	0.16 / 0.30 20
*HD23	LEU	17 -- CG	LEU 19 : 4.71 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.30	< 0.13>	0.14 / 0.54 20
H	SER	2 -- H	ALA 3 : 4.50 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.12	< 0.00>	0.12 / 0.12 1
H	ALA	3 -- H	PHE 4 : 4.40 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.11	< 0.00>	0.11 / 0.11 1
HA	ALA	3 -- H	PHE 4 : 3.00 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.15	< 0.00>	0.15 / 0.15 2
HA	PHE	4 -- H	CYX 5 : 2.82 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.13	< 0.00>	0.13 / 0.13 1
HB3	PHE	4 -- H	CYX 5 : 4.22 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.18	< 0.07>	0.13 / 0.23 2
HB2	PHE	4 -- H	CYX 5 : 4.22 : *+*+*+*+*+*+*+*+*	0.14	< 0.04>	0.10 / 0.20 5
H	CYX	5 -- HB2	CYX 5 : 3.62 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.16	< 0.05>	0.11 / 0.22 4
HA	CYX	5 -- HB2	ASN 6 : 4.44 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.19	< 0.08>	0.14 / 0.25 2
H	CYX	5 -- HA	GLU 26 : 4.13 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.11	< 0.03>	0.09 / 0.15 4
HB3	CYX	5 -- HA	GLU 27 : 5.50 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.11	< 0.00>	0.11 / 0.11 1
HB3	ASN	6 -- H	LEU 7 : 3.63 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.10	< 0.00>	0.10 / 0.10 1
HB2	ASN	6 -- H	ALA 9 : 4.29 : -+++++*+*+*+*+*+*	0.13	< 0.03>	0.07 / 0.17 16
HB2	ASN	6 -- *HB3	ALA 9 : 3.76 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.15	< 0.04>	0.10 / 0.19 13
HB3	ASN	6 -- H	CYX 10 : 3.94 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.13	< 0.03>	0.09 / 0.16 5
HB3	LEU	7 -- HG	LEU 7 : 2.69 : *+*+*+*+*+*+*+*+*	0.27	< 0.01>	0.25 / 0.28 15
HB3	LEU	7 -- HA	ARG 8 : 4.51 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.09	< 0.01>	0.08 / 0.09 3
H	LEU	7 -- *HB3	ALA 9 : 4.98 : -+++++*+*+*+*+*+*	0.10	< 0.02>	0.07 / 0.15 11
HA	LEU	7 -- HA	GLU 11 : 5.50 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.20	< 0.05>	0.11 / 0.28 17
H	LEU	7 -- H	GLU 11 : 5.43 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.10	< 0.02>	0.07 / 0.12 7
*HG3	ARG	8 -- H	CYX 10 : 6.17 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.19	< 0.05>	0.10 / 0.26 7
HA	ARG	8 -- HA	GLU 11 : 5.50 : ++++++*+*+*+*+*+*	0.13	< 0.05>	0.10 / 0.18 3

H	ALA	9	--	HB2	CYX	10	:	4.73	:	+.++++.+++++.+.+.+	0.14	<	0.03>	0.08	/	0.19	13
HA	ALA	9	--	H	GLU	11	:	4.80	:	.....	0.07	<	0.00>	0.07	/	0.07	1
HB2	CYX	10	--	H	GLU	11	:	3.69	:	.....+	0.11	<	0.00>	0.11	/	0.11	1
HB3	CYX	10	--	*HB3	CYX	14	:	5.83	:	.....	0.08	<	0.01>	0.07	/	0.10	3
HA	GLU	11	--	HG3	GLU	11	:	3.59	:	.....	0.07	<	0.00>	0.07	/	0.07	1
HB2	GLU	11	--	HG2	GLU	11	:	2.93	:	.....+	0.09	<	0.01>	0.07	/	0.10	4
HA	GLU	11	--	H	LYS	22	:	5.50	:	.....+	0.11	<	0.01>	0.10	/	0.12	2
H	LEU	12	--	HA	SER	13	:	5.25	:	-.+.-+.-+.-+.-+.	0.09	<	0.01>	0.07	/	0.12	12
HA	LEU	12	--	HB3	ARG	15	:	3.45	:	.....	0.09	<	0.00>	0.09	/	0.09	1
HA	LEU	12	--	*HD3	ARG	15	:	4.71	:	.....+	0.11	<	0.04>	0.07	/	0.17	6
HA	CYX	14	--	HG	LEU	19	:	4.42	:	.....	0.09	<	0.00>	0.09	/	0.09	1
*HB3	CYX	14	--	HG	LEU	19	:	4.40	:	.....+	0.11	<	0.01>	0.11	/	0.12	3
*HB3	CYX	14	--	H	LYS	22	:	5.39	:	.....+	0.11	<	0.01>	0.10	/	0.12	3
H	ARG	15	--	HA	SER	16	:	5.25	:	++-+-----+-----+.	0.11	<	0.02>	0.07	/	0.15	17
*HG3	ARG	15	--	H	SER	16	:	4.80	:	.....*	0.13	<	0.09>	0.08	/	0.26	4
HA	ARG	15	--	H	LEU	19	:	3.33	:	.....	0.07	<	0.00>	0.07	/	0.07	1
H	SER	16	--	H	LEU	19	:	4.72	:	.....	0.07	<	0.00>	0.07	/	0.07	1
*HB3	SER	16	--	H	LEU	19	:	6.17	:	+.....*.*.*.	0.18	<	0.07>	0.12	/	0.27	4
HA	LEU	17	--	*HD23	LEU	17	:	3.58	:	*.*.*.*.*.*.*.*.	0.21	<	0.04>	0.17	/	0.28	5
HA	LEU	17	--	HG	LEU	17	:	3.27	:	*.*.*.*.*.*.*.*.	0.35	<	0.01>	0.34	/	0.38	5
H	LEU	17	--	*HB3	LEU	17	:	3.46	:	.....+	0.10	<	0.03>	0.07	/	0.15	5
*HB3	LEU	17	--	H	LEU	19	:	4.23	:	.....+	0.10	<	0.02>	0.08	/	0.13	5
HA	LEU	17	--	HG	LEU	19	:	4.51	:	*-.*.*.*.*.*.*.*.	0.13	<	0.06>	0.07	/	0.22	13
HA	LEU	19	--	HG	LEU	19	:	3.57	:	---+---+---+---+---+.	0.12	<	0.02>	0.09	/	0.14	17
H	LEU	19	--	HG	LEU	19	:	3.17	:	.....+---+---+---+.	0.13	<	0.03>	0.09	/	0.18	7
HA	LEU	19	--	*HD2	TYR	33	:	4.85	:	.....+	0.09	<	0.02>	0.08	/	0.11	5
*HB3	LEU	20	--	HA	CYX	30	:	5.19	:	.....+	0.09	<	0.02>	0.07	/	0.11	3
H	LEU	20	--	HB2	CYX	30	:	5.40	:	.....+---+---+---+.	0.11	<	0.02>	0.09	/	0.14	13
*HD13	LEU	20	--	HA	TYR	33	:	6.61	:	.....	0.08	<	0.01>	0.07	/	0.10	6
*HD23	LEU	20	--	HA	TYR	33	:	6.61	:	.....	0.09	<	0.00>	0.09	/	0.09	1
H	GLY	21	--	H	LYS	22	:	4.44	:	.....	0.08	<	0.01>	0.08	/	0.09	2
H	LYS	22	--	*HD3	LYS	22	:	4.38	:	+++-----+-----+.	0.12	<	0.04>	0.07	/	0.23	19
*HG3	LYS	22	--	H	CYX	23	:	4.85	:	++.*-----+-----+.	0.17	<	0.05>	0.09	/	0.27	19
H	CYX	23	--	HB3	CYX	23	:	3.15	:	.....+	0.14	<	0.03>	0.12	/	0.16	2
HB2	CYX	23	--	H	ILE	24	:	4.50	:	.....+	0.10	<	0.03>	0.08	/	0.12	2
*HD13	ILE	24	--	H	GLY	25	:	6.10	:	.....+	0.08	<	0.01>	0.07	/	0.10	4
HG12	ILE	24	--	H	GLY	25	:	5.50	:	.....+	0.13	<	0.00>	0.13	/	0.13	1
HG13	ILE	24	--	H	GLY	25	:	5.50	:	.....	0.08	<	0.00>	0.08	/	0.08	1
*HG23	ILE	24	--	H	GLU	27	:	6.05	:	.....	0.08	<	0.00>	0.08	/	0.08	1
H	ILE	24	--	H	LYS	29	:	4.30	:	.....+	0.12	<	0.06>	0.08	/	0.17	2
H	GLY	25	--	HA3	GLY	25	:	2.83	:	.....	0.08	<	0.00>	0.08	/	0.08	1
HA2	GLY	25	--	H	GLU	26	:	2.95	:	.....*	0.39	<	0.00>	0.39	/	0.39	1
HA2	GLY	25	--	H	GLU	27	:	4.55	:	.....+	0.12	<	0.03>	0.10	/	0.14	2
HA	GLU	26	--	HG3	GLU	26	:	3.41	:	.....*.*.*.*.	0.18	<	0.04>	0.15	/	0.23	3
H	GLU	26	--	*HB3	GLU	26	:	3.81	:	.....	0.08	<	0.00>	0.08	/	0.08	1
H	GLU	27	--	HB3	GLU	27	:	3.66	:	.....+	0.09	<	0.03>	0.07	/	0.13	4
H	GLU	27	--	HG2	GLU	27	:	4.97	:	.....+	0.12	<	0.00>	0.12	/	0.12	1
HG3	GLU	27	--	H	CYX	28	:	5.03	:	.....+	0.12	<	0.00>	0.12	/	0.12	1
H	CYX	28	--	HB3	CYX	28	:	3.13	:	.....*	0.27	<	0.00>	0.27	/	0.27	1
H	CYX	28	--	H	LYS	29	:	4.54	:	.....	0.07	<	0.00>	0.07	/	0.07	2
H	LYS	29	--	*HE3	LYS	29	:	6.17	:	.....	0.07	<	0.00>	0.07	/	0.07	1
H	LYS	29	--	HB3	LYS	29	:	3.67	:	.....+---+---+---+.	0.10	<	0.02>	0.08	/	0.14	10
H	LYS	29	--	*HD3	LYS	29	:	5.35	:	.....	0.08	<	0.00>	0.08	/	0.08	1
HB3	LYS	29	--	H	CYX	30	:	4.12	:	.....	0.08	<	0.00>	0.08	/	0.08	1
HB2	LYS	29	--	H	CYX	30	:	4.12	:	.....	0.09	<	0.00>	0.09	/	0.10	3
HB3	CYX	30	--	*HG23	VAL	31	:	6.27	:	.....	0.08	<	0.01>	0.08	/	0.09	4
H	CYX	30	--	*HG23	VAL	31	:	6.61	:	.....	0.10	<	0.00>	0.10	/	0.10	1
HB	VAL	31	--	HD3	PRO	32	:	3.44	:	++++*-----+-----+.	0.16	<	0.03>	0.11	/	0.22	20
*HG23	VAL	31	--	H	TYR	33	:	6.02	:	.....	0.08	<	0.02>	0.07	/	0.09	2
*HG23	VAL	31	--	*HD2	TYR	33	:	5.88	:	.....+	0.10	<	0.02>	0.07	/	0.12	5
HB2	PRO	32	--	H	TYR	33	:	3.67	:	.....+	0.10	<	0.03>	0.07	/	0.14	6
H	TYR	33	--	*HD2	TYR	33	:	4.00	:	*.....+.....	0.17	<	0.06>	0.14	/	0.24	3



# MolProbity Ramachandran analysis

2MEL, all models



95.8% (594/620) of all residues were in favored (98%) regions.  
99.5% (617/620) of all residues were in allowed (>99.8%) regions.

There were 3 outliers (phi, psi):

[1] 2 SER (60.5, -28.7)

[9] 2 SER (62.6, -22.6)

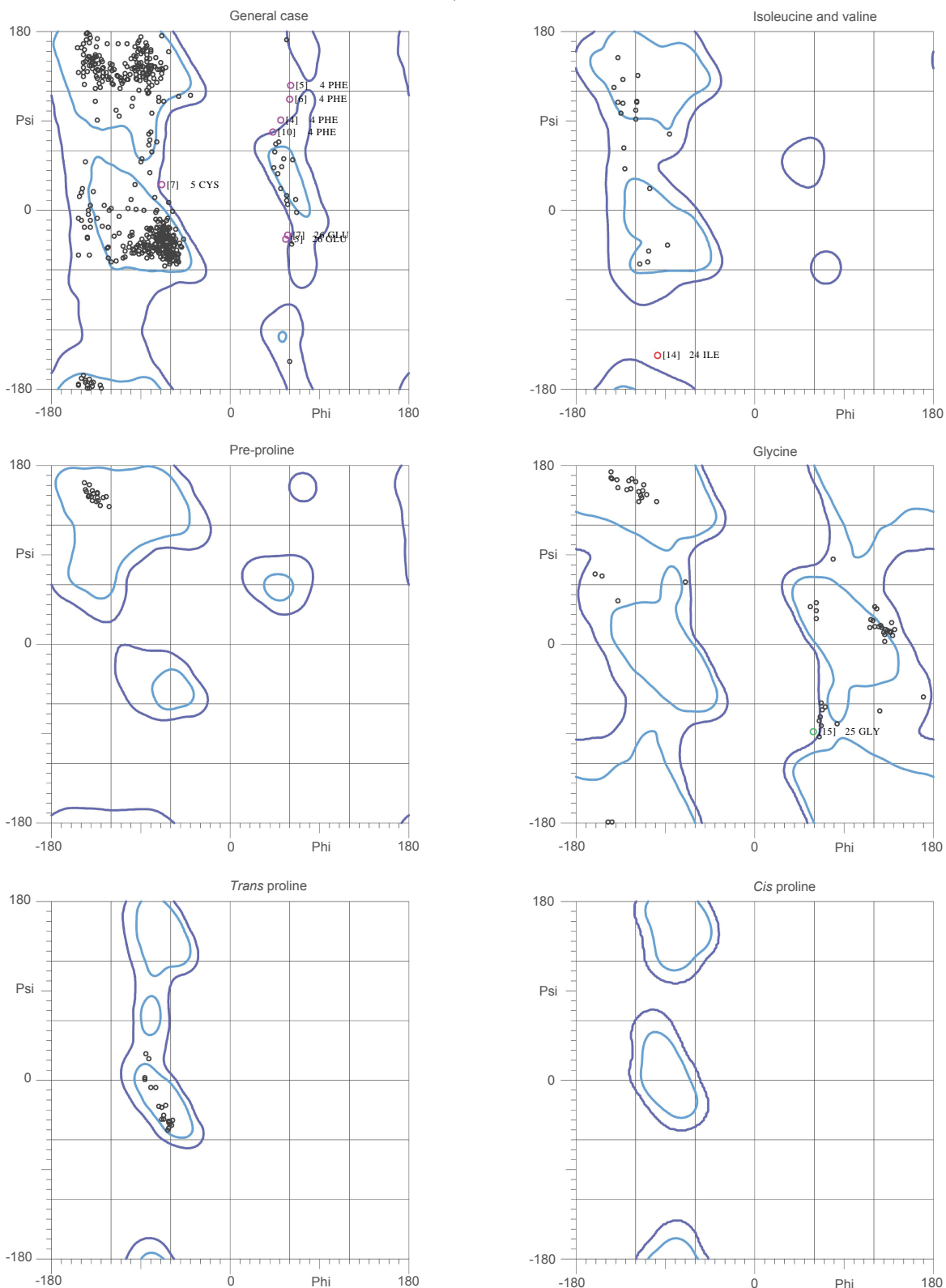
[10] 2 SER (42.2, -76.6)



HA	GLU	26	--	HG2	GLU	26	:	3.60	:	.....-.....-..+..	0.11	<	0.03>	0.09	/	0.16	5
HG3	GLU	26	--	H	GLU	27	:	5.50	:	*.....+.....-.....	0.15	<	0.07>	0.07	/	0.20	3
H	GLU	27	--	HB2	GLU	27	:	3.78	:	.....-.....-.....	0.07	<	0.00>	0.07	/	0.07	1
HG2	GLU	27	--	H	CYX	28	:	4.61	:	.....-.....-.....+	0.11	<	0.02>	0.10	/	0.13	2
HG3	GLU	27	--	H	CYX	28	:	4.61	:	.....-.....-.....+	0.15	<	0.00>	0.15	/	0.15	1
*HG3	LYS	29	--	HB2	CYX	30	:	6.17	:	-.....-.....-.....	0.09	<	0.00>	0.09	/	0.09	1
*HG3	PRO	32	--	H	TYR	33	:	4.19	:	.....-.....-.....+	0.09	<	0.02>	0.08	/	0.11	2

# MolProbity Ramachandran analysis

2MEN, all models



87.7% (544/620) of all residues were in favored (98%) regions.  
 98.5% (611/620) of all residues were in allowed (>99.8%) regions.

There were 9 outliers (phi, psi):

[4] 4 PHE (51.1, 91.7)  
 [5] 4 PHE (61.0, 126.2)

[5] 26 GLU (56.1, -29.4)  
 [6] 4 PHE (60.5, 112.0)  
 [7] 5 CYS (-69.8, 26.7)  
 [7] 26 GLU (59.0, -25.5)  
 [10] 4 PHE (43.1, 79.4)  
 [14] 24 ILE (-98.2, -146.7)  
 [15] 25 GLY (59.2, -88.8)

## Resultados para el afinamiento de R6A/R7A (2MEO).

#	Filename	nvio	max	<0.1	0.2	0.3	0.4	>0.4	Amber energy	Constraint	b-dev	a-dev	align	Distance	Torsion	Noesy
1	min_01.o	11	0.26	10	0	1	0	0	-34794.00	7.10	0.0000	0.00	0.00	3.052	4.050	0.000
2	min_02.o	3	0.12	1	2	0	0	0	-35666.61	5.35	0.0000	0.00	0.00	1.232	4.116	0.000
3	min_03.o	8	0.16	2	6	0	0	0	-35365.67	7.34	0.0000	0.00	0.00	2.917	4.420	0.000
4	min_04.o	10	0.42	3	5	1	0	1	-37293.27	11.01	0.0000	0.00	0.00	6.807	4.201	0.000
5	min_05.o	6	0.12	4	2	0	0	0	-33237.25	6.18	0.0000	0.00	0.00	1.683	4.494	0.000
6	min_06.o	7	0.23	4	2	1	0	0	-34722.36	6.60	0.0000	0.00	0.00	2.561	4.041	0.000
7	min_07.o	5	0.13	4	1	0	0	0	-35966.00	5.38	0.0000	0.00	0.00	1.440	3.936	0.000
8	min_08.o	7	0.29	1	5	1	0	0	-33650.61	8.12	0.0000	0.00	0.00	3.948	4.171	0.000
9	min_09.o	4	0.16	0	4	0	0	0	-37796.60	6.06	0.0000	0.00	0.00	1.827	4.231	0.000
10	min_10.o	8	0.26	4	3	1	0	0	-32111.75	7.39	0.0000	0.00	0.00	3.137	4.254	0.000
11	min_11.o	9	0.21	4	4	1	0	0	-32602.70	7.79	0.0000	0.00	0.00	3.391	4.396	0.000
12	min_12.o	8	0.14	4	4	0	0	0	-35117.59	5.94	0.0000	0.00	0.00	2.055	3.886	0.000
13	min_13.o	6	0.16	2	4	0	0	0	-35510.03	6.48	0.0000	0.00	0.00	2.398	4.083	0.000
14	min_14.o	6	0.25	2	3	1	0	0	-36414.10	7.93	0.0000	0.00	0.00	3.516	4.414	0.000
15	min_15.o	8	0.15	1	7	0	0	0	-33413.42	6.96	0.0000	0.00	0.00	2.677	4.286	0.000
16	min_16.o	9	0.17	3	6	0	0	0	-37521.64	7.63	0.0000	0.00	0.00	3.415	4.215	0.000
17	min_17.o	10	0.19	4	6	0	0	0	-35141.68	8.00	0.0000	0.00	0.00	3.786	4.212	0.000
18	min_18.o	5	0.11	2	3	0	0	0	-37958.58	5.49	0.0000	0.00	0.00	1.620	3.872	0.000
19	min_19.o	8	0.13	3	5	0	0	0	-37113.50	6.21	0.0000	0.00	0.00	2.112	4.094	0.000
20	min_20.o	7	0.14	5	2	0	0	0	-37038.59	5.80	0.0000	0.00	0.00	1.655	4.150	0.000

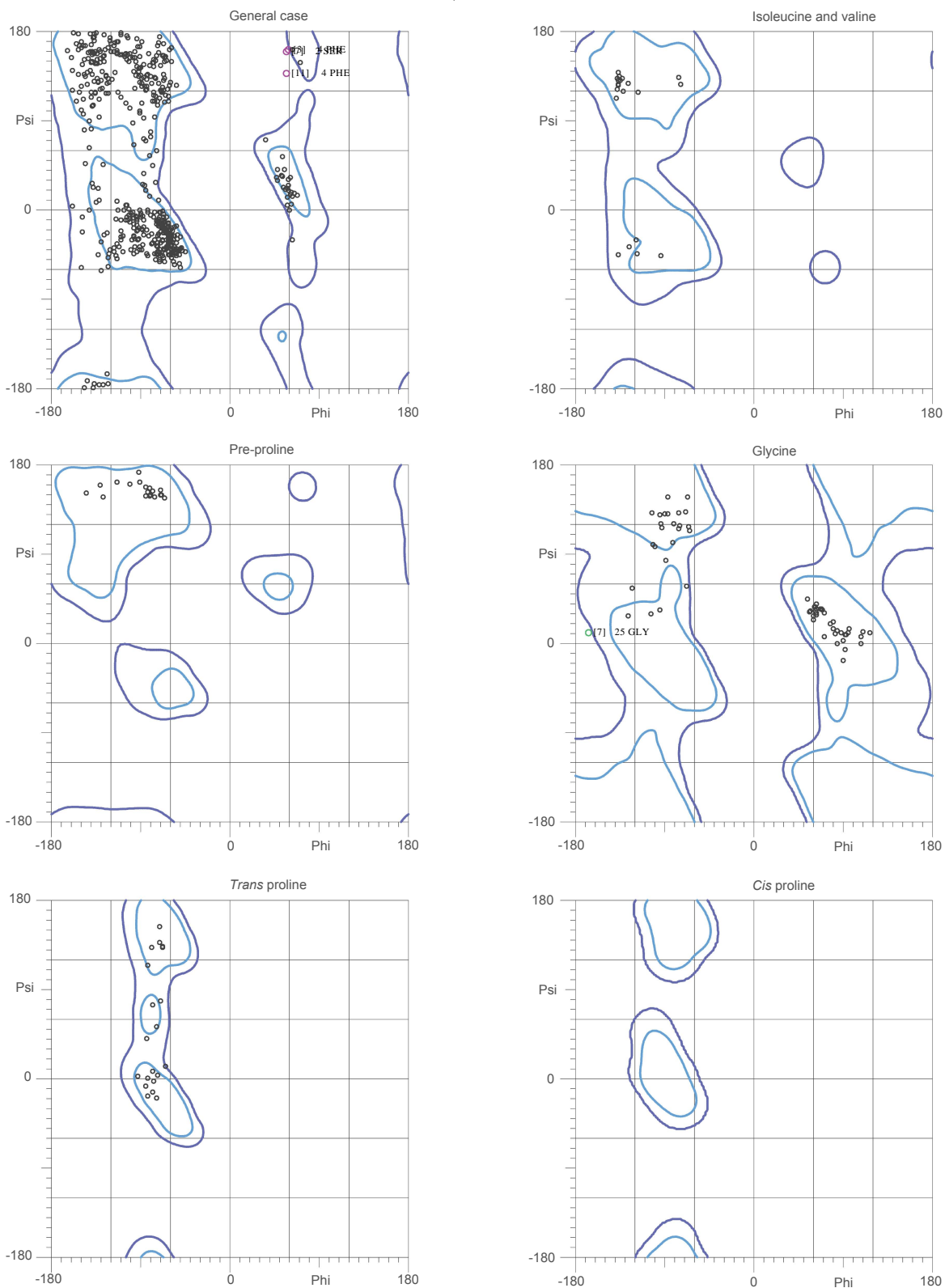
Averages: -35421.80 6.94 0.0000 0.00 0.00 2.761 4.176 0.000

## Distance and angle violations:

First atom	Last atom	target	Key: . = 0.0 - <= 0.1 + <= 0.2 * <= 0.5 0 <= 1.0 8 <= 2.0 @ > 2.0	Stats: Ave <std> min/max/#
CA SER 2	-- C SER 2	105.00	: @@@@. @@@@. @@@@. @	119.02 < 14.72> 86.34 / 137.94 14
CA ALA 3	-- C ALA 3	105.00	: @@@@. @@@@. @@@@. @	104.85 < 13.52> 84.84 / 124.08 12
CA PHE 4	-- C PHE 4	55.00	: @@@@ @@@@ @@@@ @@@@ @	98.37 < 10.27> 82.58 / 118.51 17
CA CYX 5	-- C CYX 5	55.00	: @. @. @. @. @. @. @. @	103.50 < 6.43> 92.02 / 109.44 7
CA ASN 6	-- C ASN 6	55.00	: @. @. @. @. @. @. @. @	96.72 < 0.00> 96.72 / 96.72 1
CA LEU 7	-- C LEU 7	105.00	: @@@@ @@@@ @@@@ @@@@ @	131.69 < 7.77> 112.73 / 139.17 20
CA ALA 8	-- C ALA 8	185.00	: @@@@ @@@@ @@@@ @@@@ @	123.24 < 10.37> 94.76 / 138.07 20
CA ALA 9	-- C ALA 9	105.00	: @@@@ @@@@ @@@@ @@@@ @	122.38 < 12.48> 94.28 / 137.91 20
CA CYX 10	-- C CYX 10	185.00	: @@@@ @@@@ @@@@ @@@@ @	130.74 < 5.82> 117.59 / 138.96 20
CA GLU 11	-- C GLU 11	185.00	: @@@@ @@@@ @@@@ @@@@ @	131.47 < 4.86> 119.50 / 136.29 20
CA LEU 12	-- C LEU 12	105.00	: @@@@ @@@@ @@@@ @@@@ @	123.40 < 10.01> 107.27 / 138.51 20
CA SER 13	-- C SER 13	105.00	: @@@@ @@@@ @@@@ @@@@ @	120.71 < 11.29> 103.53 / 135.64 19
CA CYX 14	-- C CYX 14	105.00	: @@@@ @@@@ @@@@ @@@@ @	133.08 < 5.11> 119.63 / 139.43 20
CA ARG 15	-- C ARG 15	105.00	: @@@@ @@@@ @@@@ @@@@ @	131.61 < 6.19> 119.59 / 138.51 20
CA SER 16	-- C SER 16	105.00	: @@@@ @@@@ @@@@ @@@@ @	121.20 < 8.53> 107.06 / 137.99 20
CA LEU 17	-- C LEU 17	105.00	: @@@@ @@@@ @@@@ @@@@ @	114.12 < 9.07> 95.56 / 133.00 20
CA LEU 19	-- C LEU 19	55.00	: @@@@ @@@@ @@@@ @@@@ @	119.10 < 10.47> 102.62 / 139.15 20
CA LEU 20	-- C LEU 20	55.00	: @. @. @. @. @. @. @. @	92.08 < 7.65> 82.69 / 109.94 12
CA LYS 22	-- C LYS 22	55.00	: @. @. @. @. @. @. @. @	102.95 < 8.55> 93.47 / 119.51 9
CA CYX 23	-- C CYX 23	55.00	: @. @. @. @. @. @. @. @	102.41 < 9.12> 94.10 / 122.93 8
CA ILE 24	-- C ILE 24	55.00	: @. @. @. @. @. @. @. @	124.19 < 19.66> 84.66 / 136.95 6
CA GLU 26	-- C GLU 26	105.00	: @@@@ @@@@ @@@@ @@@@ @	93.35 < 9.95> 82.98 / 116.91 12
CA GLU 27	-- C GLU 27	55.00	: @. @. @. @. @. @. @. @	101.56 < 8.14> 86.89 / 111.25 11
CA CYX 28	-- C CYX 28	55.00	: @. @. @. @. @. @. @. @	82.93 < 0.00> 82.93 / 82.93 1
CA LYS 29	-- C LYS 29	55.00	: @. @. @. @. @. @. @. @	107.34 < 13.41> 84.09 / 125.43 14
CA CYX 30	-- C CYX 30	55.00	: @@@@ @@@@ @@@@ @@@@ @	106.88 < 8.70> 96.08 / 124.62 20
H CYX 10	-- CG LEU 12	5.50	: -.+. -.+. -.+. -.+. -.+. .	0.12 < 0.02> 0.08 / 0.15 11
H ALA 3	-- H PHE 4	4.41	: -.+. -.+. -.+. -.+. -.+. .	0.08 < 0.00> 0.08 / 0.08 1
HA ALA 3	-- H PHE 4	3.05	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.14 < 0.05> 0.10 / 0.19 3
HB3 PHE 4	-- H CYX 5	4.03	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.11 < 0.00> 0.11 / 0.11 1
HA PHE 4	-- H CYX 5	2.81	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.07 < 0.00> 0.07 / 0.07 1
H CYX 5	-- HB2 CYX 5	3.34	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.13 < 0.02> 0.10 / 0.16 4
H CYX 5	-- HB3 CYX 5	3.34	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.09 < 0.00> 0.09 / 0.09 1
HA CYX 5	-- H ASN 6	2.63	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.14 < 0.00> 0.14 / 0.14 1
HA ASN 6	-- H LEU 7	2.66	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.09 < 0.00> 0.09 / 0.09 1
H LEU 7	-- HB3 ALA 8	5.18	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.08 < 0.00> 0.08 / 0.08 1
H CYX 10	-- HB2 CYX 10	2.96	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.07 < 0.00> 0.07 / 0.07 1
HB3 GLU 11	-- H LEU 12	3.76	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.10 < 0.00> 0.10 / 0.10 1
HB3 GLU 11	-- H GLY 21	4.80	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.11 < 0.00> 0.11 / 0.11 1
H SER 13	-- H CYX 14	2.56	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.08 < 0.00> 0.08 / 0.08 1
H CYX 14	-- H GLY 21	5.37	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.09 < 0.00> 0.08 / 0.09 3
H ARG 15	-- HG3 ARG 15	4.48	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.08 < 0.00> 0.08 / 0.08 3
HG LEU 17	-- H LEU 19	4.64	: -+. -.+. -.+. -.+. -.+. .	0.11 < 0.03> 0.07 / 0.19 16
*HD23 LEU 19	-- H LYS 22	6.61	: -.+. -.+. -.+. -.+. -.+. .	0.16 < 0.05> 0.09 / 0.26 14
HG LEU 19	-- H CYX 30	5.50	: -.+. -.+. -.+. -.+. -.+. .	0.11 < 0.05> 0.07 / 0.20 10
*HB3 LEU 19	-- HG23 VAL 31	4.27	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.26 < 0.14> 0.08 / 0.42 4
*HB3 LEU 19	-- H VAL 31	4.56	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.08 < 0.00> 0.08 / 0.08 1
H LEU 20	-- HG LEU 20	4.24	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.15 < 0.05> 0.11 / 0.18 2
H LEU 20	-- HB2 CYX 30	5.50	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.08 < 0.01> 0.07 / 0.09 6
H LEU 20	-- H VAL 31	3.52	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.09 < 0.01> 0.07 / 0.10 4
HA3 GLY 21	-- H LYS 22	3.36	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.12 < 0.02> 0.11 / 0.14 2
*HG3 LYS 22	-- H CYX 23	5.08	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.10 < 0.00> 0.10 / 0.10 1
H LYS 22	-- H VAL 31	4.22	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.08 < 0.02> 0.07 / 0.09 2
H CYX 23	-- HB3 CYX 23	3.52	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.10 < 0.02> 0.08 / 0.11 2
H ILE 24	-- HG13 ILE 24	4.15	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.11 < 0.05> 0.07 / 0.17 3
H GLU 26	-- HB3 GLU 26	3.69	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.09 < 0.01> 0.08 / 0.10 4
H GLU 27	-- HB3 GLU 27	3.49	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.11 < 0.02> 0.09 / 0.13 5
HG2 GLU 27	-- H CYX 28	5.50	: *..+. *..+. *..+. *..+. .	0.26 < 0.00> 0.26 / 0.26 1
H CYX 28	-- HB2 CYX 28	3.12	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.08 < 0.00> 0.08 / 0.08 1
H CYX 28	-- H LYS 29	4.33	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.11 < 0.02> 0.09 / 0.15 13
H LYS 29	-- HB3 LYS 29	3.76	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.08 < 0.01> 0.07 / 0.09 4
H LYS 29	-- H CYX 30	4.56	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.08 < 0.00> 0.08 / 0.08 1
HB2 LYS 29	-- H CYX 30	4.33	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.13 < 0.02> 0.12 / 0.14 2
H CYX 30	-- HB3 CYX 30	3.67	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.10 < 0.00> 0.10 / 0.10 3
H CYX 30	-- HG13 VAL 31	6.61	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.11 < 0.03> 0.09 / 0.15 3
*HG23 VAL 31	-- HD2 PRO 32	4.29	: ..+. ..+. ..+. ..+. ..+. .	0.11 < 0.03> 0.09 / 0.18 6

# MolProbity Ramachandran analysis

2MEO, all models



92.9% (576/620) of all residues were in favored (98%) regions.

99.4% (616/620) of all residues were in allowed (>99.8%) regions.

There were 4 outliers (phi, psi):

[3] 4 PHE (59.2, 162.3)

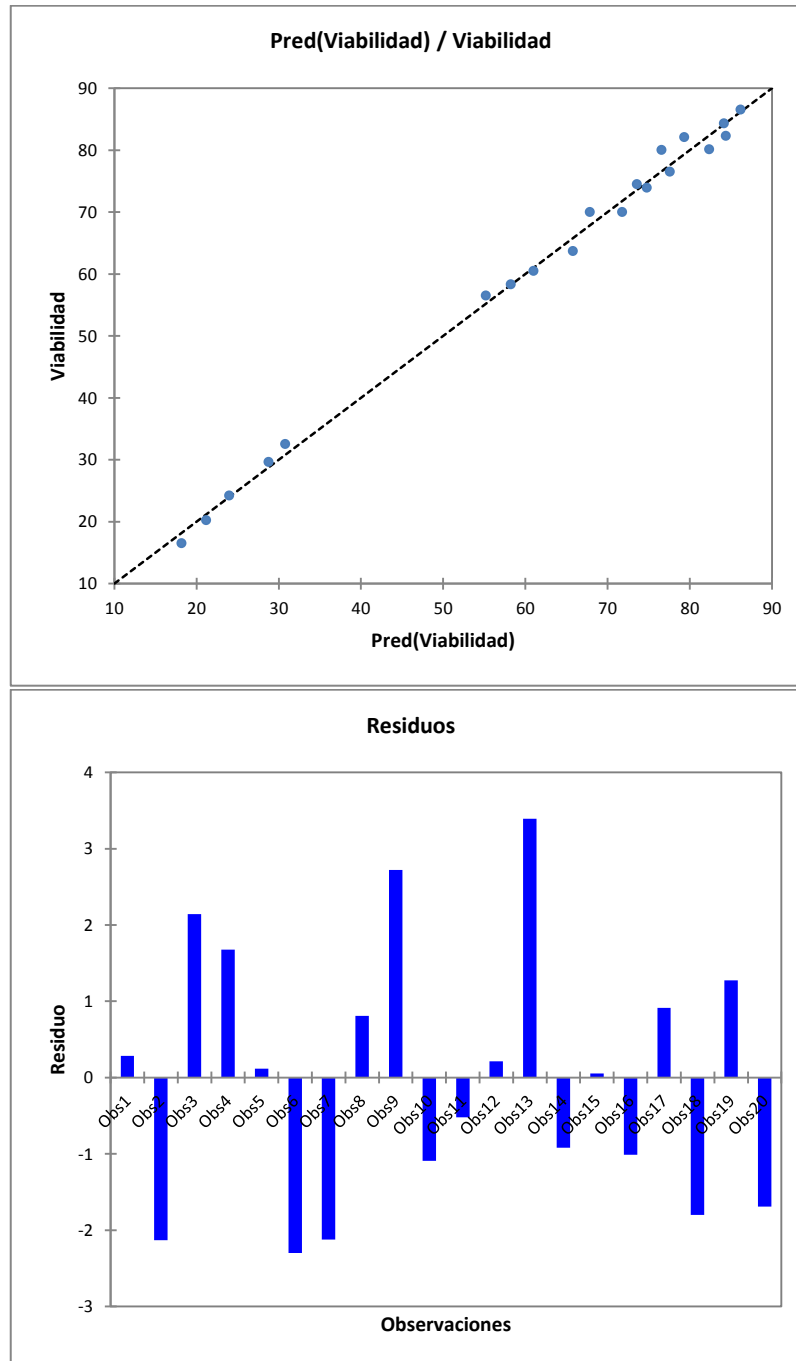
[7] 2 SER (57.9, 160.2)

[7] 25 GLY (-167.9, 11.5)

[11] 4 PHE (57.7, 138.4)

# Anexo D

## Gráficas de validación del modelo de viabilidad para R7A en linfocitos Jurkat



## Cytotoxicity of Recombinant Tamapin and Related Toxin-Like Peptides on Model Cell Lines

Belén Ramírez-Cordero,<sup>†</sup> Yanis Toledano,<sup>‡</sup> Patricia Cano-Sánchez,<sup>†</sup> Rogelio Hernández-López,<sup>†,||</sup> David Flores-Solis,<sup>†</sup> Alma L. Saucedo-Yáñez,<sup>†</sup> Isabel Chávez-Uribe,<sup>†</sup> Luis G. Brieba,<sup>§</sup> and Federico del Río-Portilla<sup>\*,†</sup>

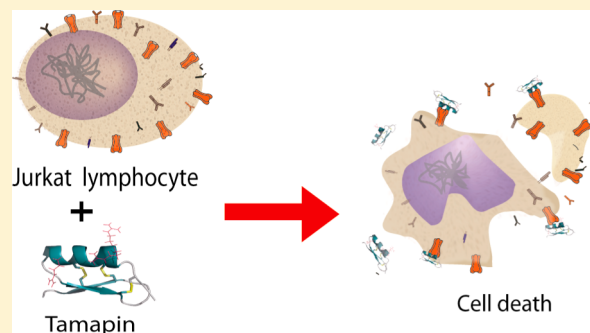
<sup>†</sup>Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Circuito Exterior s/n, México, D.F. 04510, México

<sup>‡</sup>Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Circuito Exterior s/n, México, D.F. 04510, México

<sup>§</sup>Laboratorio de Genómica para la Biodiversidad, CINVESTAV Unidad Irapuato, Km. 9.6 Libramiento Norte Carr. Irapuato-León 36821, Irapuato Gto, México

### **S** Supporting Information

**ABSTRACT:** The scorpion toxin tamapin displays the most potent and selective blockage against KCa2.2 channels known to date. In this work, we report the biosynthesis, three-dimensional structure, and cytotoxicity on cancer cell lines (Jurkat E6-1 and human mammary breast cancer MDA-MB-231) of recombinant tamapin and five related peptides bearing mutations on residues (R6A,R7A, R13A, R6A-R7A, and GS-tamapin) that were previously suggested to be important for tamapin's activity. The indicated cell lines were used as they constitutively express KCa2.2 channels. The studied toxin-like peptides displayed lethal responses on Jurkat T cells and breast cancer cells; their effect is dose- and time-dependent with IC<sub>50</sub> values in the nanomolar range. The order of potency is r-tamapin > GS-tamapin > R6A > R13A > R6A-R7A > R7A for Jurkat T cells and r-tamapin > R7A for MDA-MB-231 breast cancer cells. Our structural determination by NMR demonstrated that r-tamapin preserves the folding of the  $\alpha$ KTx5 subfamily and that neither single nor double alanine mutations affect the three-dimensional structure of the wild-type peptide. In contrast, our activity assays show that changes in cytotoxicity are related to the chemical nature of certain residues. Our results suggest that the toxic activity of r-tamapin on Jurkat and breast cancer cells could be mediated by the interaction of charged residues in tamapin with KCa2.2 channels via the apoptotic cell death pathway.



## ■ INTRODUCTION

Toxins are the major constituent of scorpion venoms. They are known for their blocking and regulatory activity on ion channels.<sup>1–4</sup> Tamapin, also known as  $\alpha$ KTx5.4 and originally isolated from the venom of the *Mesobuthus tamulus* scorpion, is one of the very few selective toxins.<sup>5</sup> It belongs to the  $\alpha$ KTx5 toxin subfamily, characterized by a cystine-stabilized  $\alpha/\beta$  scaffold (CS- $\alpha/\beta$ ) that comprises an  $\alpha$ -helix and a double-stranded  $\beta$ -sheet connected by two highly conserved disulfide bridges (C2–C5 and C3–C6) and another disulfide bridge between cysteines C1–C4. Tamapin is a selective blocker of small conductance calcium activated potassium channels (KCa2). Three KCa2 subtypes have been identified up to date: KCa2.1–KCa2.3 (tamapin has IC<sub>50</sub> = 42 nM, 24 pM, and 1.7 nM for KCa2.1, KCa2.2, and KCa2.3 respectively<sup>5</sup>). These channels are thought to be important regulators of excitability and synaptic plasticity<sup>6,7</sup> and display partial overlap with distinct locations in the central and peripheral nervous systems. On the basis of their activity and distribution, KCa2 channels

have been proposed as novel targets for cognitive enhancement, depression, myotonic muscular dystrophy, and heart arrhythmias.<sup>8</sup> Previous studies have proposed molecular motifs that could be responsible for tamapin's affinity to KCa2 channels.<sup>9</sup> The subfamily  $\alpha$ KTx5 is characterized for having important interacting amino acids in the  $\alpha$ -helix, specifically in the conserved RXCQ motif,<sup>10–12</sup> whereas the interacting residues in the KCa2 channels are located in the extracellular loop DQQD motif.<sup>9,13,14</sup>

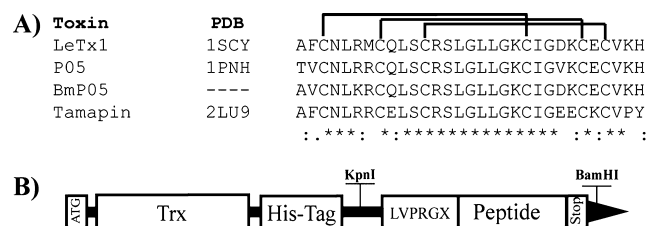
A theoretical study suggested that the main interactions for the binding of tamapin to human KCa2.2 channels are given by four hydrogen bonds that involve the tamapin residues Arg6, Arg13, and Tyr31 as well as several electrostatic interactions through residues Arg13, Arg7, and Lys20.<sup>15</sup>

Despite its high homology with other members of the  $\alpha$ KTx5 toxin subfamily (Figure 1A), tamapin is the most potent and

Received: November 11, 2013

Published: April 30, 2014





**Figure 1.** (A) Amino acid sequence alignment of some members of the  $\alpha$ -KTx5 subfamily and related peptides. Alignment was performed using MAFFT software. The asterisk (\*) indicates that amino acid residues in that column are conserved among aligned peptide amino acid sequences; (:) and (.) indicate conserved and partially conserved residue substitutions, respectively. (B) Construction of the fusion protein, the thrombin cleavage site LVPRGX, where X = Ser or Met, was designed to produce GS-peptides or GM-peptides.

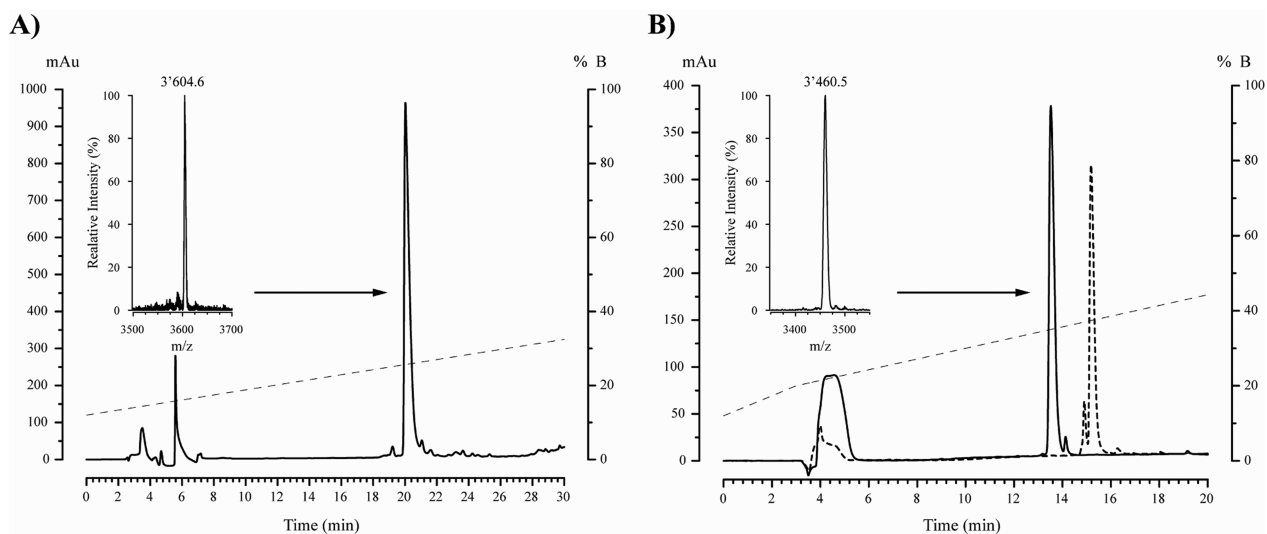
selective toxin against KCa2.2 channels.<sup>16</sup> Since there was no structural information on tamapin until now, we sought to perform a structure–activity study of tamapin and several derivative peptides in order to analyze the structural basis of tamapin's toxic activity on cells that express KCa2.2 channels. We report here the cytotoxicity of tamapin and several peptides where one or two arginine residues were replaced by alanine (mutants R6A, R7A, R13A, and R6A-R7A). We utilized Jurkat and MDA-MB-231 cells as they express KCa2.2 channels constitutively;<sup>17,39</sup> the similar activity observed for the indirectly tested toxins increases the likelihood of the observed effects being due to an action on KCa2.2 channels. Additionally, our combined activity assays and NMR structural analysis suggest that the toxicity of the tested peptides is mediated by the interaction of charged residues in the toxin with residues in KCa2.2 channels. We also compare the cytotoxicity of tamapin and its mutants with apamin, which is a well-known KCa2 channel blocker commonly used to identify the currents of this family of channels.<sup>7</sup>

## MATERIALS AND METHODS

**Gene Cloning.** Tamapin's gene was designed based on the amino acid sequence previously reported<sup>5</sup> and codon-optimized for *E. coli* expression. Two expression plasmids were constructed by inserting a thrombin cleavage amino acid coding sequence (LVPRGS or LVPRGM) and the tamapin sequence between *KpnI* and *BamHI* restriction sites in a pET32a plasmid (Novagen) (Figure 1B). The LVPRGS thrombin cleavage site produces peptides with two residues (Gly-Ser) in the amino termini (GS-peptides) because hydrolysis of the peptide bond is performed between the arginine and glycine residues. The LVPRGM thrombin cleavage site produces GM-peptides, which are designed to obtain the native sequence (r-tamapin) after the removal of the GM residues using CNBr. Mutants r-R6A, GS-R7A, r-R13A, and r-R6A-R7A were obtained by point mutations using these plasmids as templates. All vectors were verified by DNA sequencing (Laragen Inc.) using T7 prom and term primers.

**Protein Expression.** Fusion proteins were overexpressed in *E. coli* Rosetta gami (DE3) pLysS (Novagen, Madison WI) transformed with the corresponding vector. Overnight cultures grown at 37 °C in LB media (Sigma-Aldrich unless otherwise specified) were diluted 1:100 in fresh media containing 100  $\mu$ g/mL ampicillin, 32  $\mu$ g/mL chloramphenicol, 15  $\mu$ g/mL kanamycin, and 12  $\mu$ g/mL tetracycline. Protein expression was induced with IPTG (GoldBio) at a final concentration of 0.5 mM when OD<sub>600</sub> nm reached between 0.6 and 0.7. Cells were incubated for 8 h at 30 °C and then harvested by centrifugation at 6000g for 10 min.

**Protein Purification.** The cellular pellet was resuspended in lysis buffer (150 mM NaCl and 50 mM Tris-HCl, pH 8) and sonicated using a Misonix Sonicator 3000 (10 min total process time, 60 W). The soluble fraction was separated by centrifugation at 32000g for 45 min at 4 °C. Soluble fusion proteins were isolated by IMAC using a HiTrap Ni<sup>2+</sup> column (GE Healthcare) and eluted with two column volumes of elution buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, and 500 mM imidazole, pH 8). Fusion proteins were treated with thrombin. The reaction was carried out at room temperature for 4 h in cleavage buffer (50 mM Tris-HCl and 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8). Products were purified by IMAC to remove fusion protein residues. The flow through containing either GS-peptides or GM-peptides was desalted using a PD10 column (GE Healthcare) and purified at room temperature by RP-HPLC using a Pro-Star Varian instrument. Separation was performed using a C18 semipreparative column (Phenomenex; Jupiter,



**Figure 2.** (A) Purification by reverse phase HPLC in a Jupiter column (Phenomenex) and MALDI-TOF characterization of GS-tamapin. (B) Chromatograms of GM-tamapin (dotted line) and r-tamapin (continuous line) in a Proteo column (Phenomenex) and MALDI-TOF spectra of r-tamapin. Purifications were performed using gradients of solution A (TFA 0.05% in H<sub>2</sub>O) and solution B (TFA 0.05% in acetonitrile). Gradients are indicated in dotted gray lines. In B, a retention time difference of approximately 1.5 min between GM-tamapin and its product of hydrolysis with CNBr (r-tamapin) is shown.

100 × 21.2 mm, 10 μm particle diameter; 300 Å pore size) equipped with a C18 guard column (Phenomenex, Jupiter, 50 × 10 mm, 10 μm particle diameter; 300 Å pore size). Elution was conducted at 10 mL/min, using solutions A (0.05% (v/v) aqueous TFA) and B (0.05% (v/v) TFA in MeCN). A nonlinear gradient from 10% to 30% solution B during 30 min was used. Peptide absorbance was monitored at 230 nm. An analytic C18 column (Phenomenex; Jupiter, 250 × 4.6 mm, 3 μm particle diameter; 300 Å pore size) was used for the evaluation of samples; chromatograms are shown in Figure 2; solutions A and B were used as the mobile phase. The collected fraction was lyophilized. Obtaining of peptides without GM residues in the N termini required two additional steps: the hydrolysis of GM-residues with CNBr (an acutely toxic compound) according to Zhao et al.<sup>18</sup> and a second separation by RP-HPLC with the above-described conditions.

**Mass Spectrometry.** MALDI-TOF on a Bruker Daltonics Microflex LT equipment was used to determine the molecular mass of the proteins. Data were acquired in the *m/z* range of 2000–8000 using the reflector operation mode acquiring 150 shots. Samples were prepared with  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid in a 1:10 ratio following a protocol previously reported.<sup>19</sup>

**NMR Data Acquisition and Analysis.** Lyophilized peptides were dissolved at a concentration between 1.0 and 2.8 mM in H<sub>2</sub>O and 5% (v/v) D<sub>2</sub>O (Cambridge Isotopes Laboratories). NMR data were acquired at 297 K using a Varian Inova spectrometer operating at 500 MHz proton frequency. NMR experiments were recorded with 1024 data point matrices using 32 scans and conducted using the DPGSE method for water suppression;<sup>20</sup> DQF-COSY and TOCSY isotropic mixing time of 75 ms; NOESY mixing times of 100, 200, and 300 ms. NMR data were processed using NMRPipe;<sup>21</sup> and a sine window function, baseline correction, zero filling, and a second baseline correction were applied prior to Fourier transformation. Identification of amino acid spin systems and assignment of NOE signals were achieved using a CARA1.5 NEASY application.<sup>22</sup>

**Structure Calculation.** Identification of amino acid spin systems and sequential assignment were done using the standard strategy described by Wagner and Wüthrich.<sup>23</sup> Spin systems were identified using TOCSY and DQF-COSY spectra. Sequential assignments were obtained from an analysis of HN–HN, HN–H $\alpha$ , and HN–H $\beta$  connectivities in NOESY spectra using mixing times of 300 and 200 ms. All 1HN atoms but the one of residue 1 were assigned. Distance and dihedral angle constraints were mainly derived from cross-peaks in NOESY experiments (mix = 100 or 150 ms) using CYANA 2.1.<sup>24,25</sup> For each peptide, a total of 200 structures were calculated, and 20 were selected on the basis of the CYANA target function. Structures of r-tamapin, GS-tamapin, and mutants were refined using AMBER 9.<sup>26–28</sup> All of the molecular dynamics simulations and the energy minimizations described here were carried out using the topology and force field parameter of AMBER-99SB force field.<sup>29</sup> We followed the refinement protocol proposed by Gurrola and co-workers.<sup>30</sup> Structure evaluation was performed with the PROCHECK utility in the Validation Server of Protein Data Bank; see the Ramachandran plot in Supporting Information, Figure S2.

**Cell Culturing.** Jurkat E6-1 and MDA-MB-231 cells were grown in RPMI 1640 with L-glutamine medium (RPMI 1640, GIBCO) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS, GIBCO) and 1% of gentamicin (Gentamicin sulfate 50 mg/mL, Biosera) for 72 h. Briefly, 3 × 10<sup>5</sup> cells/well were plated in a 96-well microplate with supplemented RPMI medium in the presence of the toxins at four different concentrations (0.1, 1, 10, and 100 nM).

**Human Peripheral Blood Lymphocytes Isolation.** Buffy coats of human peripheral blood (HPB) were used to isolate lymphocytes using a density gradient of Ficoll-Paque. Ten milliliters of buffy coats were diluted with the same volume of PBS (phosphate buffer solution) then put over 12 mL of Ficoll-Paque. First, centrifugation was carried out at 690g for 25 min; subsequently, the leucocytes were absorbed with a Pasteur pipet and washed with cold PBS. Finally, the cells were counted, and 1 × 10<sup>6</sup> cells were plated in Petri dishes with supplemented RPMI1640 medium. After 4 h, the supernatant was transferred to new or clean Petri dishes to eliminate the adhered cells. After 24 h of growth, this procedure was repeated, and the

lymphocytes in the supernatant were counted. Three × 10<sup>5</sup> cells/well were plated in 96-well microplates with supplemented RPMI medium in the presence of the toxins at four different concentrations (0.1, 1, 10, and 100 nM).

**Viability Assay.** Viability was assessed employing two different methods: (1) vital marker trypan blue and (2) carboxyfluorescein diacetate (CFDA) and propidium iodide fluorescent markers. The viability counts at 0, 6, 12, 24, 30, and 36 h were determined. For the viability assays, 3 wells were used for each time and concentration of toxin. At each time evaluated, the content of each well was homogenized and divided into two Eppendorf tubes. One of the tubes was stained with trypan blue and the other one with CFDA and PI. Cell count using fluorescent dyes was done in a fluorescent microscope Olympus BX51, whereas the count using trypan blue was carried out in a Neubauer chamber taking 10 μL of each previously stained sample. Each sample was counted three times, averaged, and referred to as 1 count. Staining with trypan blue allows the observation of the morphology of the cells, while the fluorescent stain gives information about whether the cells have cytosolic activity for the presence of active decarboxylases. The number of counted living cells in the control sample was always considered the one with 100% of viability, and it was considered that the death cells were never more than 5% for cancer cells. Three independent experiments in triplicate were performed for each concentration, giving 9 data sets for each staining method. Thereby, a total of 18 data sets were averaged for each point in Figure 4. Cells without toxins were used as a negative control. Additionally, lymphocytes of human peripheral blood were employed as a second negative control, and apamin (purified from bee venom by Sigma-Aldrich) treatment was used as the positive one. All controls were also made in triplicate. Cytotoxicity data were blank corrected and normalized to the vehicle control (%viability) using a two way ANOVA significant statistical difference with a 95% confidence interval. IC<sub>50</sub> values were calculated with a Probit model (Stat Graph v2.0, 2010). The program does a linear regression with the percentage of cell viability as a concentration function. The IC<sub>50</sub> value is then estimated using the fitted line  $y = mX + bX$ , meaning  $IC_{50} = (0.5 - b)/m$  with a confidence interval of 95%.

**Mechanism of Cell Death.** To determine the mechanism of cell death, flow cytometry analysis was done employing the FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI (Biolegend, USA) according to the protocol provided. Briefly, cells were washed with PBS solution and resuspended in the kit buffer at a concentration of 0.5 × 10<sup>7</sup> cells/mL. Then, 100 μL of cell suspension was placed in a flow cytometry tube; and 5 μL of FITC annexin V and 10 μL of propidium iodide solution were added. After 15 min of incubation at room temperature (25 °C) without light, 400 μL of annexin V binding buffer was added to each tube, and the samples were finally analyzed by flow cytometry in a FACScan flow cytometer (BD, USA).

## RESULTS AND DISCUSSION

**Toxin Expression and Purification.** We report the production of r-tamapin and several mutants using the heterologous expression system *E. coli* Rosetta gami/pET32a. The single and double mutants had higher yields than the wild type protein. Our purification strategy provided acceptable yields (1.5–2.8 mg/L, Table 1) for this kind of toxin that

**Table 1. Mass Characterization by MALDI-TOF**

peptide	MALDI mass of [M + 1] <sup>+</sup>	theoretical mass	yield (mg/L) [M × 10 <sup>-3</sup> ]
r-tamapin	3460.5	3459.1	1.5 [4.3]
GS-tamapin	3604.6	3603.2	1.7 [4.7]
r-R6A	3375.3	3374.05	2.0 [5.9]
GS-R7A	3519.5	3518.2	2.0 [5.6]
r-R13A	3375.4	3374.05	1.8 [5.3]
r-R6A-R7A	3290.1	3288.9	2.8 [8.5]

allowed us to perform structural and functional analyses. The desired fusion proteins localized in the soluble cellular lysate were efficiently retained by a HiTrap Ni<sup>2+</sup> column. Hydrolysis with thrombin was quantitative, and the Trx-His6-LVPR residue was satisfactorily removed from the reaction mixture by a second IMAC isolation. Purification of the nonretained fraction was performed by RP-HPLC (Figure 2A). The chromatogram presents only one major peak suggesting that the expression system favors a unique product; GM-tamapin elutes at 15.2 min. After hydrolysis of GM-tamapin with CNBr, the product (r-tamapin) has a retention time of 13.5 min in similar conditions; the retention time decrement is consistent with the loss of two residues. Analysis of chromatographic profiles, shown in Figure 2B, allowed us to conclude that (a) the conditions allow a clear separation between GM-tamapin and r-tamapin and that (b) CNBr hydrolysis under our working conditions was quantitative. Our mass determination is in good agreement with theoretical data (ProtParam tool from ExPASy server<sup>31</sup>) calculated for peptides containing three disulfide bonds (see Table 1). In contrast to the native peptide, the recombinant wild-type peptide and its mutants lack the amidation cap in their carboxyl termini. IC<sub>50</sub> values for nonamidated tamapin are not available in the literature, and the importance of this posttranslational modification has only been reported for apamin.<sup>32</sup>

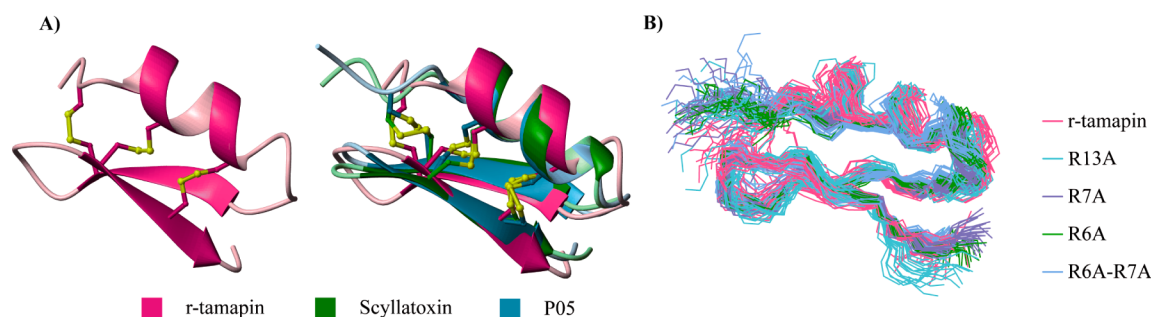
**NMR Structures.** Similar to other members of the  $\alpha$ KTx5 toxin subfamily,<sup>12,33</sup> our structures show the characteristic secondary structure elements: one stretch of  $\alpha$ -helix (Leu5-Ser14) connected by a turn to a  $\beta$ -sheet formed by two antiparallel strands (strand I, Leu18-Ile22; and strand II, Glu25-Pro30). NMR distance constraints used for each peptide are listed in Table 2. A cartoon representation of the determined

**Table 2. Final Set of NOEs Included in the Structures Calculated by CYANA**

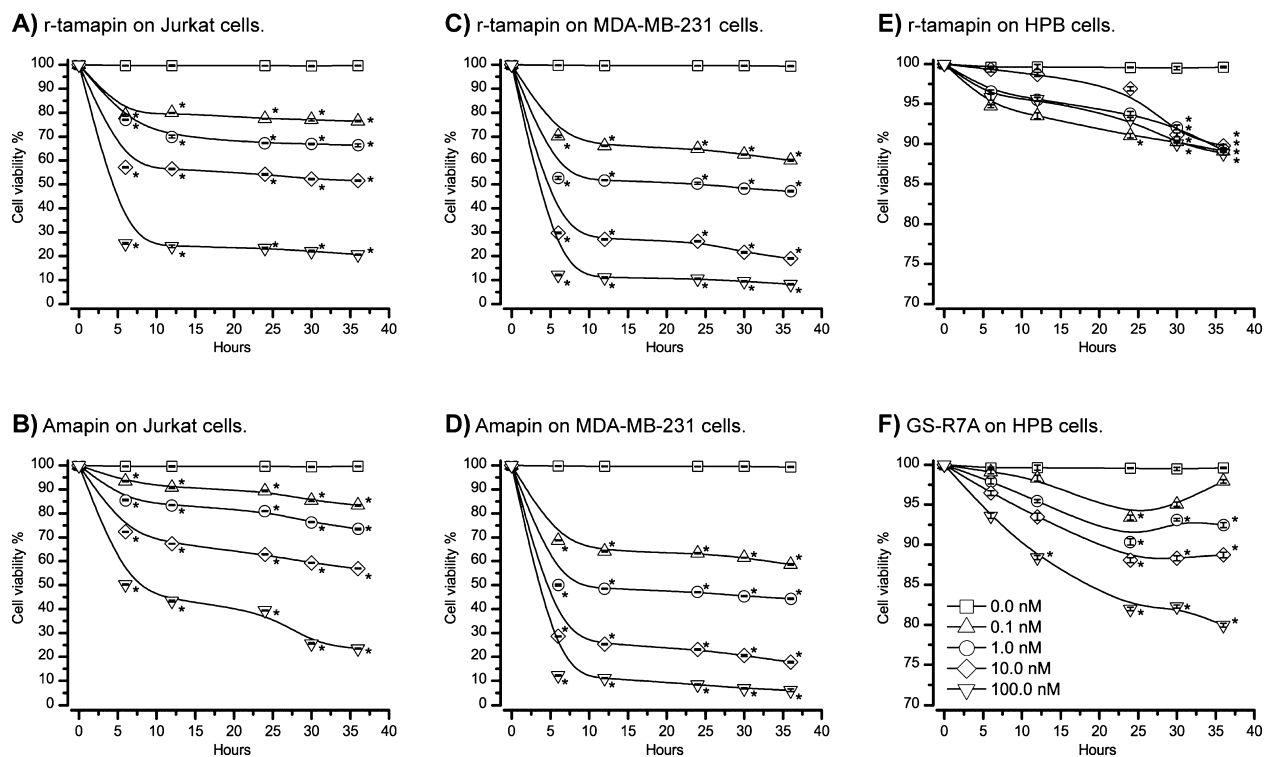
	r-tamapin	GS-tamapin	GS-R6A	GS-R7A	GS-R13A	GS-R6A-R7A
Upper Distance Limits						
total	301	414	458	524	446	517
short range	220	262	290	312	280	301
medium range	44	80	83	115	90	108
long range	37	72	85	97	76	108
RMSD						
average backbone (Å)	0.75	0.35	0.51	0.72	1.05	0.88

three-dimensional structure of r-tamapin is shown in Figure 3A. The best structure of r-tamapin overlaps without significant changes with the structure of other members of the  $\alpha$ KTx5 family (Figure 3B). The RMSD of the backbone after alignment of leiurotoxin, P05, and r-tamapin is 0.75 Å, which is similar to the RMSD of the r-tamapin experimental ensemble. Our structural comparison let us conclude that our expression system provides r-tamapin with its native folding. In addition, we found that mutating arginine residues, which were suggested to be important for tamapin's activity, does not affect its tertiary structure. Figure 3C shows an ensemble of all our studied peptides after alignment of the structures with the lowest CYANA target function values, which were refined by molecular dynamics with minimal distance violations.

**Cytotoxicity Assays.** We used three different cell types to study the effect of tamapin's activity on KCa2.2 channels as an indirect measure, evaluating the viability of cell culture. Two of them, Jurkat T cells and MDA-MB-231, constitutively express these channels, whereas the other, HPB lymphocytes, does not. The membrane potential of HPB lymphocytes is supported by voltage-gated, depolarization activated Kv1.3 and Ca<sup>2+</sup> activated KCa3.1 K<sup>+</sup> channels.<sup>34</sup> Purified peptides were tested at four concentrations (0.1, 1, 10, and 100 nM) and five exposure time points (6, 12, 24, 30, and 36 h) on both cell types to study the effect of tamapin's activity on KCa2.2 channels as an indirect measure, evaluating the viability of cell culture. On HPB lymphocyte cultures, all peptides produced a dose- and time-dependent effect but with low toxicity (viability ranges from 80 to 88% with the maximum toxin concentration at 38 h) in the concentration range assayed. The results are in accordance with the absence of KCa2.2 channels in these cells. In contrast, on Jurkat T cells, the peptides displayed mainly a dose-dependent effect and significant toxicity even at the lower toxin concentration (0.1 nM) during the first 6 h. All results are shown in Figures 4 and S1 (Supporting Information). Longer exposure time did not produce a viability decrease at low peptide concentration; however, all peptides have a time-dependent effect. We found higher cytotoxicity at 100 nM (32–37% viability at 6 h and 16–24% viability at 38 h); peptides with GS residues at their amino termini displayed the largest effect. Apamin, GS-tamapin, and r-R6A-R7A showed a biphasic effect on the viability of Jurkat E6-1 cells, increasing their toxicity after 24 h at 100 nM as shown in the viability graphs (Figures 4B and S1A and S1E (Supporting Information)). This effect might be caused by desorption of toxins from



**Figure 3.** (A) Cartoon representation of the three-dimensional structure determined by 1H-NMR of the r-tamapin produced using the expression system reported in this article. (B) Superposition of three-dimensional structure determined for r-tamapin and previously reported structures of leiurotoxin and P05. RMSD was determined considering a total of 60 structures (20 structures by peptide). (C) Superposition of the ensembles of five peptides produced in this work. The GS tag is not plotted in this representation.



**Figure 4.** Viability graphs of Jurkat lymphocytes and MDA-MB-231 cells treated with 0.1, 1, 10, and 100 nM of r-tamapin and apamin. Viability graphs of human peripheral blood lymphocytes treated with r-tamapin and GS-R7A. Data are shown as the percentage of viable cells and represent the mean  $\pm$  SD of three independent assays which were made by triplicate measurements. Significant differences between treated cells and controls ( $p < 0.05$ ) are represented with an \*. Viability assays of r-tamapin on both Jurkat (A) and MDA-MB-231 cells (C) displayed similar behavior, with a remarkable effect at the first 6 h and minimal changes during the next 30 h. Apamin's effect on MDA-MB-231 (D) cells have similarity with the effect of r-tamapin on this cells; however, there is biphasic behavior at 100 nM on Jurkat cells that could be evidence that toxic action mechanisms of r-tamapin and apamin are distinct. Viability graphs of HPB lymphocytes (E,F) were normalized in order for the effect of the naturally dying cells to not be considered. For clarity, scale of viability graphs on HPB lymphocytes are displayed from 70 to 100%, due to the small effect on these cells.

**Table 3. IC<sub>50</sub> of All Assayed Peptides**

peptide	apamin	r-tamapin	GS-tamapin	r-R6A	r-R13A	r-R6A-R7A	GS-R7A
IC <sub>50</sub> [nM]	15.3	13.6	15.5	18.2	19.7	23.6	27.3

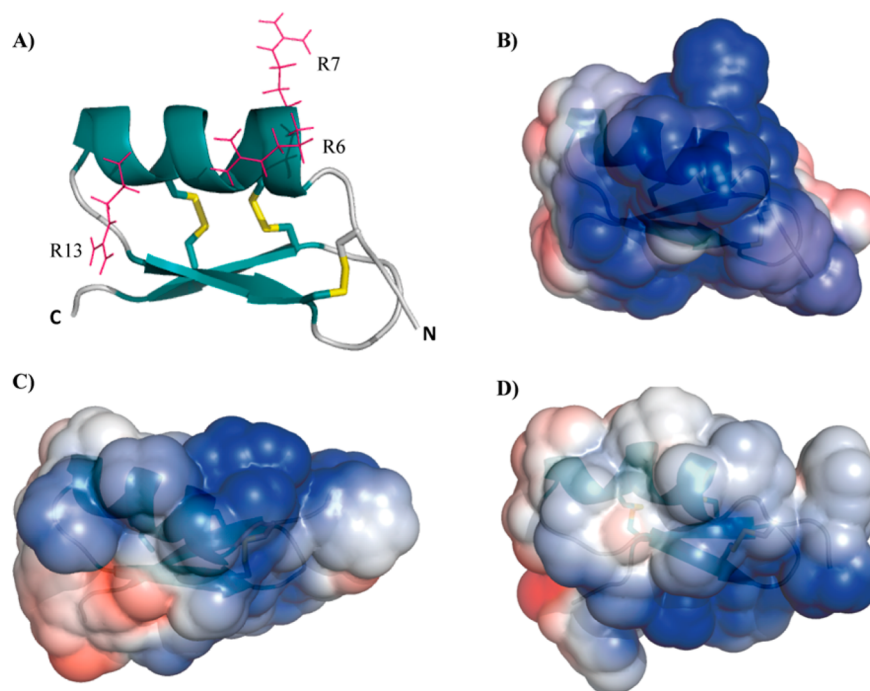
dead cells, although more studies are needed to confirm this hypothesis.

IC<sub>50</sub> values on Jurkat cells calculated for each tested peptide and apamin are presented in Table 3. r-Tamapin was the most toxic peptide (IC<sub>50</sub> = 13.6 nM), while mutations reduced its toxicity to a maximum IC<sub>50</sub> of 27.3 nM in the case of GS-R7A. All our RXA mutants showed lower toxicity than the peptide with the native sequence; however, the IC<sub>50</sub> values stayed in the nanomolar range, even in the case of the double mutant. These slight variations in the IC<sub>50</sub> values suggest that the cytotoxicity is barely affected by modifications in the arginine residues 6, 7, and 13. To corroborate these results, we performed cytotoxicity assays on MDA-MB-231 cells, which also express KCa2.2 channels; interestingly, the viability curves displayed a similar behavior (Figures 4C,D and S1-J, Supporting Information). The IC<sub>50</sub> of r-tamapin, apamin, and r-R7A are 0.9, 0.7, and 2.5 nM, respectively, on MDA-MB-231 cells. Although r-tamapin IC<sub>50</sub> on this cell line was approximately 15 times smaller than that on Jurkat cells, the least active peptide, when compared to r-tamapin, has IC<sub>50</sub> values two times smaller on both MDA-MB-231 and Jurkat cells.

**Mechanism of Cell Death.** The mechanism of cell death was determined by flow cytometry analysis with the FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI (Biolegend, USA);

r-R7A, r-tamapin, and apamin were analyzed. Results are in the Supporting Information (Figures S4 and S5, and Tables S2 and S3). For the cultures of Jurkat T cells E6-1, the most important effect was observed with r-tamapin. In this case, an apoptotic cell death pathway was principally observed with a 69.1% at the higher dose and 36 h of exposure. The activity of r-tamapin is nearly equal to the activity of apamin, which presents 67.8% of apoptosis on the same conditions. The peptide r-R7A was the least active compared with apamin and r-tamapin and just presented 46.4% of apoptosis in Jurkat T cell cultures. These results correlate with those found for stains with CFDA and PI. In the case of MDA-MB-231 cell cultures, the mechanism of death was principally apoptotic when cultures were treated with r-tamapin, apamin, and r-R7A. Apamin showed the greatest activity against MDA-MB-231 cells with 58.7% of apoptosis, followed by r-tamapin with 57.7%, and finally r-R7A with 53.8%. It is important to note that there were never more than 2.1% of necrotic cells in either culture for all assayed treatments.

**Structure–Activity Relationship.** The choice for the *in vitro* model used in this work is based on two facts. First, channel blocking by toxins reduces proliferation in several cancer cell lines (reviewed in ref 35); for example, blocking KCa channels produces growth inhibition in human melanoma



**Figure 5.** (A) Cartoon representation of r-tamapin. Side chain of arginines 6, 7, and 13 are shown in pink lines, and disulfide bridges are colored yellow. Electrostatic potential surface of r-tamapin (B), r-R6A (C), and r-R6A-R7A (D) displayed with a scale from  $-2$  to  $2$  kBT/ec. Cartoon representations are embedded in the electrostatic potential surfaces. The orientation of the surfaces is the same as that in panel A. Decrement of positive charge density in the  $\alpha$  helix region produced by mutations are evidenced.

cells;<sup>36</sup> a mechanism that connects ion channels with the cell cycle is still under discussion, but it is thought to be related to  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis. In Jurkat cells,  $\text{KCa2.2}$  channel blockage causes membrane depolarization and inhibits  $\text{Ca}^{2+}$  entry.<sup>37</sup> Second, the Jurkat leukemic T cell line constitutively expresses two  $\text{K}^+$  channels: a voltage-gated one ( $\text{K}_V1.3$ ) and a small conductance  $\text{Ca}^{2+}$  activated one, the  $\text{KCa2.2}$  channel,<sup>17,38</sup> which is also found in MDA-MB-231 cells.<sup>39</sup> Therefore, these two lines are good models to test peptide toxicities due to  $\text{KCa}$  channel blocking.

Our activity assays on HPB lymphocytes showed low toxicity for all described peptides. Assays were performed at pH 7, so arginine residues must be positively charged. The total charge of r-tamapin under these conditions is  $2+$ , while single mutants have  $1+$  charge, and the double mutant r-R6A-R7A is neutral. Viability curves on HPB lymphocytes (Figures 4E,F and S1F–I, Supporting Information) showed that peptides had a minimal time-dependent toxic effect. On these assays, only GS-R7A presented a slight concentration-dependent toxicity (Figure 4F). This mutant has the maximum toxicity of all assayed peptides (20% at 100 nM). There is no correlation between the peptide total charge and its activity; for example, GS-R7A, with  $1+$  charge, showed a higher toxic effect than both of the double charged peptides, r-tamapin and GS-tamapin. Additionally, apamin revealed a slow toxicity and a similar behavior compared to that of tamapin mutants on HPB lymphocytes (Supporting Information). Altogether, these results evidence the lack of correlation between charge and activity, thus suggesting a poor electrostatic interaction between peptides and cells.

In contrast, the assays on the Jurkat T cell line show that the toxicity of all peptides is strongly concentration-dependent (Figures 4A,B and S1A–E, Supporting Information) and tends to increase with the peptide's charge. Peptides with similar total

charge had slight differences in their toxic activities. For example, r-R6A and r-R13A, whose total charge is  $1+$ , have  $\text{IC}_{50}$  values of 18.2 nM and 19.7 nM, respectively, while r-tamapin, whose total charge is  $2+$ , has  $\text{IC}_{50} = 13.6$ , and r-R6A-R7A, which has no charge in the assayed conditions, has  $\text{IC}_{50} = 23.6$ . These differences suggest that the mechanism responsible for peptide toxicity is determined by electrostatic and possibly specific interactions. To support this idea, we determined the electrostatic potential surfaces of all assayed peptides. These maps reveal substantial differences among the single RXA mutants (Figure 5C,D). Electrostatic surfaces of both r-R6A and r-R13A exhibit a reduced positive zone when compared to the r-tamapin's widespread positive potential surface. Similarly, the double mutant r-R6A-R7A displays a reduced charged potential surface on the putative interaction zone; surprisingly, this peptide's activity is similar to the single or native peptides' activity but is less active than GS-R7A. The tridimensional structures of all tested peptides are superimposable, as shown in Figure 3B, where even when the mutations are present, the side chains surrounding the interaction zone are exposed. It is important to remark that the alanine mutations we introduced do not present steric hindrance for interactions with residues in the vicinity; thus, if interaction with the cell is not directly related to mutated sites, toxicity should have minimal effect, as we observed in our assays. Apamin, which has an  $\text{IC}_{50}$  value close to that of r-tamapin in both Jurkat and MDA-MB-231 cells, produces similar viability curves (Figure 4B and D). Besides, both toxins produce cell death by apoptosis, thus suggesting that both peptides act through a similar mechanism. Previous reports have determined that apamin interacts with  $\text{KCa2.2}$  channels through the S3–S4 extracellular loop and the outer pore of an adjacent subunit,<sup>40</sup> but the exact blocking mechanism has not been detailed for tamapin, even though a simple pore block has been proposed.<sup>41</sup> Similarities in our

results using two different cell lines that express KCa2.2 channels strongly suggest that the toxicity mechanism involves interaction with these macromolecules. In contrast to the RXA mutants, GS-peptides presented lower activity than their analogues with no additional residues; this suggests that longer amino termini may cause difficulties in the interaction with cells. Our results also suggest that tamapin's toxicity mechanism is due to the global structure of the toxin rather than being due to specific interactions between the arginine residues and the cells. Besides, a comparison was made between those cells that express KCa2.2 channels and those that do not, and it was found that the latter live longer. Together, these results suggest that the toxicity of r-tamapin and its mutants is specific to cells with KCa2.2 channels.

## CONCLUSIONS

This work provides important evidence regarding the toxicity of tamapin in living cells. r-Tamapin and its mutants display a selective cytotoxic activity, producing apoptosis on Jurkat T and MDA-MB-231 cells, which constitutively express KCa2.2 channels, with  $IC_{50}$  values in the nanomolar range, whereas they have only minimal effects on HPB lymphocytes, which do not express KCa2.2 channels. These results are evidence of the pharmacological potential of tamapin as a proliferation inhibitor of KCa2.2 expressing T cells with no effect on common T lymphocytes. Modifications in the toxin's primary sequence changed its lethality when assayed on Jurkat T and MDA-MB-231 cells. Mutations of arginine residues by alanine in positions 6, 7, and 13 produced peptides with decreased activity, thus suggesting that these residues are involved in the activity mechanism. The minimal reduction of  $IC_{50}$  values may be due to compensatory mechanisms or allosteric effects; future work should help to confirm this idea.

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

Viability graphics of HBP and Jurkat lymphocytes in the presence of the peptides R6A, R13A, R6A-R7A, and GS-R7A, as well as viability graphs of MDA-MB-231 cells in the presence of r-tamapin, R7A, and apamin, Ramachandran plot of GS-R7A, electrostatic surface potential of R13A and R7A, dot plots of cytometry assays on Jurkat cells and on MDA-MB-231 cells, table of averaged values of viability assays performed on Jurkat E6-1 cells, and cytometric results on Jurkat E6-1 and on MDA-MB-231 cells. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

### Accession Codes

NMR assignments and coordinates have been deposited in BioMagResBank and the Protein Data Bank with entries r-tamapin (2LU9:18513), GS-tamapin (2KY3:17227), GS-R6A (19519:2ME7), GS-R7A (19524:2MEL), GS-R13A (19527:2MEN), and GS-R6A-R7A (19528:2MEO).

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Phone: +52-55-56224613. Fax: +52-55-56162203. E-mail: [jfrp@unam.mx](mailto:jfrp@unam.mx)

### Present Address

<sup>||</sup>(R.H.-L.) Department of Chemistry and Chemical Biology, Harvard University, 12 Oxford Street, Cambridge, MA 02138.

## Funding

This work was partially supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Mexican Government (Grants 59297 and 166472), and Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)-UNAM, project IN205110 and IN207713.

## Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

B.R.-C., D.F.-S., A.L.S., and R.H.-L. want to thank CONACyT for the scholarships. R.H.-L. thanks Fundación Harvard Mexico for the scholarship. B.R.-C. wants to thank Andrea Cabrera for helpful discussions and support and Gustavo Titaux for the TOC. We are ever so grateful toward the reviewers for their positive criticism and suggestions.

## ABBREVIATIONS

DQF-COSY, double quantum filtered correlated spectroscopy; DPFGE, double pulsed field gradient spin echo; TOCSY, total correlation spectroscopy; NOE, nuclear Overhauser effect; NOESY, NOE spectroscopy; KCa2.2, calcium activated  $K^+$  channels, subtype 2.2; RMSD, root-mean-square deviation; IMAC, immobilized metal ion affinity chromatography; Trx, thioredoxin

## REFERENCES

- (1) Rodríguez de la Vega, R. C., Schwartz, E. F., and Possani, L. D. (2010) Mining on scorpion venom biodiversity. *Toxicon* 56, 1155–1161.
- (2) Billen, B., Bosmans, F., and Tytgat, J. (2008) Animal peptides targeting voltage-activated sodium channels. *Curr. Pharm. Des.* 14, 2492–2502.
- (3) Mouhat, S., Andreotti, N., Jouirou, B., and Sabatier, J. M. (2008) Animal toxins acting on voltage-gated potassium channels. *Curr. Pharm. Des.* 14, 2503–2518.
- (4) Tytgat, J., Chandy, K. G., Garcia, M. L., Gutman, G. A., Marti-Euclaire, M. F., van der Walt, J. J., and Possani, L. D. (1999) A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 444–447.
- (5) Pedarzani, P., Dhoedt, D., Doorty, K. B., Wadsworth, J. D. F., Jhosep, J. S., Jeyaseelan, K., Kini, R. M., Gadre, S. V., Sapatnekar, S. M., Stocker, M., and Strong, P. N. (2002) Tamapin, a venom peptide from the Indian red scorpion (*Mesobuthus tamulus*) that targets small conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels and afterhyperpolarization currents in central neurons. *J. Biol. Chem.* 277, 46101–46109.
- (6) Bond, C. T., Maylie, J., and Adelman, J. P. (2005) SK channels in excitability, pace making and synaptic integration. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 305–311.
- (7) Stocker, M., Krause, M., and Pedarzani, P. (1999) An apamin-sensitive  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  current in hippocampal pyramidal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 4662–4667.
- (8) Weatherall, K. L., Goodchild, S. J., Jane, D. E., and Marrion, N. V. (2010) Small conductance calcium-activated potassium channels: From structure to function. *Prog. Neurobiol.* 91, 242–255.
- (9) Shakkottai, V. G., Regayas, I., Wulff, H., Fajloun, Z., Tomita, H., Fathallah, M., Cahalan, M. D., Gargus, J. J., Sabatier, J. M., and Chandy, K. G. (2001) Design and characterization of a highly selective peptide inhibitor of the small conductance calcium-activated  $K^+$  channel, SkCa2. *J. Biol. Chem.* 276, 43154–43151.
- (10) Wu, J. J., He, L. L., Zhou, Z., and Chi, C. W. (2002) Gene expression, mutation, and structure-function relationship of scorpion toxin BmP05 active on SKCa channels. *Biochemistry* 41, 2844–2849.
- (11) Sabatier, J. M., Zerrouk, H., Darbon, H., Mabrouk, K., Benslimane, A., Rochat, H., Martin-Euclaire, M. F., and Van Rietschoten, J. (1993) P05, a new leurotoxin I-like scorpion toxin:

synthesis and structure-activity relationship of the alpha-amidated analog, a ligand of  $\text{Ca}^{2+}$  activated  $\text{K}^+$  channels with increased affinity. *Biochemistry* 32, 2763–2770.

(12) Martins, J. C., Van de Ven, F. J., and Borremans, F. A. (1995) Determination of the three-dimensional solution structure of scyllatoxin by  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance. *J. Mol. Biol.* 253, 590–603.

(13) Lecomte, C., Ferrat, G., Fajloun, Z., Van Rietschoten, J., Rochat, H., Martin-Eauclaire, M. F., Darbon, H., and Sabatier, J. M. (1999) Chemical synthesis and structure-activity relationship of Ts  $\kappa$ , a novel scorpion toxin acting on apamin-sensitive SK channel. *J. Pept. Res.* 54, 369–376.

(14) Cui, M., Shen, J., Briggs, J. M., Fu, W., Wu, J., Zhang, Y., Luo, X., Chi, Z., Ji, R., Jiang, H., and Chen, K. (2002) Brownian dynamics of the recognition of the scorpion toxin P05 with small conductance calcium-activated potassium channels. *J. Mol. Biol.* 318, 417–428.

(15) Andreotti, N., di-Luccio, E., Sampieri, F., Waard, M., and Sabatier, J. M. (2005) Molecular modeling and docking simulations of scorpion toxins and related analogs on human SKCa2 and SKCa3 channels. *Peptides* 26, 1095–1108.

(16) Pedarzani, P., and Stocker, M. (2008) Molecular and cellular basis of small- and intermediate-conductance, calcium-activated potassium channel function in the brain. *Cell Mol. Life. Sci.* 65, 3196–3217.

(17) Jäger, H., Adelman, J. P., and Grissmer, S. (2000) SK2 encodes the apamin-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels in the human leukemic T cell line, Jurkat. *FEBS Lett.* 469, 196–202.

(18) Zhao, D. X., Ding, Z. C., Liu, Y. Q., and Huang, Z. X. (2007) Overexpression and purification of a single zinc finger peptides of human zinc finger protein ZNF191. *Protein Expression Purif.* 53, 232–237.

(19) Gobom, J., Schuerenberg, M., Mueller, M., Theiss, D., Lehrach, H., and Nordhoff, E. (2001)  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid affinity sample preparation. A protocol for MALDI-MS peptide analysis in proteomics. *Anal. Chem.* 73, 434–438.

(20) Hwang, T. L., and Shaka, A. J. (1995) Water suppression that works. Excitation sculpting using arbitrary waveforms and pulsed field gradients. *J. Magn. Reson.* 112, 275–279.

(21) Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A. (1995) NMRPipe. A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR* 6, 277–293.

(22) Bartels, C., Xia, T., Billeter, M., Güntert, P., and Wüthrich, K. (1995) The program XEASY for computer-supported NMR spectral analysis of biological macromolecules. *J. Biomol. NMR* 6, 1–10.

(23) Wagner, G., and Wüthrich, K. (1982) Sequential resonance assignments in protein  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance spectra. Basic pancreatic trypsin inhibitor. *J. Mol. Biol.* 155, 347–366.

(24) Gunter, P. (2004) Automated NMR structure calculation with CYANA. *Methods Mol. Biol.* 278, 353–378.

(25) Herrmann, T., Günter, P., and Wüthrich, K. (2002) Protein NMR structure determination with automated NOE assignment using the new software CANDID and the torsion angle dynamics algorithm DYANA. *J. Mol. Biol.* 319, 209–227.

(26) Case, D. A., Darden, T. A., Cheatham, T. E., III, Simmerling, C. L., Wang, J., Duke, R. E., Luo, R., Merz, K. M., Pearlman, M. A., Crowley, M., Walker, R. C., Zhang, W., Wang, B., Hayik, S., Roitberg, A., Seabra, G., Wong, K. F., Paesani, F., Wu, X., Brozell, S., Tsui, V., Gohlke, H., Yang, L., Tan, C., Mongan, J., Hornak, V., Cui, G., Beroza, P., Matthews, D. H., Schafmeister, C., Ross, W. S., and Kollman, P. A. (2006) AMBER 9, University of California, San Francisco, CA.

(27) Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., Dinola, A., and Haak, J. R. (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* 81, 3684–3690.

(28) Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J., and Klein, M. L. (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* 79, 926–935.

(29) Hornak, V., Abel, R., Okur, A., Strockbine, B., Roitberg, A., and Simmerling, C. (2006) Comparison of multiple AMBER force fields

and development of improved protein backbone parameters. *Proteins* 65, 712–725.

(30) Gurrola, G. B., Hernández-López, R. A., Rodríguez de la Vega, R. C., Varga, Z., Batista, C. V. F., Salas-Castillo, S. P., Panyi, G., and del Río-Portilla, F. (2012) Structure, function and chemical of Vaejovis mexicanus peptide 24: A novel potent blocker of Kv1.3 potassium channels of human T lymphocytes. *Biochemistry* 51, 4049–4061.

(31) Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., and Bairoch, A. (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook*, 2nd ed., pp 571–607, Humana Press, Totowa, NJ.

(32) Davaux, C., Knibiehler, M., Defendini, M.-L., Mabrouk, K., Rochat, H., van Rietschoten, J., Baty, D., and Granier, C. (1995) Recombinant and chemical derivatives of apamin. Implication of post-transcriptional C-terminal amidation of apamin in biological activity. *Eur. J. Biochem.* 231, 544–550.

(33) Meunier, S., Bernassau, J. M., Sabatier, J. M., Martin-Eauclaire, M. F., Van Rietschoten, J., Cambillau, C., and Darbon, H. (1993) Solution structure of P05-NH<sub>2</sub>, a scorpion toxin analog with high affinity for the apamin-sensitive potassium channel. *Biochemistry* 32, 11969–11976.

(34) Feske, S., Skolnik, E. Y., and Prakriya, M. (2012) Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 532–547.

(35) Girault, A., Haelters, J. P., Potier-Cartereau, M., Chantôme, A., Jaffrés, P. A., Bougnoux, P., Joulin, V., and Vandier, C. (2012) Targeting SKCa channels in cancer: potential new therapeutic approaches. *Curr. Med. Chem.* 19, 697–713.

(36) Tajima, N., Schönherr, K., Niedling, S., Kaatz, M., Kanno, H., Schönherr, R., and Heinemann, S. H. (2006)  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels in human melanoma cells are up-regulated by hypoxia involving hypoxia-inducible factor  $-1\alpha$  and the von Hippel-Lindau protein. *J. Physiol.* 571, 349–359.

(37) Fanger, C., Rauer, H., Neben, A. L., Miller, M. J., Rauer, H., Wulff, H., Campos, J., Ganellin, C. R., Chandy, K. G., and Calahan, M. D. (2001) Calcium-activated potassium channels sustain calcium signaling in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 276, 12249–12256.

(38) Desai, R., Peretz, A., Idelson, H., Lazarovici, P., and Attali, B. (2000)  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels in human leukemic Jurkat T cells. Molecular cloning, biochemical and functional characterization. *J. Biol. Chem.* 275, 39954–39963.

(39) Potier, M., Joulin, V., Roger, S., Besson, P., Jourdan, M.-L., LeGuennec, J.-Y., Bougnoux, P., and Vandier, C. (2006) Identification of SK3 channel as a new mediator of breast cancer cell migration. *Mol. Cancer Ther.* 5, 2946–2953.

(40) Weatherall, K. L., Seutin, V., Liégeois, J.-F., and Marrion, N. V. (2011) Crucial role of a shared extracellular loop in apamin sensitivity and maintenance of pore shape of small conductance calcium-activated potassium (SK) channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 18494–18499.

(41) Rodríguez de la Vega, R. C., Merino, E., Becerril, B., and Possani, L. D. (2003) Novel interactions between  $\text{K}^+$  channels and scorpion toxins. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 222–227.