



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**BIOSÍNTESIS, PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y  
DETERMINACIÓN DE LA TOXINA Tx1M1**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO**

**PRESENTA**

**PEDRO ANZUREZ SÁNCHEZ**



**Ciudad Universitaria, CdMx.**

**2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: FRANCISCO ROJO CALLEJAS  
**VOCAL:** Profesor: JOSE FEDERICO DEL RIO PORTILLA  
**SECRETARIO:** Profesor: ADRIÁN VASQUEZ SÁNCHEZ  
**1er. SUPLENTE:** Profesor: LUIS ALEJANDRO DIAZ FLORES  
**2° SUPLENTE:** Profesor: JOSE CARLOS PAEZ FRANCO

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

**ASESOR DEL TEMA: DR. JOSÉ FEDERICO DEL RÍO PORTILLA**

**SUSTENTANTE (S): PEDRO ANZUREZ SÁNCHEZ**

## AGRADECIMIENTOS

Gracias al proyecto PAPIIT IN207516 con número de folio 024517 durante el periodo del 01/01/2017 a 30/06/2017.

## Índice

Resumen.....	10
Capítulo 1.....	11
Antecedentes .....	11
1.1 Toxinas de Alacranes.....	11
1.2 k-BUTX-Tt2b(Tx1).....	13
1.3 Ts16 .....	14
1.4 Tx1M2 y Tx1M1 .....	15
1.5 Tx1M2 .....	15
1.6 Tx1M1 .....	16
1.7 Aminoácidos.....	16
1.8 Proteínas.....	17
1.9 Estructura secundaria .....	18
1.10 Estructura terciaria .....	18
1.11 Estructura cuaternaria .....	19
1.12 Resonancia Magnética Nuclear .....	19
1.13 Espín nuclear .....	20
1.15 Detección .....	22
1.16 Desplazamiento químico .....	22
1.17 Acoplamiento dipolar.....	24
1.18.-RMN de proteínas.....	24
1.19 Experimentos en dos dimensiones .....	25
1.20 Determinación de estructura .....	25
Capítulo 2.....	26
Hipótesis .....	26
Capítulo 3.....	26
3.1 Objetivos generales. ....	26
3.2 Objetivos particulares.....	26
Capítulo 4.....	26
Desarrollo Experimental .....	26
4.1 Transformación .....	26

4.2 Preinóculo .....	27
4.3 Purificación de Plásmido.....	27
4.4 Expresión de Tx1M1 .....	27
4.5 Lisis celular .....	29
4.6 Purificación por CAMQ.....	29
4.7 Diálisis y reacción de corte. ....	30
4.8 Segunda purificación por CAMQ.....	30
4.9 Extracción en fase sólida. ....	30
4.10 Purificación por HPLC.....	30
4.11 Determinación de la masa. ....	31
4.12 Determinación de su estructura. ....	31
Capítulo 5.....	31
Resultados .....	31
5.1 Transformación .....	31
5.2 Expresión de Tx1M1 .....	32
5.3 Cromatografía por afinidad metal quelato (CAMQ). ....	34
5.5 Corte con trombina.....	36
5.5 Segunda purificación por CAMQ.....	39
5.7 MALDI-TOF.....	43
5.8 Experimentos de RMN .....	45
Capítulo 6.....	51
Conclusión. ....	51
Capítulo 7.....	51
Perspectivas .....	51
Capítulo 8.....	52
BIBLIOGRAFÍA .....	52

## Lista de abreviaturas

$^1\text{H}$	Hidrógeno
$^{13}\text{C}$	Carbono trece
ACN	Acetonitrilo
CAMQ	Cromatografía de Afinidad Metal Quelato
CS $\alpha/\alpha$	Cysteine Stabilized alpha- alpha motif
CS $\alpha/\beta$	Cysteine Stabilized alpha- beta motif
DO	Densidad Óptica
FID	Free Induction Decay
FR-C18	Fase reversa con Columna C18
IPTG	IsoPropil- $\beta$ -d-1TioGalactopiranosido
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
KTx	Toxinas bloqueadoras de canales de potasio
LB	Luria Bertani (Medio de cultivo)
MALDI	Matrix Assisted Lasser Desorption Ionization
m/z	Relación masa/ carga
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
PF	Proteína de Fusión

RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMSD	Root Mean Square Deviation
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
TFA	TriFluoroacetic Acid
TOF	Time of flight

Lista de Figuras	Página
Figura 1.1.-	Estructura tridimensional en representación de listones de proteínas 12
Figura 1.2.-	Estructura de la toxina k-BUTX-Tt2b 14
Figura 1.3.-	Estructura de la toxina Ts16 14
Figura 1.4.-	Estructura de la toxina Tx1M2 16
Figura 1.7.-	Estructura general de un aminoácido 17
Figura 1.71.-	Formación de un enlace peptídico 17
Figura 1.9.-	Estructura tridimensional de una proteína 18
Figura 1.10.-	Estructura de una toxina de alacrán Hg36 19
Figura 1.13.-	Representación del espín 20
Figura 1.14.-	Representación del vector de magnetización 21
Figura 1.16.-	Diagrama general de cómo obtener un espectro 23
Figura 1.20	Pasos para determinar la estructura tridimensional de una proteína 25
Figura 4.4.-	Representación de la estructura de la proteína de fusión 28
Figura 5.21.-	Cinética de expresión 1 33
Figura 5.22.-	Cinética de expresión 2 33
Figura 5.3.-	Estructura de la columna complejada con níquel 34
Figura 5.31.-	Lavados de columna de níquel 35
Figura 5.4.-	Sitio de corte con trombina 36
Figura 5.41	Cinética de corte con trombina 1 37
Figura 5.42	Cinética de corte con trombina 2 38
Figura 5.5.-	Lavados de columna de níquel después de corte con trombina 40
Figura 5.61	Cromatograma de primera purificación en HPLC 42
Figura 5.62	Cromatograma de segunda purificación en HPLC 43
Figura 5.7.-	Espectro de masa MALDI-TOF 45
Figura 5.8	Espectro Tx1M1P1 46
Figura 5.81	Espectro Tx1M1P2 47
Figura 5.82	Espectro TOCSY 48
Figura 5.83	Espectro NOESY 49
Figura 5.9	Estructura tridimensional 50
Figura 5.91	Gráficos de distribución de señales NOE en Tx1M1P1 51
Figura 5.92	Gráficos de distribución de señales NOE en Tx1 51

Tablas		Página
Tabla 5.1.-	Resultados de la transformación	31
Tabla 5.2.-	Variables durante la expresión	32
Tabla 5.6.-	Gradiente para purificar GS-Tx1M1	41

## Resumen

Se sintetizó, purificó, caracterizó y determinó la estructura tridimensional de la k-BUTX-Tt2b una toxina proveniente del alacrán *Tityus trivitattus*, originario de Argentina [21] La k-BUTX-Tt2b constituida por 30 aminoácidos la cual su principal característica de esta toxina es presentar un patrón de conectividad entre cisteínas C1-C5, C2-C4, C3-C6, estos enlaces disulfuro son no convencionales. Esta característica le otorga a la toxina k-BUTX-Tt2b un motivo estructural CS $\alpha$ / $\alpha$  diferente a las toxinas convencionales provenientes de los alacranes [21]. Los motivos estructurales que se encuentran normalmente son CS $\alpha$ / $\beta$  y presentan conectividades de enlaces disulfuro C1-C4, C2-C5, C3-C6 [27,5]

Con el interés de conocer y obtener información sobre la estabilidad este tipo de motivo estructural se construyeron mutantes derivadas de la k-BUTX-Tt2b; en estas mutantes se varia un residuo de aminoácido en la cadena.

Se generó la mutante Tx1M1 la cual contiene 30 aminoácidos

k-BUTX-Tt2b      GSGCM PEYCA GQCRG KVSQD YCLKN CRCIR

Tx1M1            GSGCM KEYCA GQCRG KVSQD YCLKN CRCIR

En este trabajo se plantea trabajar con el plásmido pET32-a Tx1M1 el cual contiene el gen que codifica para la proteína Tx1M1. Este plásmido se amplificará en células DH5 $\alpha$  para su posterior transformación y biosíntesis en células Rosseta. Finalizada la biosíntesis se procede a su purificación y caracterización mediante resonancia magnética nuclear y la obtención de su masa mediante espectrometría de masas.

## Capítulo 1

### Antecedentes

Los alacranes son animales muy antiguos, se estima su existencia en nuestro planeta desde hace unos 400 millones de años. Durante ese tiempo han desarrollado mecanismos de defensa. Uno de estos mecanismos y de lo más estudiados es el empleo de su veneno, el cual es una mezcla de sustancias químicas. Los componentes más importantes, desde el punto de vista médico son péptidos tóxicos o simplemente toxinas. Las toxinas son las responsables de producir el envenenamiento que se observa después de una picadura. Las toxinas se adhieren a otras proteínas que existen en la membrana celular lo que causa síntomas de intoxicación. Algunas toxinas son específicas para ciertos animales. Como consecuencia de lo anterior solo algunas afectan al hombre. El estudio bioquímico de los componentes del veneno del alacrán es útil en el desarrollo de posibles fármacos y biopesticidas. [6,18].

#### 1.1 Toxinas de Alacranes.

Una toxina se puede encontrar en los venenos producidos por organismos vivos, los cuales pueden ser animales, plantas e insectos, entre otros. Este veneno incorporado en el organismo es capaz de producir alteraciones funcionales y en algunas ocasiones la muerte. El veneno es un sistema de defensa o de depredación que ha permitido la evolución, desarrollo y sobrevivencia de algunas especies [16,18]. Las toxinas afectan normalmente la función de los canales iónicos; ya que las toxinas de naturaleza proteica se unen al poro en la región externa del canal y lo ocluyen físicamente impidiendo la conducción de los iones, lo que produce alteraciones funcionales. Estos canales iónicos pueden ser de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$  [3, 18]. Las toxinas bloqueadoras de canales iónicos son de bajo peso molecular,

contienen entre 22 y 75 aminoácidos. Estas moléculas son estabilizadas mediante enlaces disulfuro [18]. Los puentes disulfuro formados por cisteínas le otorgan, rigidez y una gran estabilidad a la toxina, además de proporcionarle una estructura tridimensional única (4, 9). Esta estructura podría coadyuvar al estudio de la interacción toxina-canal.

La estructura de las toxinas puede presentar una o más hélices alfa y hebras beta, como también la combinación de ambas. Como se muestra en la siguiente figura:

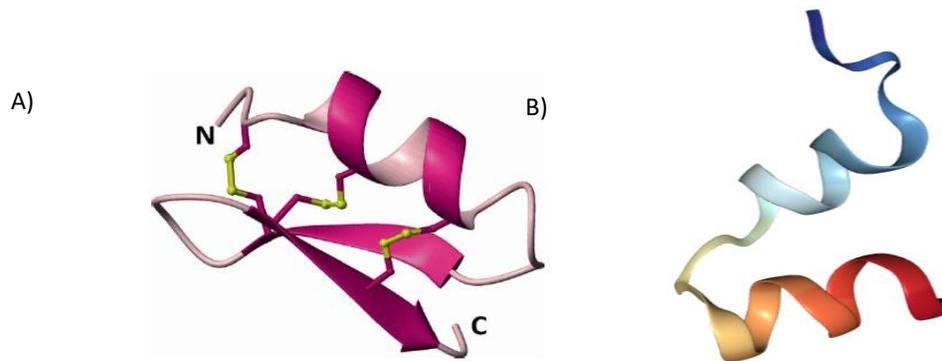


Figura 1.1.- Estructura tridimensional en la representación de listones de proteínas el inciso A corresponde a la Tamapina (imagen modificada de la referencia 19), los puentes disulfuro se indican en color índigo. El inciso B corresponde a la tóxina OmTx1(imagen modificada de la referencia 2).

Las toxinas bloqueadoras de canales potasio pueden clasificarse en subfamilias las cuales son:  $\alpha$  ( $\alpha$ -KTx),  $\beta$  ( $\beta$ -KTx),  $\gamma$  ( $\gamma$ -KTx) y k (k-KTx) [18].

Las toxinas  $\alpha$ -KTx son las proteínas más estudiadas ya que son las más abundantes en los venenos de alacrán y están conformadas de 23 a 43 aminoácidos cuya estructura cuenta con la presencia de 3 a 4 enlaces disulfuro, presentan el motivo de plegamiento más frecuente entre las toxinas de origen animal. Este motivo

presenta hélices alfa unidas a hebras beta por puentes disulfuro; a esta combinación se le denomina motivo CS $\alpha$ / $\beta$ . Estas toxinas son conocidas por bloquear canales tipo Kv Shaker [18].

Las toxinas  $\beta$ -KTx están formadas por proteínas por aproximadamente 47 a 84 residuos de aminoácidos estabilizados por 3 puentes disulfuro. En esta familia se han determinado enlaces disulfuro con un motivo estructural CS $\alpha$ / $\beta$  [3, 18].

Las toxinas  $\gamma$ -KTx está formada por proteínas de 36 a 47 aminoácidos con la presencia de 3 o 4 puentes disulfuro. Adoptan el motivo estructural CS $\alpha$ / $\beta$  [18]. La característica principal de este tipo de toxinas es que bloquean el canal *ether a go go*.

Las toxinas k-KTx están formadas por aproximadamente 22 a 28 residuos de aminoácidos. Esta familia presenta un motivo estructural CS $\alpha$ / $\alpha$  estabilizado por dos puentes disulfuro [2, 18, 23]

El escorpión *Tityus trivitattus* es la especie más peligrosa en Argentina. El piquete de esta especie genera vómito, hipertensión, taquicardia e incluso la muerte [1]. Por esta razón es importante estudiar y conocer la composición química del veneno y su interacción con el organismo. En el veneno del escorpión *Tityus trivitattus* se han identificado algunas toxinas como la Tt28 [11,3], TtBut-toxin [2] y k-BUTX-Tt2b (Tx1) [21].

#### 1.2 k-BUTX-Tt2b(Tx1)

La toxina k-BUTX-Tt2b(Tx1) fue identificada en el veneno del alacrán de Argentina *Tityus trivitattus* [5,9]. Presenta un motivo estructural CS $\alpha$ / $\alpha$ , estabilizado por tres

puentes disulfuro no convencionales en las toxinas del alacrán (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) [21], a continuación, se presenta su estructura en la figura 1.2;

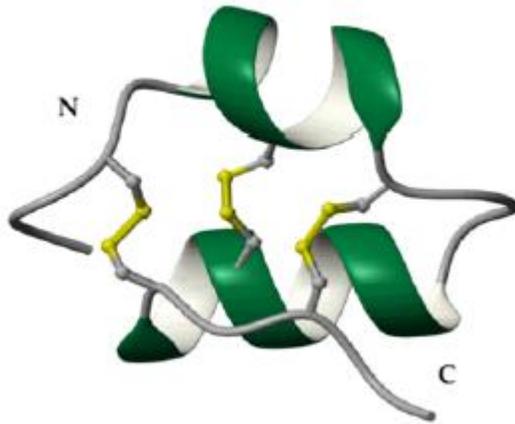


Figura 1.2 Estructura de la toxina k-BUTX-Tt2b (Tx1) resuelta por RMN. Los puentes disulfuro se representan en color amarillo (imagen de la referencia 21).

### 1.3 Ts16

La Ts16 es una toxina que se encuentra en el veneno de escorpión *Tityus serrulatus* (alacrán brasileño). En el año 2012 se determinó su estructura tridimensional ya que posee una identidad del 86% similar en la cadena de aminoácidos a la toxina k-BUTX-Tt2b(Tx1). La posición 4 intercambia prolina por lisina, en el sitio 23 asparagina por histidina en el sitio 25 arginina por lisina y la existencia de una prolina en la parte final de la cadena de aminoácidos. Su estructura se representa en la figura 1.3 y presenta un motivo estructural CS $\alpha$ / $\alpha$ , estabilizado por tres puentes disulfuro no convencionales en las toxinas del alacrán (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) [11, 21]

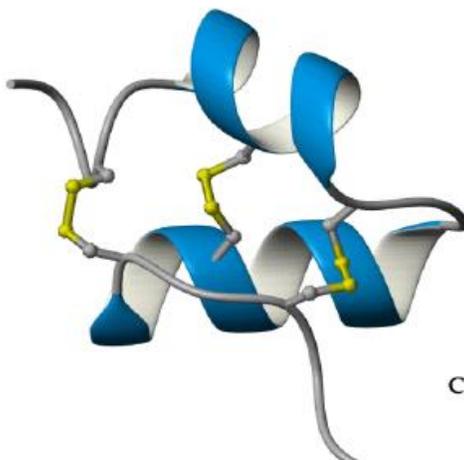


Figura 1.3- Estructura de la toxina Ts16 resuelta por RMN. Los puentes disulfuro se representan de color amarillo (imagen de la referencia 11).

#### 1.4 Tx1M2 y Tx1M1

En el 2012 se planteó obtener mutantes intermediarias entre las toxinas ts16 y k-BUTX-Tt2b con el objetivo de corroborar la estabilidad de la estructura hélice  $\alpha/\alpha$  y el puente disulfuro no convencional. Las mutantes intermedias se construyeron partiendo de k-BUTX-Tt2b a Ts16 donde hay una diferencia de tres aminoácidos en la secuencia de aminoácidos; las toxinas intermediarias se nombraron Tx1M1 y Tx1M2.

A continuación, se presentan las secuencias de las toxinas Ts16, k-BUTX-Tt2b y las mutantes intermediarias:

	5	10	15	20	25	30
k-BUTX-Tt2b	GSGCM	PEYCA	GQCRG	KVSQD	YCLKN	CRCIR
Ttx1M1	GSGCM	KEYCA	GQCRG	KVSQD	YCLKN	CRCIR
Tx1M2	GSGCM	KEYCA	GQCRG	KVSQD	YCLKH	CKCIR
Ts16	GSGCM	KEYCA	GQCRG	KVSQD	YCLKH	CKCIPR

#### 1.5 Tx1M2

En el 2012 se obtuvo la mutante intermedia Tx1M2 con el sitio 4 donde se intercambia prolina por lisina, en el sitio 23 asparagina por histidina en el sitio 25 arginina por lisina. Su estructura se representa en la figura 1.5 y presenta un motivo estructural CS  $\alpha/\alpha$ , estabilizado por tres puentes disulfuro no convencionales en las toxinas del alacrán (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) [3].

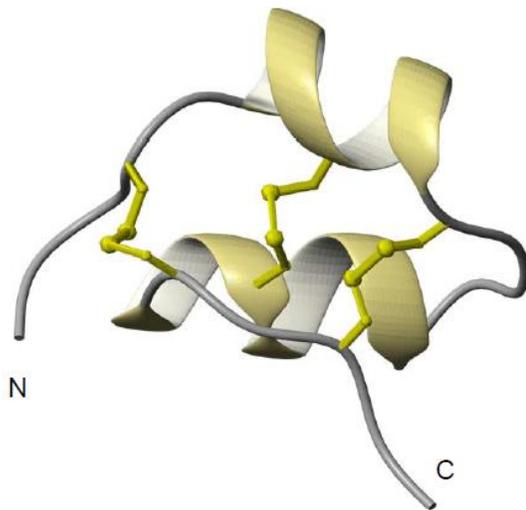


Figura 1.5- Estructura de la toxina Tx1M2 resuelta por RMN (imagen de la referencia 3)

#### 1.6 Tx1M1

Es la primer mutante derivada de la toxina k-BUTX-Tt2b donde se intercambia en el sitio 4 una prolina por lisina, con esta modificación se plantea corroborar la estabilidad del motivo estructural  $CS\alpha/\alpha$  y la formación del puente disulfuro no convencional mediante la biosíntesis, purificación, caracterización y determinación de la estructura por RMN.

#### 1.7 Aminoácidos

En el humano existen 20 diferentes aminoácidos que son los principales constituyentes de las proteínas y péptidos (15). Los aminoácidos tienen un grupo amino y un grupo carboxilo unidos a un átomo de carbono (carbono  $\alpha$ ), como se representa en la figura 1.7, lo que hace diferente cada aminoácido es el grupo R unido al carbono  $\alpha$ ; esto le otorga diferente reactividad química debido al tamaño, carga eléctrica, y estructura química (15).

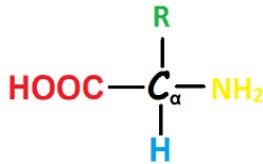


Figura 1.7.- Estructura general de un aminoácido. Los carbonos adicionales en el grupo R se designan comúnmente como  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ . (figura modificada de la referencia 15).

Los aminoácidos forman cadenas de aminoácidos mediante enlaces covalente, este enlace se forma por la pérdida de un átomo de hidrógeno en el grupo amino unido al carbono  $\alpha$  como se ejemplifica en la figura 1.8, la pérdida de un grupo hidroxilo del grupo carboxilo unido al carbono  $\alpha$ . Las unidades de un aminoácido se denominan residuos de aminoácido, dentro de la estructura el grupo  $\alpha$  amino libre en la cadena de denomina “amino terminal o N-terminal” y el extremo carboxilo se conoce como carboxilo terminal (C-terminal).

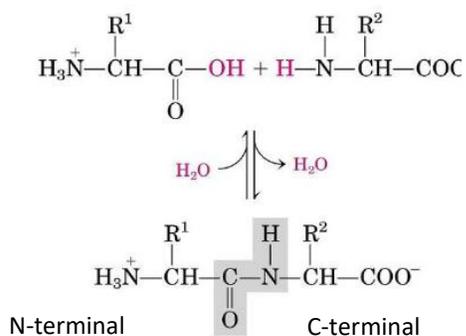


Figura 1.71 Formación de un enlace peptídico mediante un enlace covalente. (imagen modificada de la referencia 15).

### 1.8 Proteínas

Las proteínas son las macromoléculas que intervienen en los procesos bioquímicos dentro de la célula. Su función depende de su estructura, la cual se establece en 4

niveles; la estructura primaria es una descripción secuencial de los enlaces covalentes, donde se describen los residuos que conforman la proteína.

### 1.9 Estructura secundaria

La estructura secundaria describe la disposición espacial de los residuos de un segmento específico de la cadena, esta estructura está establecida por las interacciones de puentes de hidrógeno. Las principales conformaciones que establecen estas estructuras son hélices  $\alpha$ , hojas  $\beta$  y vueltas. En la figura 1.9 se presenta un ejemplo;

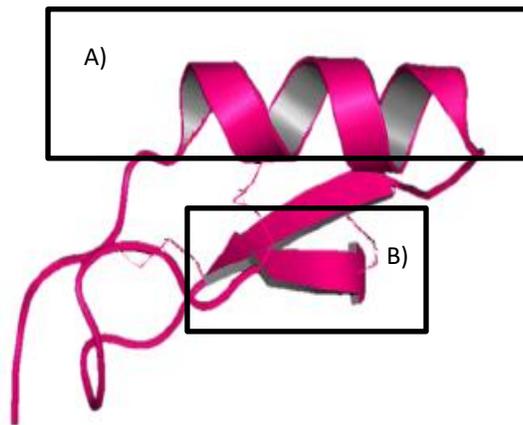


Figura 1.9 Estructura de tridimensional de una proteína. El inciso A) corresponde a una hélice  $\alpha$  y el B) corresponde a una hebra  $\beta$  (imagen modificado de la referencia 7).

### 1.10 Estructura terciaria

La estructura terciaria es la disposición espacial de los elementos de las estructuras secundarias. Por ejemplo, en el plegamiento de una proteína donde pueden interactuar una hélice  $\alpha$  con una hebra  $\beta$ . Las principales interacciones que constituyen esta estructura son aquellas interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas que tiene con el medio y con los mismos residuos de aminoácidos de la cadena proteica. Otra interacción que le da estabilidad a la estructura terciaria son los enlaces disulfuro que se forman a partir de pares de cisteínas en la proteína, como se muestra en la figura 1.10

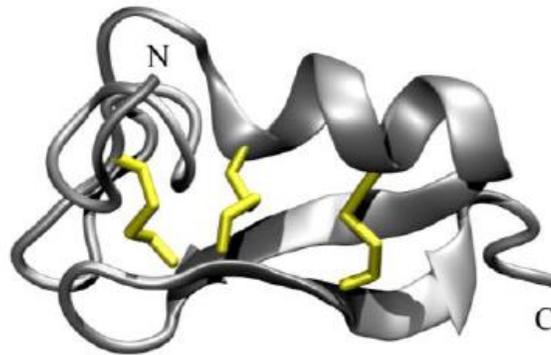


Figura 1.10 Estructura de una tóxina de alacrán Hg36. La estructura tridimensional que adopta la tóxina está estabilizada por tres puentes disulfuro, una hélice alfa y dos hebras beta, los enlaces disulfuro se representan de color amarillo (imagen modificada de la referencia 10).

#### 1.11 Estructura cuaternaria

La estructura cuaternaria es aquella que está formada por más de una cadena polipeptídica, estas pueden ser iguales o diferentes. La interacción de estas cadenas le otorga la función biológica dentro de la célula [15].

#### 1.12 Resonancia Magnética Nuclear

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear es una técnica basada en la interacción de la materia con la radiación electromagnética, donde el fenómeno de resonancia magnética nuclear es el principal fundamento para realizar estudios de las propiedades físicas, químicas y biológicas de la materia [12]. El fenómeno de resonancia magnética nuclear está basado en la manipulación del espín del núcleo en un campo magnético mediante la radiación electromagnética la cual se encuentra en la región de las radiofrecuencias [10, 12].

### 1.13 Espín nuclear.

El espín ( $I$ ) es una propiedad cuántica del núcleo atómico, la cual adquiere valores en múltiplos de  $\frac{1}{2}$ , pueden ser positivos o negativos. Los espines de mayor interés en RMN son aquellos que adquieren un valor de  $I = \frac{1}{2}$  (isótopos de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ ), de esta forma puede adquirir dos valores  $m$ ,  $-\frac{1}{2}$  y  $+\frac{1}{2}$  los cuales distinguimos como estados  $\alpha = +\frac{1}{2}$  y  $\beta = -\frac{1}{2}$  en donde  $\alpha$  es el estado de menor energía [10 ,12].

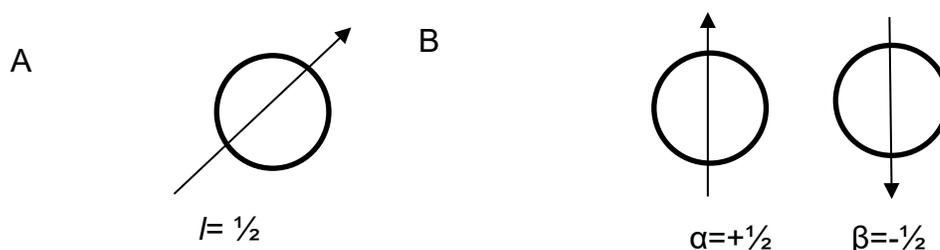


Figura 1.13.- El inciso A representa el espín para un núcleo con valor  $I = \frac{1}{2}$ , el inciso B representa los valores que puede adquirir un núcleo con valor  $I = \frac{1}{2}$

### 1.14 Magnetización

Los núcleos en movimiento generan momentos magnéticos nucleares  $\mu$ , al aplicar un campo magnético ( $B_0$ ) el momento magnético se orienta en dirección a favor y/o en contra del campo magnético. Esta propiedad es proporcional al vector del momento angular del espín y se representa la siguiente forma

$$\mu = \gamma P$$

donde la constante giromagnética  $\gamma$  es una constante característica del núcleo. Esta constante determina la sensibilidad del núcleo, a mayor constante giromagnética,

mayor sensibilidad. Un experimento de RMN será más rápido de adquirir mientras mayor sea el valor de  $\gamma$ .

La contribución de todos los núcleos alineados se conoce como vector de magnetización ( $B_1$ ). Supongamos que el vector de magnetización se encuentra en el espacio  $x,y,z$  y el campo magnético está orientado en dirección  $z$ , por lo tanto el vector de magnetización está orientado en dirección  $z$ , si la magnetización es modificada por un campo magnético transversal  $B_1$  y es irradiado por un pulso de radiofrecuencia sobre el eje  $x$ , este se inclinará en dirección de las manecillas del reloj formando un ángulo  $\theta$  con respecto a los ejes  $z$  y  $y$ . Una vez que se aplica  $B_1$  y terminado el pulso,  $B_1$  comenzará a rotar sobre el plano  $xy$  para regresar al equilibrio, a este fenómeno se le conoce como precesión de Larmor  $\omega_0$ . La precesión de Larmor se representa como:

$$\omega_0 = -\gamma B_0$$

donde  $\gamma$  es el radio giromagnético del núcleo y  $B_0$  el campo magnético.

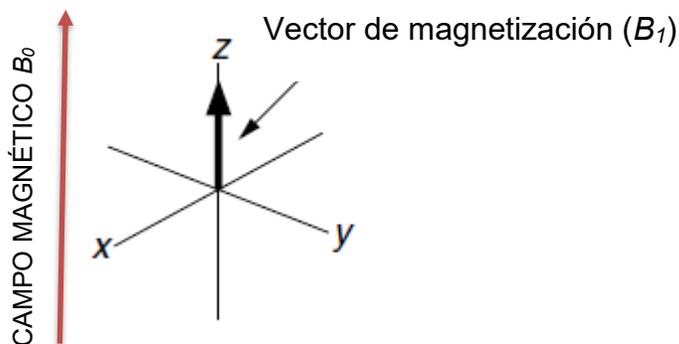


Figura 1.14 Representación del vector de magnetización ( $B_1$ ), (imagen modificada de la referencia 12).

### 1.15 Detección

La inducción magnética producida por la rotación de la magnetización es la propiedad detectable en un experimento de RMN. La magnitud de esta corriente está en función del tiempo; una vez aplicado el pulso la magnetización decae hasta regresar al equilibrio. La señal adquirida se conoce como FID (Free Induction Decay) y es lo que permite obtener un espectro de RMN [12]. El tratamiento empleado es la transformada de Fourier el cual permite cambiar el dominio de la función del tiempo al de frecuencias [12].

### 1.16 Desplazamiento químico

La escala de desplazamiento químico se establece usando un compuesto de referencia, el cual define el punto cero del desplazamiento químico. Para compuestos con  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se utiliza TMS. La posición de cada pico en el espectro se obtiene usando la frecuencia de aparición de esta señal con respecto a la frecuencia de referencia [12].

Expresión matemática de desplazamiento:

$$\delta(\text{ppm}) = 10^6 \times \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_{ref}}$$

Los núcleos que son equivalentes experimentan el mismo ambiente químico y por lo tanto tendrán el mismo desplazamiento químico pero aquellos núcleos que experimentan ambientes químicos diferentes tendrán diferente desplazamiento químico (12). Esto se debe a que el campo magnético  $B_0$  que siente cada uno de los núcleos es apantallado por la densidad electrónica generada por los electrones que rodean al núcleo y, así el efecto de  $B_0$  disminuye sobre el núcleo. Cuando los núcleos se encuentran a corta distancia, medida a través de los enlaces, existe un

fenómeno que se conoce como acoplamiento espín- espín o acoplamiento escalar ( $J$ ), el acoplamiento escalar no se manifiesta en núcleos equivalentes. [10, 12].

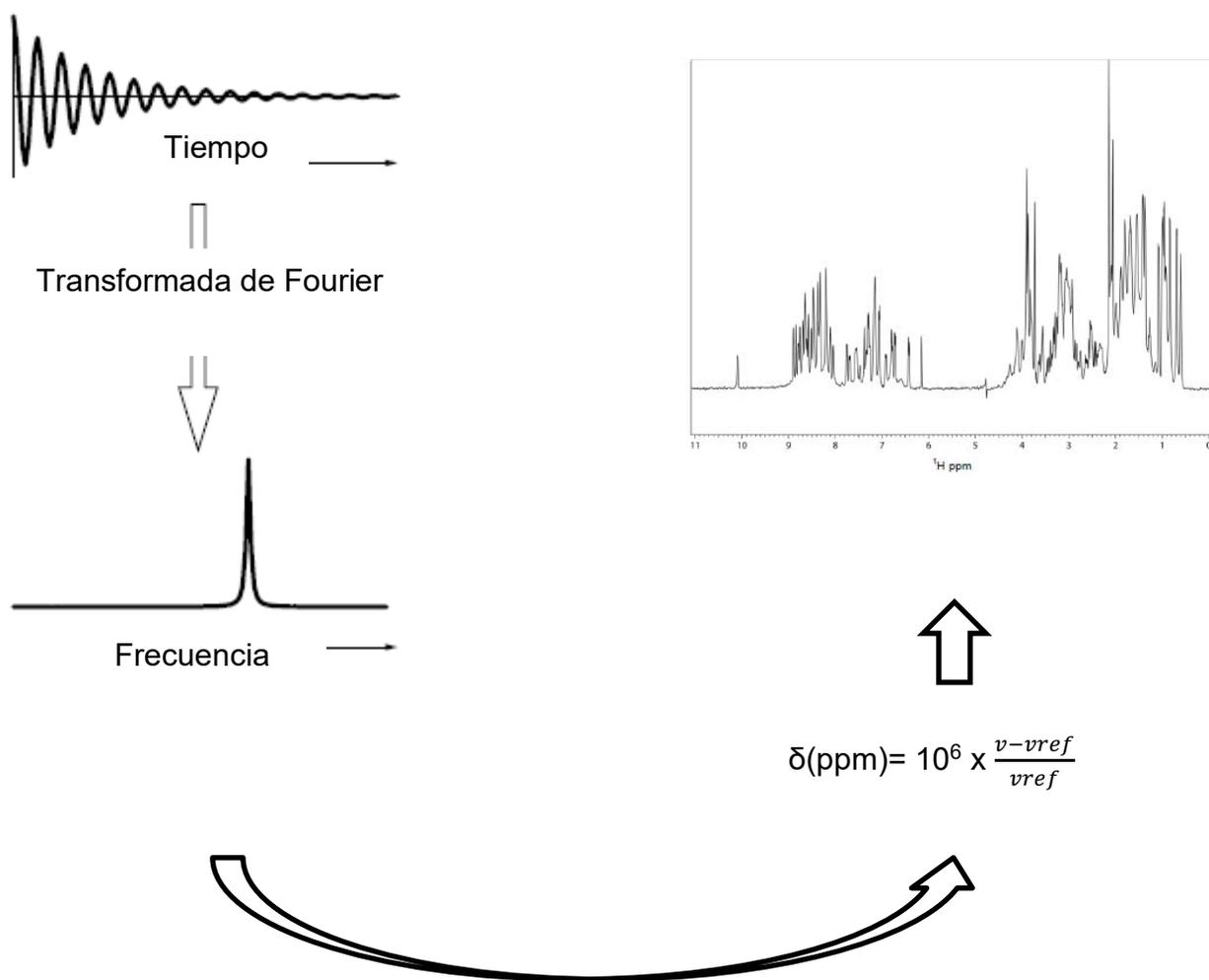


Figura 1.16 Diagrama general de cómo se obtiene un espectro de RMN. A) Las señales están en función del tiempo. B) Utilizando la transformada de Fourier las señales cambian de dominio, ahora estarán en función de la frecuencia C) La frecuencia queda en función de partes por millón (ppm) y D) Se obtiene el espectro de RMN. Imagen modificada de la referencia [12].

### 1.17 Acoplamiento dipolar

El acoplamiento dipolar se manifiesta a través de la proximidad espacial de los núcleos, y depende de la orientación de  $B_0$ . En el estado líquido, esta propiedad se manifiesta a través del Efecto Nuclear Overhauser (NOE). La intensidad del NOE depende de la distancia de los núcleos acoplados mediante la siguiente ecuación:

$$I_{(NOE)} = k / (r_{AB})^6$$

$k$  es una constante de proporcionalidad y  $AB$  es la distancia entre los núcleos.

Este acoplamiento es fundamental en la determinación de estructuras secundarias y terciarias en moléculas como las proteínas ya que este acoplamiento determina las interacciones entre átomos de hidrógenos. Estas distancias se transforman en restricciones para poder determinar la estructura de las proteínas.

### 1.18.-RMN de proteínas.

La función biológica de una proteína está relacionada con su estructura tridimensional. Por este motivo la espectroscopia de RMN es una poderosa técnica que se ha empleado para estudiar la estructura de las proteínas, ya que permite estudiar la dinámica de proteínas en disolución. La RMN permite determinar estructuras en moléculas que no se pueden cristalizar y analizar por cristalografía de rayos X de cristal único. Los estudios de RMN se pueden realizar empleando diferentes condiciones (pH, temperatura) la interacción de la molécula con el medio que la rodea. [10, 26].

### 1.19 Experimentos en dos dimensiones

Debido a la gran cantidad de átomos de hidrógeno en una proteína, en un experimento de RMN en una dimensión las señales de protón se traslapan, lo que hace difícil la interpretación de los espectros. Por tal razón se utilizan experimentos en dos dimensiones(2D) y tres dimensiones (3D). La información más importante es obtenida a partir del Efecto Nuclear Overhauser (NOE) el cual se da por el acoplamiento dipolar. En un espectro 2D NOESY se muestran señales con las cual podemos identificar sistemas de aminoácidos y la correlación que estos tienen a sus aminoácidos más próximos. En un experimento TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) podemos identificar sistemas de espín ya que observamos las correlaciones que hay de todos los núcleos. (26)

### 1.20 Determinación de estructura

En la figura 1.20 se muestra de forma secuencial cómo se determina una estructura tridimensional de una proteína:

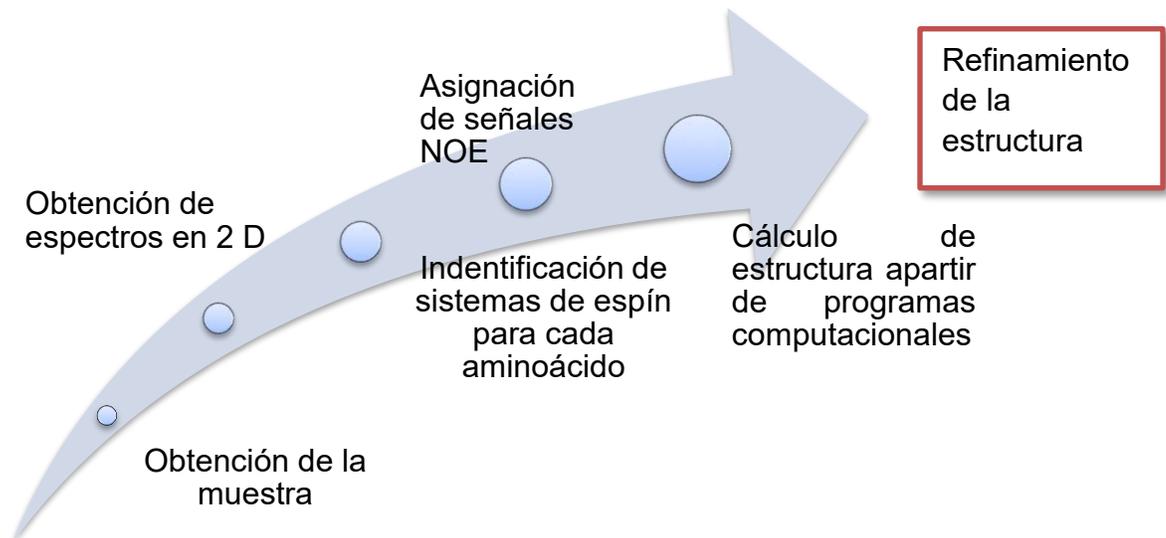


Figura 1.20. Se representa de forma secuencial la obtención una estructura tridimensional de proteínas.

## Capítulo 2

### Hipótesis

La proteína Tx1M1 presentará un motivo estructural CS $\alpha$ / $\alpha$  lo cual permitirá corroborar la existencia de esta nueva familia de toxinas bloqueadoras de potasio.

## Capítulo 3

### 3.1 Objetivos generales.

Expresar, purificar, caracterizar y determinar la estructura de la proteína Tx1M1 mediante H-RMN.

### 3.2 Objetivos particulares.

-Transformar el plásmido pET32a-Tx1 con células Rosseta y expresar la proteína Tx1M1

-Extraer la proteína Tx1M1

-Purificar por técnicas cromatográficas a la proteína Tx1M1.

-Obtener los espectros de RMN TOCSY y NOESY de la proteína Tx1M1.

Analizar e interpretar los espectros de RMN para definir su estructura en tres dimensiones.

-Corroborar la existencia del motivo CS  $\alpha$ / $\alpha$  entre la proteína mutante y la proteína k-BUTX-Tt2b.

## Capítulo 4

### Desarrollo Experimental

#### 4.1 Transformación

A 50  $\mu$ L de células DH5 $\alpha$  se le agregaron 3  $\mu$ L de plásmido pET32a-Tx1M1 que contiene al gen Tx1M1. Se utilizan dos alícuotas más de células para utilizarlas como controles positivo y negativo de crecimiento bacteriano. Se mantienen en hielo durante 30 minutos. Después de los 30 minutos se da un choque térmico de 42 a

45 segundos. Finalizado el choque térmico se mantiene en hielo por 5 minutos. Se agregan 450 µL de medio LB y se cultiva una hora a 37 °C. Pasada la hora se siembran las células en una caja Petri que contiene ampicilina [16].

El plásmido es resistente a la ampicilina, mientras que la célula DH5α no tiene ninguna resistencia a antibióticos por lo tanto si hay una correcta transformación esta resistencia será conferida a la célula DH5α y se observará crecimiento de colonias dentro de la caja Petri.

En el caso del control positivo de crecimiento, las células se siembran en una caja que contiene LB, para el control negativo se utiliza una caja con medio LB y ampicilina. En el primer caso debe haber crecimiento y en el segundo no, pues las células no contienen resistencia a ningún antibiótico.

#### 4.2 Preinóculo

Se toma una colonia dentro de la caja Petri y se cultiva 14 horas a 37 °C en medio LB con ampicilina. [16]

#### 4.3 Purificación de Plásmido.

La purificación del plásmido se realiza de acuerdo al manual QIAprep

#### 4.4 Expresión de Tx1M1

El plásmido pET-32a contiene la secuencia que codifica a la toxina recombinante Tx1M1, la construcción del plásmido está constituida por un segmento de Tiorredoxina la cual favorece el plegamiento en proteínas, 6 histinas que permite purificar toxinas mediante cromatografías metal/quelato (Histag), un sitio de reconocimiento de corte con trombina para liberar la toxina objetivo de la proteína de fusión y la toxina Tx1M1. Como se muestra en la figura 4.4;



Figura 4.4 Representación de la estructura de la proteína de fusión. Su construcción contiene Tiorredoxina, un Histag, un sitio de corte con trombina y la toxina Tx1M1.

Se agregan 3 $\mu$ L de plásmido, que contiene al gen GS-Tx1M1, a 50  $\mu$ L de células Rosetta. Se mantiene en hielo durante 30 minutos. Después de los 30 minutos se da un choque térmico de 45 segundos a 42 °C. Finalizado el choque térmico se mantiene en hielo por 5 minutos.

Se agregan 200  $\mu$ L de medio LB y se cultiva una hora a 37 °C. Pasada la hora se siembran las células en una caja Petri que contiene ampicilina y cloranfenicol. [16]

El plásmido es resistente a la ampicilina, mientras que la cepa Rosetta tienen resistencia al cloranfenicol por lo tanto si hay una correcta transformación esta resistencia será conferida a la célula Rosetta con el plásmido de expresión y se observará el crecimiento de cultivos dentro de la caja Petri.

Para el cultivo en la caja Petri de la muestra se utiliza una caja que contiene LB, ampicilina y cloranfenicol, para la prueba positiva se utiliza sólo una caja con medio LB y cloranfenicol mientras que para la prueba negativa se utiliza una caja que contiene LB, ampicilina y cloranfenicol.

Se preparó 6.2 litros de medio LB, el cual se esterilizó en autoclave a 120 °C y 16 PSI agregando la cantidad adecuada de cloranfenicol y ampicilina. Se toma una colonia de cepa y se cultiva por 14 horas a 37 °C

Después de que el preinóculo crece por 14 horas, se debe medir el crecimiento de bacterias hasta alcanzar una densidad óptica de 0.700 unidades de absorbancia a 600nm. Se lleva a cabo la inducción con IPTG, y se continúa la incubación a 30°C por 14 horas [16].

#### 4.5 Lisis celular

Se obtiene la fracción celular mediante centrifugación. Estas células son lisadas para la posterior purificación de la proteína. Se lleva a cabo la sonicación en un equipo Misonix 30000 a una potencia de 50W en tiempo de descanso de 30 segundos y tiempo de sonicación de 15 segundos con un tiempo efectivo de 10 minutos, para disolver la fracción celular, se utiliza buffer de lisis (Tris=50mM/pH=8, NaCl = 150mM e imidazol = 15mM).

Terminada la lisis celular se centrifuga la fracción durante 45 minutos a 17 000 rpm. El sobrenadante se separa del botón formado. El sobrenadante se mantiene en hielo y se filtra en un poro de 0.45 µm.

#### 4.6 Purificación por CAMQ.

La purificación se lleva a cabo por cromatografía de afinidad metal-Quelato (CAMQ) usando una columna de Ni<sup>2+</sup>. Se pasa una pequeña fracción de volumen de disolución buffer de lisis (Tris=50mM/pH=8, NaCl = 150mM e imidazol = 15mM) para equilibrar la columna. Se hace pasar disolución amortiguadora de lisis, esto generará que la proteína se quede complejada a la columna. Después se pasa por la columna una fracción de Imidazol la cual desplazará a la proteína y permitirá su elución. Se colecta la fracción eluída la cual contiene a la proteína [16].

#### 4.7 Diálisis y reacción de corte.

La diálisis se lleva a cabo en membranas de diálisis colocando la fracción eluída de proteína. Para realizar la diálisis se utiliza una disolución de buffer de corte (Tris=50mM/pH=8, NaCl = 150mM), la membrana se coloca en agitación.

La reacción de corte se realiza con proteasa trombina, la cual se activa con amortiguador de corte y  $\text{CaCl}_2 = 10\text{mM}$  donde se utiliza una cantidad máxima de 100 $\mu\text{g}$ .

#### 4.8 Segunda purificación por CAMQ

La disolución de corte se filtra en 0.45  $\mu\text{m}$  para su posterior purificación en CAMQ.

La purificación se lleva a cabo por cromatografía de afinidad metal-Quelato (CAMQ) usando una columna de  $\text{Ni}^{2+}$ . Se pasa una pequeña fracción de volumen de disolución amortiguadora de buffer de corte para equilibrar la columna, se pasa la muestra y la fracción eluída es recolectada. En este caso la fracción que nos interesa es la que no se compleja en la columna.

#### 4.9 Extracción en fase sólida.

La fracción eluída se pasa en una columna C18T Phenomenex, al pasar por la columna la muestra es concentrada

#### 4.10 Purificación por HPLC

Se lleva a cabo una purificación por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia de fase reversa. Aparato Varian-ProStar- Sistema de disolventes con gradiente binario; agua- acetonitrilo con 0.05% TFA. Se usa un gradiente lineal de 10% a 30% en 20 minutos en Columna C<sub>12</sub> Jupiter Proteo (Phenomenex) fase reversa. Cada muestra antes de inyectar debe ser filtrada a 0.22  $\mu\text{m}$ .

#### 4.11 Determinación de la masa.

Se determina su masa mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. El aparato es Bruker Daltonics MALDI-TOF, la matriz que se utiliza es  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico con una proporción diez veces mayor a la muestra, 1:10.

#### 4.12 Determinación de su estructura.

Se obtienen espectros  $^1\text{H}$ , NOESY (con tiempos de mezclado de 300 y 150 ms) y TOCSY (con tiempos de mezclado de 20 y 80 ms) mediante un espectrómetro de RMN Varian de 500MHz. La muestra fue preparada con una mezcla de 250  $\mu\text{L}$  al 95% agua y 5%  $\text{D}_2\text{O}$ .

### Capítulo 5

#### Resultados

##### 5.1 Transformación

Se sembraron 3 cajas Petri; la caja que contiene la muestra y el blanco negativo contiene ampicilina y cloranfenicol, la caja que contiene el blanco positivo solo contiene ampicilina.

Tabla 5.1 muestra los resultados durante la transformación en la caja muestra, blanco positivo y blanco negativo.

<b>CAJAS</b>	<b>CRECIMIENTO</b>
<b>MUESTRA</b>	Sí hubo crecimiento
<b>BLANCO POSITIVO</b>	Sí hubo crecimiento
<b>BLANCO NEGATIVO</b>	No hubo crecimiento

En la caja que contiene la muestra se observó crecimiento de colonias lo cual indica que la célula Rosetta adquirió el plásmido pET32-a-Tx1M1, pues este plásmido le confirió la resistencia al cloranfenicol. Para el blanco negativo no hubo crecimiento

de colonias lo cual indica que la célula Rosetta no tiene resistencia al cloranfenicol y la caja con el blanco positivo indica que la célula sí posee resistencia a ampicilina.

## 5.2 Expresión de Tx1M1

Para conocer el tiempo óptimo de expresión, la temperatura y concentración de IPTG se llevaron a cabo cinéticas de expresión con diferentes valores de las variables dichas anteriormente. Se toman muestras de 2 mL a partir del tiempo 0 por periodos de una hora durante 20 horas. El tiempo cero corresponde a la toma de muestra antes de iniciar la inducción. Las muestras son centrifugadas a 6500 rpm por 5 minutos, se descarta el sobrenadante y el pellet formado se resuspende con 100 µL buffer de lisis. Las muestras son lisadas y posteriormente centrifugadas, el botón se desecha y el sobrenadante se analiza con geles de poliacrilamida SDS; la muestra se disuelve en 100 µL buffer de carga

Se realizaron las cinéticas con las siguientes variables;

Tabla 5.2 Condiciones de expresión la cual se determinó que la concentración óptima de expresión de IPTG es al 0.5Mm con una temperatura de 30 °C.

<b>TEMPERATURA °C</b>	<b>IPTG (MM)</b>
<b>20</b>	0.1
<b>25</b>	0.5
<b>30</b>	1

Para analizar la muestra se utiliza un marcador de peso molecular, la proteína de fusión la cual contiene un peso molecular de 21.282 kD fue expresada y es

identificada entre las bandas de peso molecular entre 17.0 y 26.6 kD con un gel de poliacrilamida al 15%.

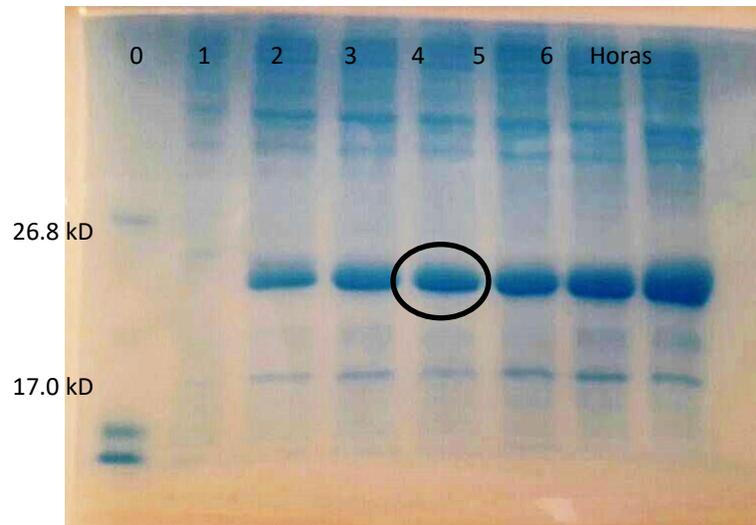


Figura 5.2.1 Gel poliacrilamida al 15%. Las muestras cargadas corresponden a la fracción soluble después de la lisis celular entre la hora cero y seis. El primer carril corresponde al marcador de pesos moleculares, la banda presente entre el peso 17.0 kD y 26.8 kD corresponde a la proteína de fusión Tx1M1.

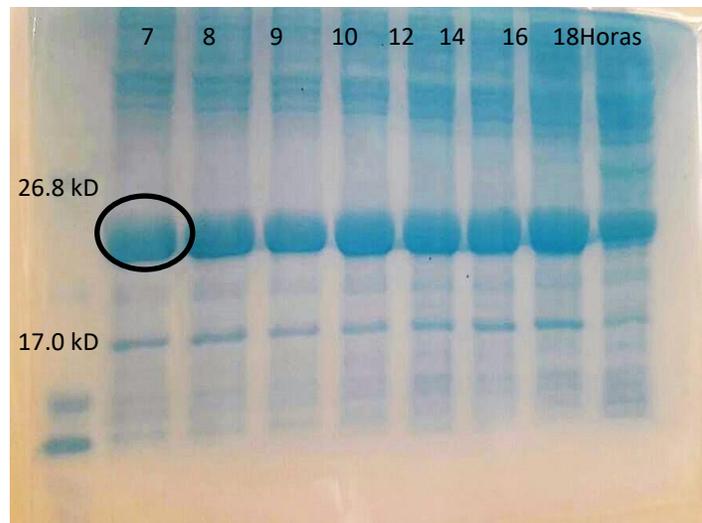


Figura 5.2.2 Gel poliacrilamida al 15%. Las muestras cargadas corresponden a la fracción soluble después de la lisis celular entre la hora siete a dieciocho. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular, la banda presente entre el peso 17.0 kD y 26.8 kD corresponde a la proteína de fusión Tx1M1.

El tiempo óptimo de expresión es a la hora seis ya que a partir de esa hora se ve un aumento máximo de proteína recombinante, después de la hora siete, ocho hasta dieciséis la intensidad de la banda es constante. A la hora dieciocho la banda decrece lo cual puede indicar que la toxina se degrada o la bacteria comienza a degradar a la proteína de interés

### 5.3 Cromatografía por afinidad metal quelato (CAMQ).

La resina está formada por perlas de agarosa reticuladas, las cuales forman una red tridimensional. Dentro de ella se encuentran adheridos grupos éteres los cuales están cruzados con ácido iminodiacético, el metal se compleja con el ácido iminodiacético. El metal podrá retener a la proteína de fusión por afinidad a la etiqueta de histidinas.

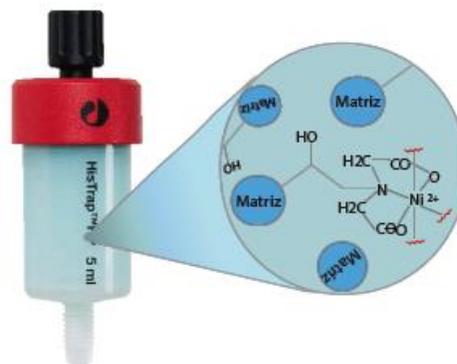


Figura 5.3 Estructura de la columna con níquel.

Después de las 6 horas de expresión las células se lisan, se centrifugan y el sobrenadante se filtra a través de un poro de 0.45  $\mu\text{m}$  para purificar dentro de la columna y evitar que esta se pueda ocluir, el sobrenadante se mantiene en hielo para evitar que las proteasas puedan digerir a la toxina de fusión. La proteína de fusión está diseñada para coordinarse con metales como  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  entre otros metales, esta coordinación se logra mediante la etiqueta de histidinas que está dentro de su secuencia. La proteína de fusión al pasar por la columna quedará retenida mientras las proteínas que no son afines al níquel eluyen y las proteínas que tienen poca afinidad con el níquel se podrán eluir con lavados de buffer de lisis. Una vez pasada la muestra se lava con agua y se realiza un gradiente con imidazol para eluir a la proteína de fusión, el imidazol tiene una mayor interacción con  $\text{Ni}^{2+}$  lo que permite desplazar a la proteína de fusión. Para corroborar que la muestra se retuvo y determinar a qué concentración de imidazol eluye se realiza un gel de poliacrilamida al 15%

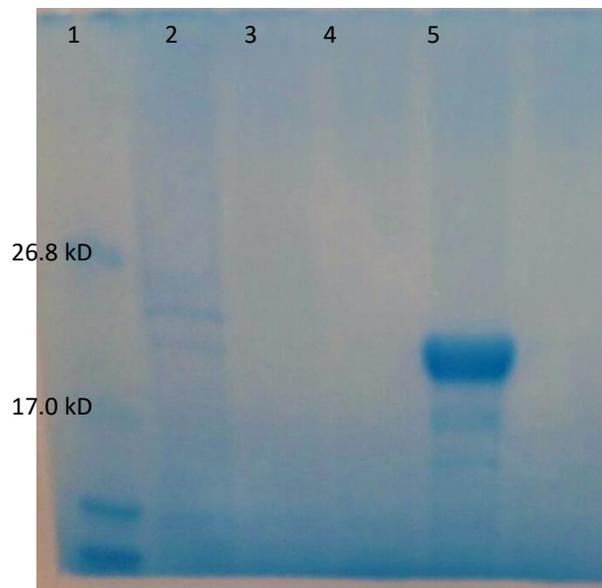


Figura 5.31.- Gel de poliacrilamida al 15%, el carril uno está el marcador de peso molecular, el carril dos es la muestra que no se compleja a la columna, los carriles tres y cuatro son eluciones con imidazol con una concentración de 30mM y 50 mM. El carril cuatro es la elución con una concentración de 300mM imidazol.

Se puede observar que la proteína de fusión queda retenida en la columna de afinidad metal quelato, ya que no se observa ninguna banda que corresponda a la proteína de fusión en la primera fracción eluída, en esta fracción eliminamos proteínas como las proteasas. Al realizar lavados con imidazol con 30mM y 50 mM se observa que no eluye proteína de fusión. Para una elución con 300Mm de imidazol se observa la banda que corresponde a la masa teórica que corresponde a la proteína de fusión.

#### 5.5 Corte con trombina

Para obtener sólo a la proteína GS-Tx1M1 se necesita eliminar de esta la cadena de aminoácidos que corresponde a la tiorredoxina-Histag-LVPR, la cadena de aminoácidos posee un sitio de reconocimiento de corte enzimático el cual es LVPRGS. Este sitio genera afinidad hacia la trombina la cual realiza la reacción de hidrólisis entre los aminoácidos R y G permitiendo separar la parte tiorredoxina-Histag-LVPR de la parte GS-Tx1M1. Como se muestra en la figura 5.4;



Figura 5.4 Sitio de corte con trombina en RG, el corte con trombina se realiza entre los aminoácidos de arginina (R) y glicina.

Para poder realizar el corte se necesita eliminar de la muestra el imidazol ya que este inhibe el corte con trombina, esto se hace mediante una diálisis con buffer de corte, se realizan tres cambios de amortiguador por periodos de 1 hora. Para realizar el corte se determinó la concentración de cofactor ( $\text{CaCl}_2=0.1\text{mM}$ ), concentración de muestra (0.5M), volumen de muestra (45mL) y cantidad de trombina (100 $\mu\text{L}$ ). Para analizar cómo varía el corte de trombina en función de tiempo se dejó un corte por treinta y seis horas tomando muestra cada dos horas las primeras veintitrés horas, estas muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 15%.

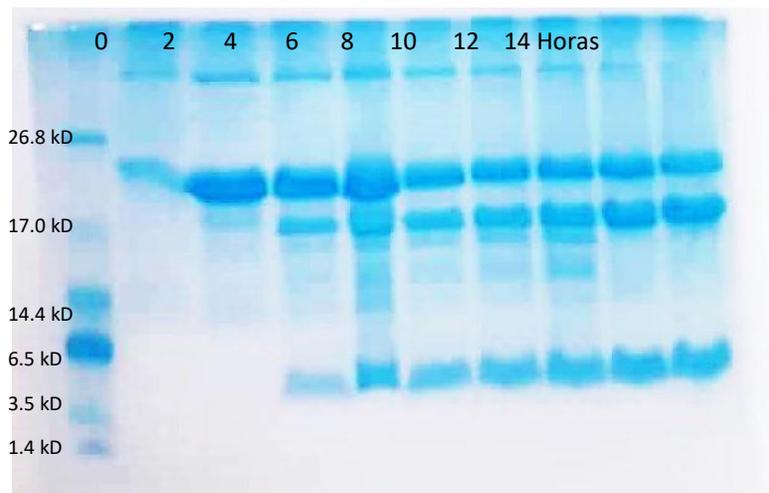


Figura 5.41.- Gel de poliacrilamida al 15%. El primer carril corresponde al indicador de peso molecular. El carril cero corresponde a la muestra antes de iniciar el corte. Los carriles del cuatro al diez corresponden a las muestras en el tiempo dos, cuatro, seis, ocho, diez y doce horas.

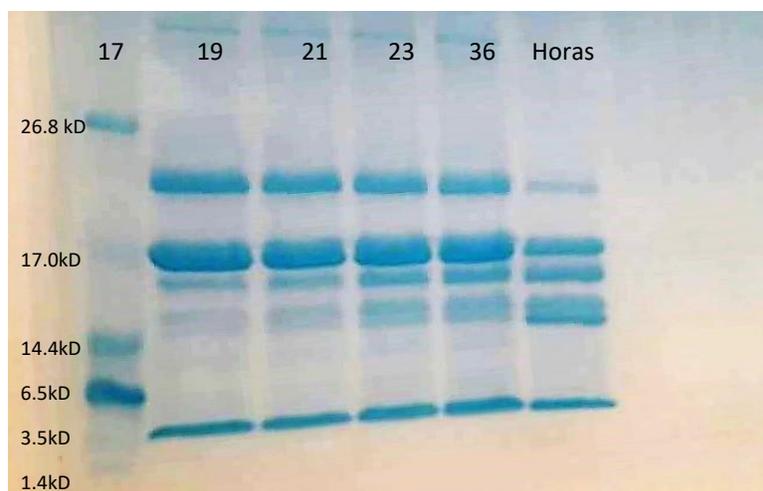


Figura 5.42.- Gel de poliacrilamida al 15%. El primer carril corresponde al indicador de peso molecular. El carril dos corresponde a la muestra antes de iniciar el corte. Los carriles a partir del dos al seis corresponden a las muestras en el tiempo diecisiete, diecinueve, veintiuno, veintitrés y treinta seis horas

El carril cero del gel de poliacrilamida corresponde a la muestra inicial y solo se observa la banda que corresponde a la proteína de fusión. A partir de la hora dos se observa una disminución de intensidad que corresponde a la proteína de fusión, además se observa la aparición de bandas; una se encuentran entre el peso 17.0 y 14.4 kD y otra que banda entre 3.5 y 1.4 kD. La banda entre 17.0 y 14.4 kD corresponde al residuo tiorredoxina-Histag-LVPR ya que tiene un peso de 17.9kD. La banda entre 3.5 y 1.4 kD corresponde a la proteína GS-Tx1M1 ya que su masa es de 3.35 kD. Con estas bandas se corrobora el tiempo de corte máximo es de cuatro horas ya que a ese tiempo obtenemos una mayor cantidad de proteína GS-Tx1M1 y las bandas en un tiempo mayor no aumentan ni decrecen.

### 5.5 Segunda purificación por CAMQ

Para realizar la siguiente purificación se centrifuga la muestra a 500 G por 10 minutos, de esta forma se puede separar la trombina la cual vuelve a ser almacenada para su reuso. Se filtra la mezcla de reacción por un poro de 0.45  $\mu\text{m}$ , una vez filtrada se pasa nuevamente por una columna de afinidad metal quelato.

En esta purificación queda retenida en la columna, la fracción de proteína de fusión y la fracción de tiorredoxina-Histag-LVPR. La fracción de proteína GS-Tx1M1 no se retiene al no tener interacción con la columna de  $\text{Ni}^{2+}$ , la fracción retenida en la columna se eluye con imidazol 300mM.

La fracción que eluye se concentra en una columna Strata-C18T Phenomenex, esto se logra ya que la muestra tiene interacciones hidrofóbicas con la columna lo que permite retenerse y concentrarse, la primera fracción de muestra es desechada ya que en ella hay sales, como lo son el  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$ , Tris y proteínas que no se retuvieron en la columna  $\text{Ni}^{2+}$  y en la columna Strata-C18T. Para recuperar la fracción de proteína GS-Tx1M1 se eluye al pasar una fracción de ACN al 50%. La fracción es recolectada, congelada y liofilizada para su análisis y purificación en HPLC.

Se toman 15  $\mu\text{L}$  de cada parte de la purificación para su análisis en un gel de poliacrilamida SDS al 15%, figura 5.5;

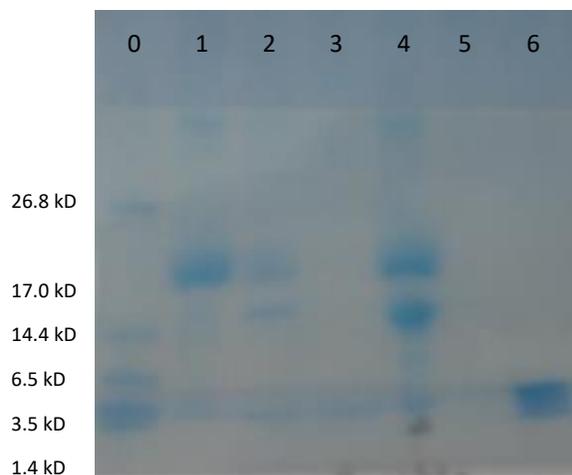


Figura 5.5 Gel de poliacrilamida al 15%. El carril 0 es el marcador de peso molecular, carril 1 es la muestra antes de corte, carril 2 es la muestra después de corte, carril 3 es la fracción que eluye después de pasar por la columna de Ni<sup>2+</sup>, carril 4 es la elución con 300 mM, carril 5 es la elución de la muestra después de pasar por Strata-C18T, carril 6 es la fracción eluida con 50% ACN.

En carril uno se puede observar la proteína de fusión inicial donde al transcurrir cuatro horas se observa la banda que corresponde al residuo de corte tiorredoxina-Histag-LVPR, la intensidad de la banda de la proteína de fusión disminuye, y se alcanza a distinguir una banda que corresponde a la proteína GS-Tx1M1. Para el carril tres se observa la retención de los residuos de corte y la proteína de fusión al no aparecer ninguna banda en la fracción eluida, en el carril cuatro se corrobora que los residuos de corte y la proteína de fusión son retenidos al eluir con 300mM de imidazol. Para el carril cinco se cargó en el gel muestra que corresponde a la fracción que eluye por Strata, no se observa ninguna banda que corresponda a GS-Tx1M1 lo cual corrobora la retención en la columna. Para el carril seis después de eluir la muestra y de liofilizarla se observan dos bandas intensas entre los pesos de

3.5 y 1.4 kD, están bandas corresponden a la proteína GS-Tx1M1 y alguna otra proteína que tenga un peso molecular semejante a GS-Tx1M1

#### 5.6 Purificación por Cromatografía de líquidos de Alta Eficiencia

En la última etapa de purificación, se fundamenta en interacciones hidrofóbicas que hay en la proteína con la fase estacionario de la columna. Se obtuvo un gradiente a 30 °C que permite purificar y recolectar las fracciones de cada pico eluido. Estas muestras son liofilizadas y caracterizadas en MALDI TOF.

Tabla 5. Gradiente usado para purificar la proteína GS-Tx1M1

<b>Gradiente</b>			
<b>Tiempo</b>	<b>Flujo</b>	<b>% ACN + 0.05</b>	<b>% H<sub>2</sub>O + 0.05</b>
<b>[min]</b>	<b>[mL/min]</b>	<b>TFA</b>	<b>TFA</b>
<b>0.00</b>	<b>1.0</b>	<b>10.0%</b>	<b>90.0%</b>
<b>5.00</b>	<b>1.0</b>	<b>10.0%</b>	<b>90.0%</b>
<b>20.00</b>	<b>1.0</b>	<b>30.0%</b>	<b>70.0%</b>
<b>25.00</b>	<b>1.0</b>	<b>10.0%</b>	<b>90.0%</b>
<b>30.00</b>	<b>1.0</b>	<b>10.0%</b>	<b>90.0%</b>

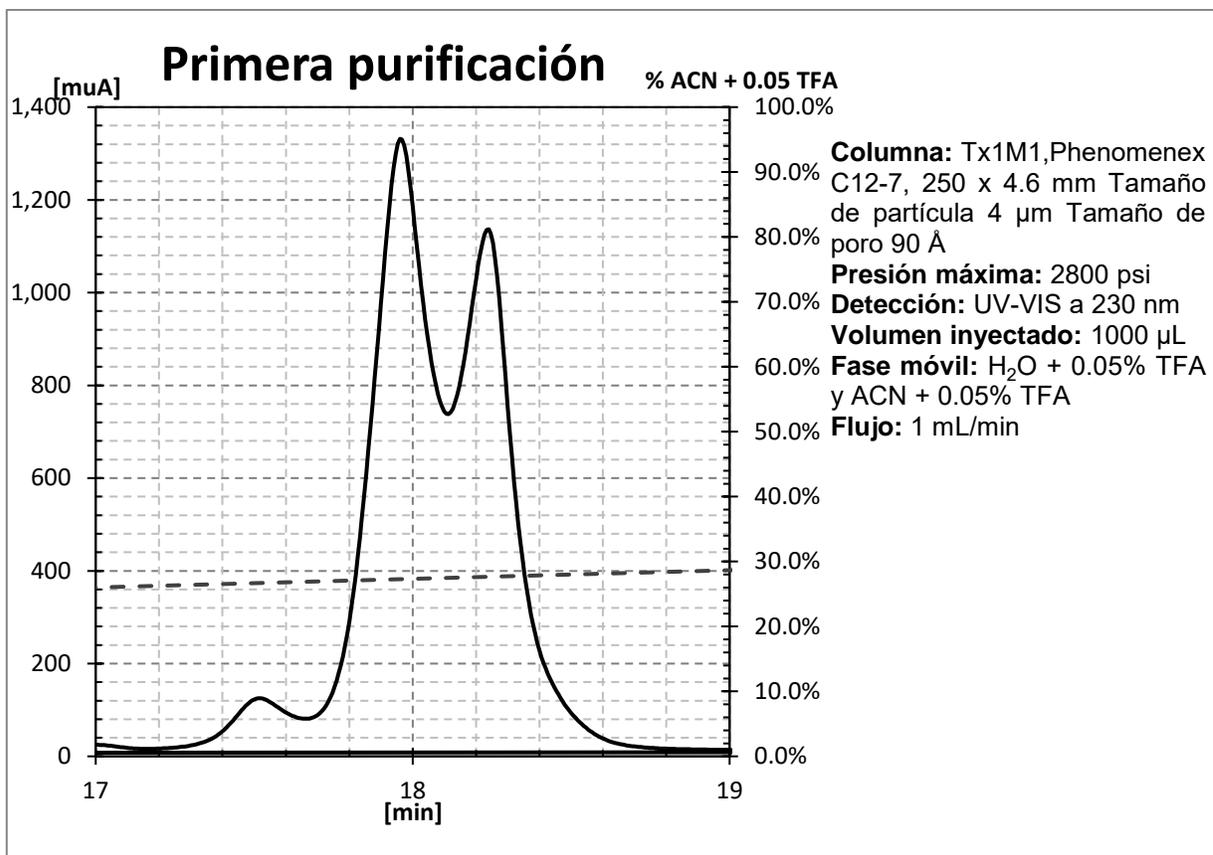


Figura 5.61.- Cromatograma en una primera purificación de la muestra. Los picos en los tiempos 17.96 y 18.21 fueron recolectados por separado, liofilizados, y resuspendidos en ACN al 10% en agua para una segunda purificación.

El cromatograma obtenido muestra dos picos los cuales eluyen en los minutos 17.96 y 18.21, estos picos tienen un patrón característico a las proteínas Tx1, Ts16 y Tx1M2, lo cual puede indicar que son isoformas que adquiere Tx1M1.

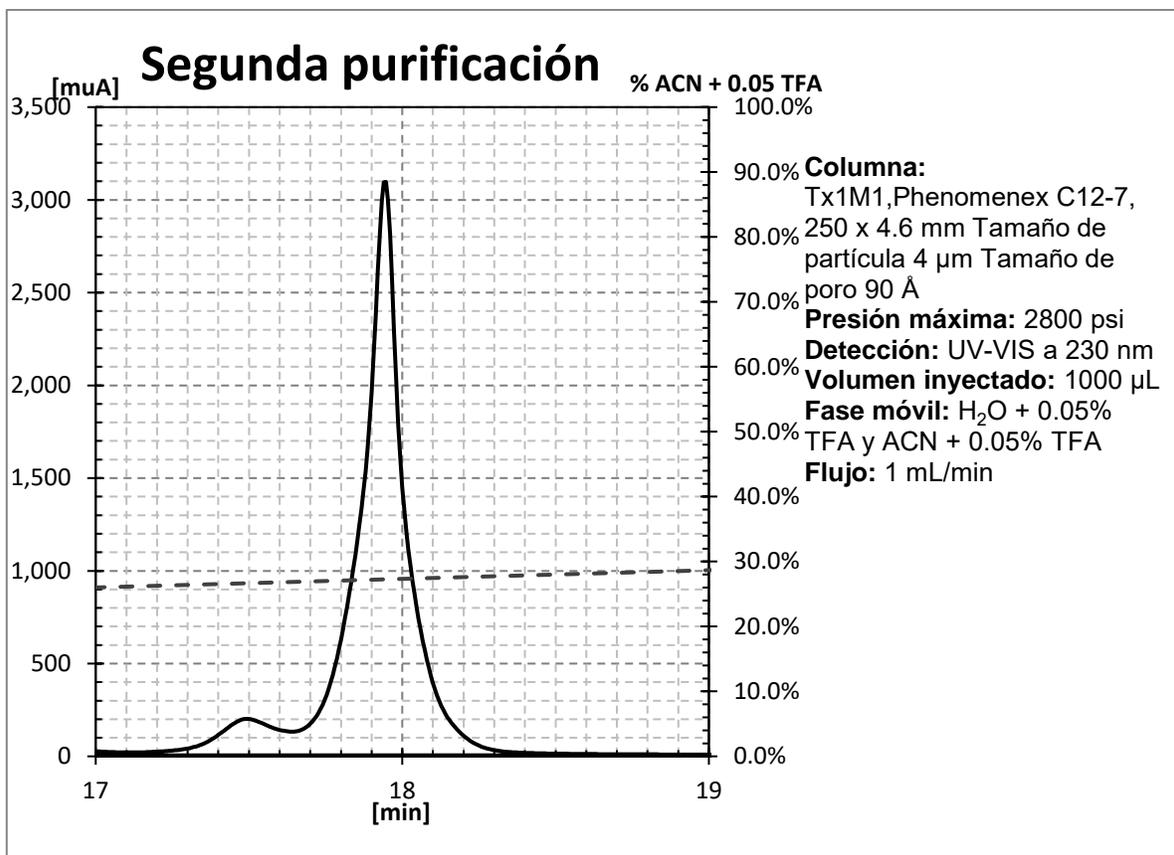


Figura 5.62.- Cromatograma de una segunda purificación, esta muestra es recolectada y liofilizada para su caracterización con MALDI-TOF y RMN.

### 5.7 MALDI-TOF

La fracción de muestra se prepara con  $\alpha$ -ciano 4 hidroxicinámico con una proporción diez veces mayor a la muestra, 1:10.

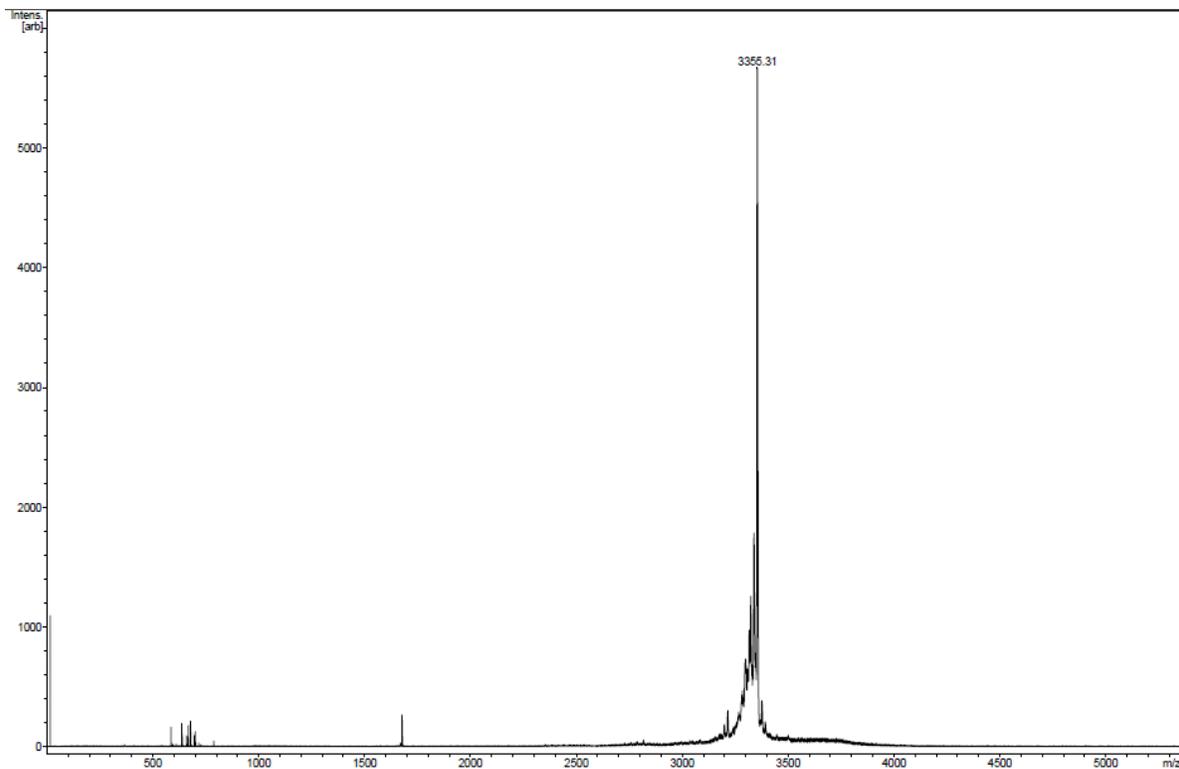


Figura 5.7.- Espectro de masa MALDI-TOF de la fracción eluída en el minuto 17.96.

La masa obtenida es de 3355 unidades de relación masa/carga la cual corresponde a la masa oxidada de la proteína GS-Tx1M1 con puentes disulfuro, para la fracción que eluye en el tiempo 18.21 también tiene una masa de 3355 unidades de relación masa/carga lo que corrobora la existencia de dos isoformas de la proteína GS-Tx1M1. Para el pico que eluye en el tiempo 17.96 se nombrará Tx1M1P1 y para el pico que eluye en el tiempo 18.21 se nombrará Tx1M1P2

## 5.8 Experimentos de RMN

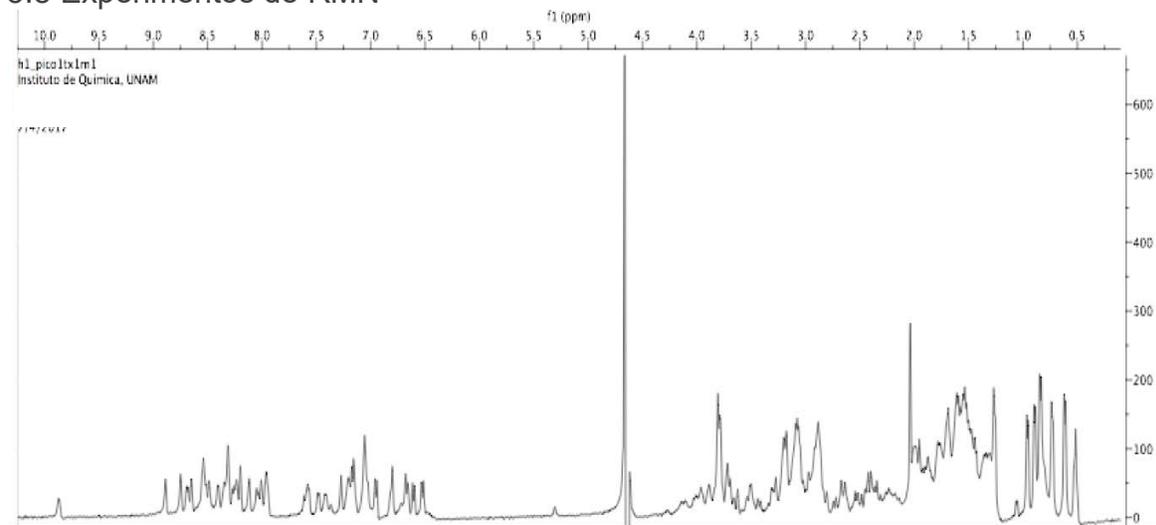


Figura 5.8 Espectro correspondiente a Tx1M1P1

En un espectro de protón se puede identificar una estructura plegada, ya que se observa una dispersión de señales entre 6.5 y 9.5 ppm correspondientes a los protones de amida, la presencia de puentes de hidrógeno en la estructura secundaria genera un entorno químico diferente, para el caso de Tx1M1P1 se observa una dispersión de señales entre 6 y 9 ppm además de observar la señal correspondiente a la Tirosina lo que indica que se encuentra plegada. Se observa el mismo patrón del espectro de <sup>1</sup>H de Tx1M1P1 con las toxinas Tx1M2 y Tx1, por lo que esta isoforma tiene el mismo plegamiento CS  $\alpha/\alpha$  y con la conectividad C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>

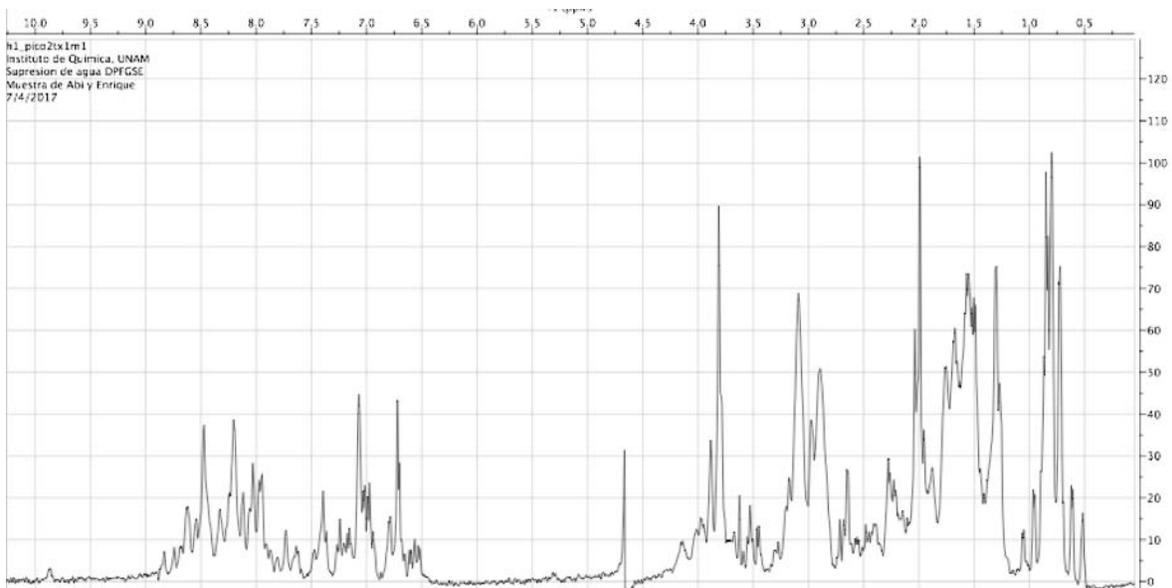


Figura 5.81 Espectro correspondiente a Tx1M1P2

En comparación con Tx1M1P1, la proteína Tx1M1P2 muestra señales traslapadas y no definidas en el intervalo de 6 y 9 ppm además de no observar de forma definida la señal de la cisteína en comparación con las proteínas Ts16 y Tx1 por lo tanto se puede asumir que no se encuentra plegada Tx1M1P2.



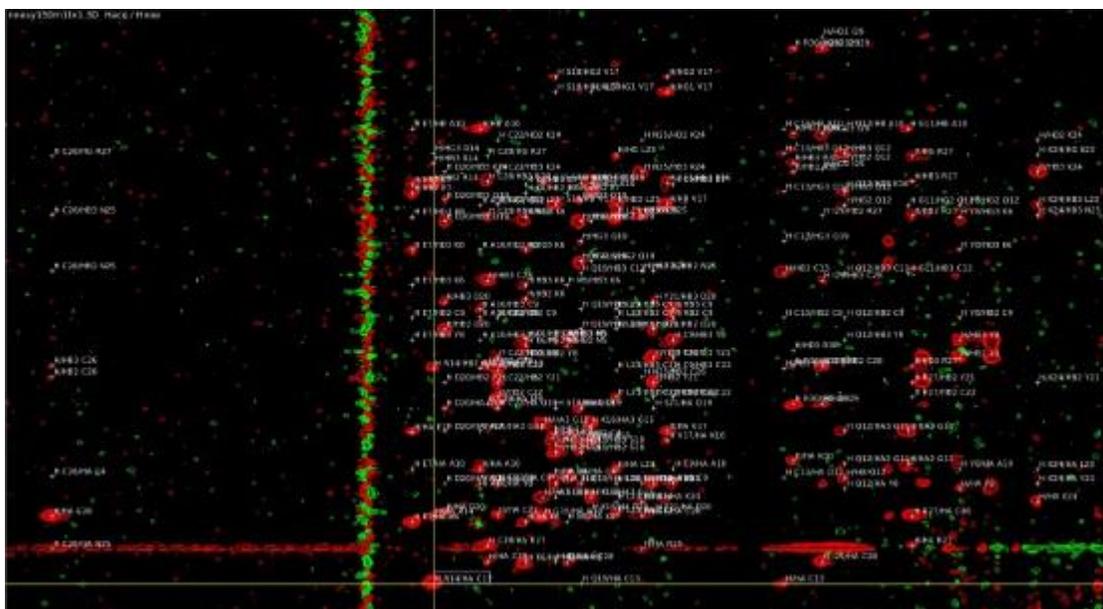


Figura 5.83 Espectro NOESY en un aparato Varian 500MHz. La supresión de agua es DPFGE.

Se asignan las señales NOE de los aminoácidos consecutivos, posteriormente se asignan las señales de NOE's correspondientes a las interacciones a largas distancias tomando como restricción que la distancia máxima es 5 Å. Para realizar estas asignaciones se utiliza el programa CARRA 1.8 y para obtener una estructura se utiliza el programa CYANA 2.0 imponiendo los puentes disulfuro no convencionales, es decir; C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> y C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. El programa CYANA realiza 7 ciclos de cálculos los cuales determinan 20 estructuras que presentan la menor energía y el menor número de violaciones de distancia.

## 1.1 Estructura tridimensional

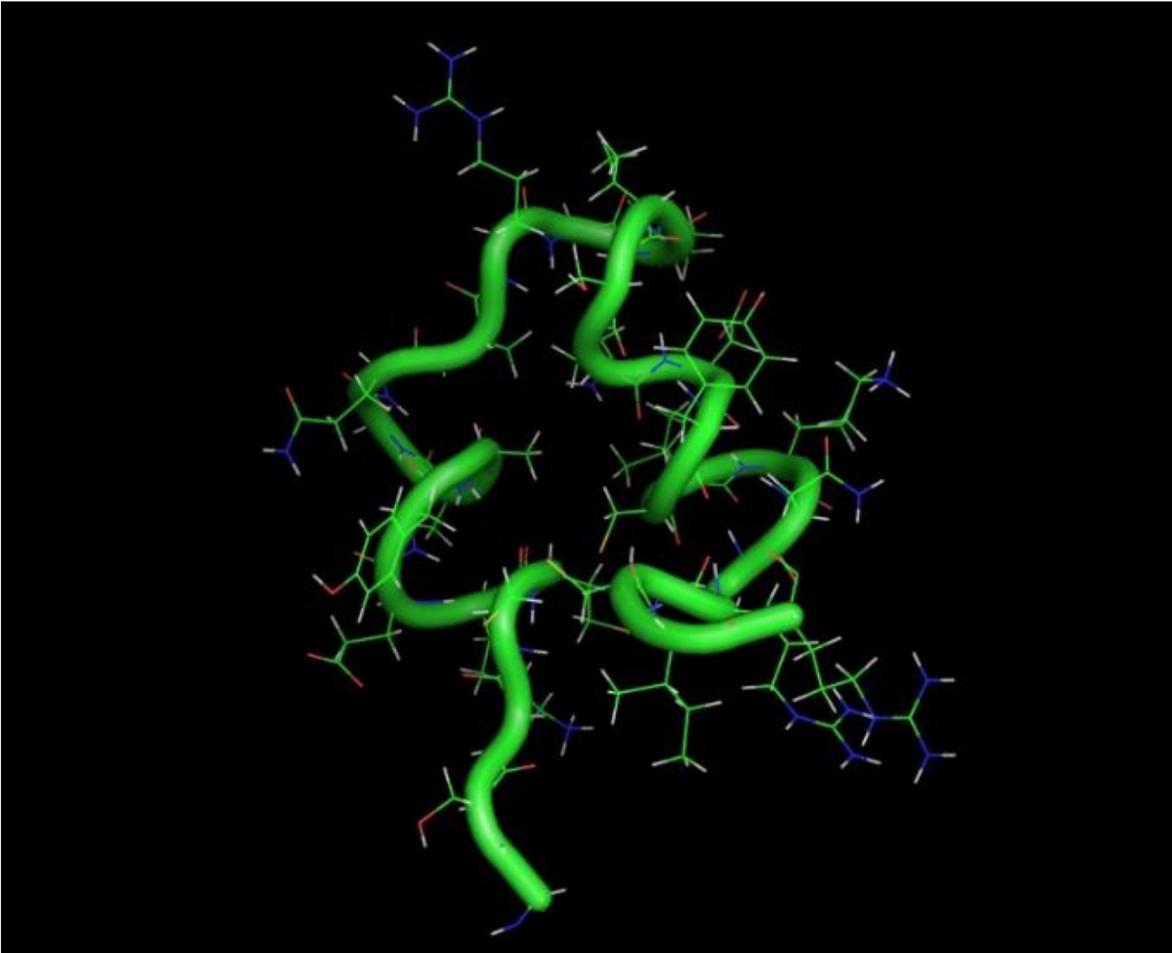


Figura 5.9.- Estructura obtenida a partir del cálculo en CYANA, presenta un RMSD de 0.53.

La figura 5.9 muestra dos hélices alfa, la segunda hélice no está definida en su primera vuelta de aminoácidos. Se compara la estructura obtenida con la Tx1, se observa que no están definidas las estructuras hélice a partir de los aminoácidos C<sub>9</sub> a Q<sub>12</sub> y K<sub>16</sub> a C<sub>22</sub>.

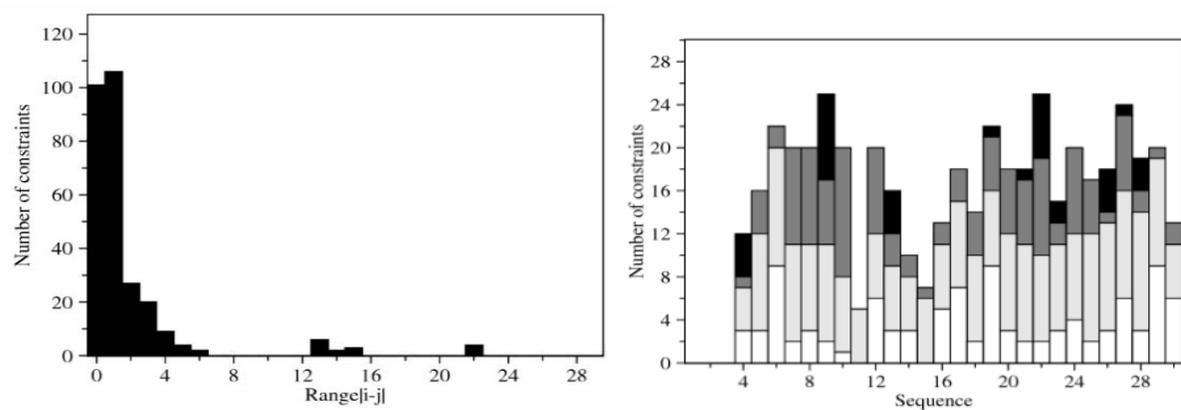


Figura 5.91. Gráficos de distribución de señales NOE en Tx1M1P1

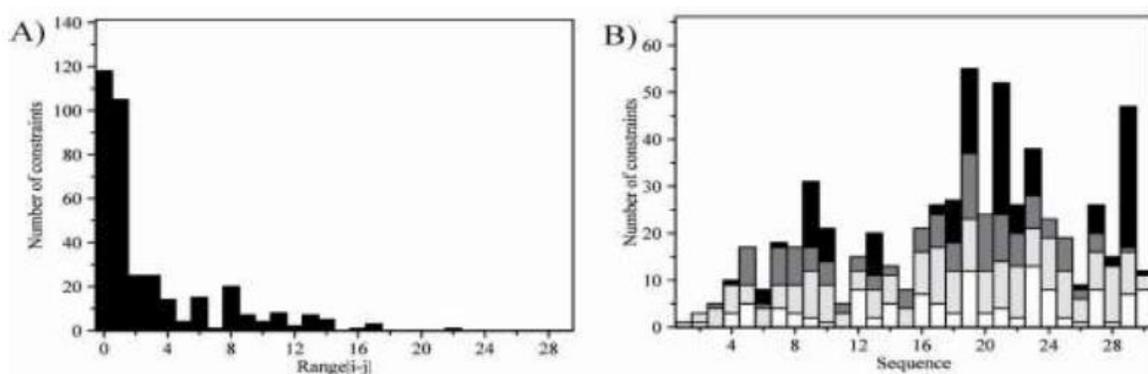


Figura 5.92. Gráficos de distribución de señales NOE en Tx1 (Imagen obtenida de la referencia 21).

Se comparan los datos del número de restricciones NOE entre dos residuos y la distribución de restricciones NOE intraresiduo (blanco), secuenciales (gris claro), de medio alcance (gris oscuro) y largo alcance (negro) con los datos de Tx1, en donde se observa que hace falta asignar más señales NOE para determinar la estructura tridimensional de Tx1M1P1, al asignar más NOEs permitirá definir la estructura secundaria de cada hélice.

## Capítulo 6

### Conclusión.

Se expresó, purificó, caracterizó y determinó la estructura de la toxina Tx1M1 la cual presenta dos isoformas; donde la isoforma Tx1M1P1 presenta el motivo estructural CS $\alpha$ / $\alpha$ . Con el patrón de elución encontrando en el cromatograma de HPLC y la masa obtenida se puede afirmar por homología que la toxina adquiere el plegamiento C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>. Lo que permite concluir que el motivo CS  $\alpha$ / $\alpha$  y se mantiene los enlaces disulfuro no convencionales, a partir de la mutación K<sub>6</sub>.

La modificación de aminoácidos en Tx1 no desestabiliza el motivo estructural y el enlace no convencional lo que corrobora que CS $\alpha$ / $\alpha$  se conserva.

## Capítulo 7

### Perspectivas

Debido a la poca cantidad de muestra (1.2 mg) utilizada en el experimento de RMN se optan dos soluciones:

Realizar más cortes con trombina esto permitirá obtener más proteína GS-Tx1M1 para adquirir una mayor cantidad de señales NOE en los experimentos, esto permitirá definir la estructura tridimensional.

Utilizar un equipo con un mayor campo magnético (700 MHz) que permitirá definir NOE en el espectro.

## Capítulo 8

### BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. O. Carmo, M. Chatzaki, C. C. R. Horta, B.F. Magalhaes, B.B.R. Oliveira - Mendes, C. Chávez Olortegui, E. Kalapothakis, Evolution of alternative methodologies of scorpion antivenoms production, *Toxicon* 97 (2015) 64 -74.
- [2] Benjamin CHAGOT, Cyril PIMENTEL, Li DAI, Joost PIL, Jan TYGAT, Terumi NAKAJIMA, Gerardo CORZO, Hervé DARBON and Giles FERRAT, An unusual fold for potassium channel blockers: NMR structure of three toxins from the scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*, *Biochem. J.* (2005) 388, 263 – 271.
- [3] Cabrera Peralta Andrea Anthar “Biosíntesis, purificación, caracterización y determinación estructural de la toxina M2Tx1 “Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 21 de agosto de 2012”.
- [4] David J. Craik, Norelle L. Daly, Clement Waine, The cystine knot motif in toxins and implications for drug design, *Toxico* 39 (2001) 43-60
- [5] De Roodt Adolfo R., R. Lago Néstor, D. Salomón Oscar, D. Laskowicz Rodrigo, Neder de Román Lilia E., A. López Raúl, E. Montero Teresa, Del V. Vega Valeria (2009) A new venomous scorpion responsable for severe envenomation in Argentina: *Tityus confluens*, *Toxicon* 53: 1-8.
- [6] Domingos Possani Lourival, El alacrán y su piquete, Universidad Nacional Autónoma de México.
- [7] Escobedo González Fátima Carolina, Expresión, purificación y caracterización por Resonancia Magnética Nuclear de la doble mutante Y20K, Q32Y de la defensina 1 del alacrán *Centruroides limpidus limpidus*.

- [8] Ferentz Ann E. and Wagner Gerhard,(2000) NMR spectroscopy: a multifaced approach to macromolecular structure, Quarterly Reviews of Biophysics 33: 29-65.
- [9] Fredy V. Coronas, Adolfo R. de Roodt, Timoteo Olamendi – Portugal, Ferdando Z. Zamudio, Cesar V.F. Batista, Froyln Gómez Lagunas, Lourival D. Possani , Disulide bridges and blockage of Shaker B K<sup>+</sup> - channels by another butantoxin peptide purified from the Argentinean scorpion Tityus trivitattus, Toxicon 41 (2003) 173-179
- [10] Flores Solís David, Estudio estructural por RMN de tipo escorpina y GS-Tt28. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- [11] Flores Solís David, Biosíntesis, purificación, caracterización y determinación estructural por RMN de la toxina de Alacrán Ts16, Tesis de Maestría, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, enero 2012.
- [12] James Keeler (2002), Undestanding NMR Spectroscopy, John Wiley and Sons Ed. West Sussex, England.
- [13] King Glenn F., Gentz Margaret C., Escoubas Pierre, Nicholson Graham M. (2008), A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals, Toxicon 52: 264-276.
- [14] Mathews Van Holde Ahern, Bioquímica, 3ra Edición.
- [15] Milles Christopher, The Charybdotoxin Family of K Channel- Bloking peptides, Review, Neuron, Vo. 5-10.
- [15] Nelson Lehninger David, Principios de bioquímica, 5ta Edición, Estados Unidos, 2009.

- [16] Novagen. 2011. pET System Manual Novagen 11<sup>th</sup> ad.
- [17] Oren Froy, Noam Zilberberg, Nor Chejanovsky, Jacop Anglister, Erwann Loret, Boaz Shaanan, Dalia Gordon and Michael Gurevitz, Scorpion neurotoxins: Structure/function relationships and application in agriculture, *Pest Manag Sci* 56:472- 474 (2000).
- [18] P. Gopalakrishnakone, *Scorpion Venoms*, Singapore, Springer Science Bussiness Media Dordrecht, 2015
- [19] Ramírez Cordero Belén Ernestina, Biosíntesis, estudio estructural y citotoxicidad de péptidos tipo toxinas de alacrán, Tesis de Maestría, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, agosto 2015.
- [20] Rodriguez de la Vega Ricardo C., D. Possani Lourival (2004), Current views on scorpion toxins specific for K channels, *Toxicon* 43: 865-875.
- [21] Saucedo Yáñez Alma Leticia, “Estudio estructural de toxinas bloqueadoras de canales de potasio”, Tesis de doctorado, programa de doctorado en ciencias biomédicas, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mayo 2012.
- [22] Saucedo Alma Leticia, Del Rio-Portilla Federico, Picco Cristiana, Estrada Gergina, Prestipino Gianfranco, Possani Lourival D., Delepierre Muriel, Corzo Gerardo (2012), Solution Structure of native and recombinant expressed toxin CsslI from venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*, and their effects on Nav 1.5 Sodium channels, *Biochimica et Biophysica Acta*, 478-487.

[23] Steve Peigneur, Yoko Yamaguchi, Hitomi Goto, Kellathur N. Srinivasan, Ponnampalam Gopalakrishnakone, Jan Tytgat, Kazuki Sato, Synthesis and Characterization of amino acid deletion analogs of k-hefutoxin 1, scorpion toxin on potassium channels, *Toxicon* 71(2013) 25-30.

[24] Soli Rima, Kaabi Belhassen, Barhoumi Mourad, El Ayeb Mohamed and Srairi-Abid Najet (2009), Bioinformatic characterizations and prediction of K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> ion channels effector toxins.

[25] Tytgat Jan, Chandy K. George, García María L., Gutman George A., France-Marie, Eauclaire-Marton, Van der Walt Jurg J., D. Lourival Lourival (1999) A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms, *Trend in Pharmacological Sciences*. Vol. 20, 444-447.

[26] Wuthrich Kurt, (2003) NMR studies of structure and function of biological macromolecules (Nobel lecture) *Journal of Biomolecular NMR* 27: 13-39.

[27] Yousra Abdel Mottaleb, Fredy V. Coronas, Adolfo R. de Roodt, Lourival D. Possani, Jan Tytgat, A novel toxin from the venom of the scorpion *Tityus trivittatus*, is the first member of a new  $\alpha$  KTX subfamily, *FEBS Letters* 580 (2006) 592-596

