



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Biosíntesis, purificación, y caracterización de la toxina del alacrán *Tityus costatus*: TcoKIK.

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. ANDREA ESTEFANÍA LÓPEZ GIRALDO

TUTOR: DR. JOSÉ FEDERICO DEL RÍO PORTILLA
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, DICIEMBRE DE 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**BIOSÍNTESIS, PURIFICACIÓN, Y CARACTERIZACIÓN DE LA TOXINA
DEL ALACRÁN *Tityus costatus*: TcoKIK**

**TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. ANDREA ESTEFANÍA LÓPEZ GIRALDO



Ciudad de México, 2017.

Agradecimientos

Primero que todo agradezco inmensamente al Dr. Federico del Río por guiarme y apoyarme incondicionalmente en este proceso tan importante de mi formación tanto académica como humana.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Química por acogerme como un miembro importante de esta comunidad universitaria.

Agradezco el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del programa de becas para estudios de posgrado (becario N° 516493642), así como también al proyecto PAPIIT IN207516.

Agradezco a mis compañeros y amigos del laboratorio los cuales realizaron valiosos aportes tanto a mi proyecto como a mi vida, así como también agradezco a mi familia por estar presente en cada decisión que tomo y cada paso que doy con su amor incondicional.

Agradezco a la Dra. Patricia cano, al Dr. David Flores Solís y a mis compañeros del departamento de Biomacromoléculas porque con su experiencia profesional realizaron grandes aportes a mi proyecto.

A cada uno de los sinodales mi más sincero agradecimiento por el tiempo y esfuerzo invertido durante la revisión de este trabajo: Dra. Adela Rodríguez, Dr. Gerardo Corzo Burguete, Dr. Roberto Alejandro Arreguín, Dr. Rogelio Pereda Miranda, Dra. Nuria Esturau Escofet.

Este proyecto fue desarrollado en el laboratorio de biomacromoléculas 1, en el Instituto de Química.

Dedicatorias

A mi madre Patricia Giraldo y a mi padre David López

TABLA DE CONTENIDO

1 RESUMEN.....	10
2 ANTECEDENTES	12
2.1 Los alacranes y la especie <i>Tityus costatus</i>	12
2.2 Toxinas bloqueadoras de canales de potasio (β -Ktx)	13
2.3 La toxina TcoKIK del alacrán <i>Tityus costatus</i>	14
2.4 Canales iónicos	15
3 Marco teórico.....	17
3.1 Proteínas.....	17
3.2 Producción de proteínas recombinantes	20
3.3 Purificación de proteínas recombinantes	20
3.4 Caracterización de proteínas.....	23
4 HIPÓTESIS.....	28
5 OBJETIVOS.....	29
5.1 Objetivo general	29
5.2 Objetivos específicos.....	29
6 DISEÑO EXPERIMENTAL	30
Diseño del gen TcoKIK-pET32a	30
Purificación	32
Caracterización	34
7 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	37
Expresión en <i>Escherichia coli</i>	37
Purificación	38
Caracterización	45
8 CONCLUSIONES.....	58
9 BIBLIOGRAFÍA.....	60
APÉNDICE	63

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Abreviatura	Significado
ADN	Ácido Desoxirribo Nucleico
ARN	Ácido RiboNucleico
BL	amortiguador de Lisis
¹³ C	Carbono trece
CAMQ	Cromatografía de Afinidad Metal Quelato
COSY	COrrrelated SpectroscopY
CSI	Chemical Shift Index
CS- α/β	Cysteine Stabilized alpha-beta motif
DC	Dicroísmo circular
DPFGE	Double Pulsed Field Gradient Spin Echo
EM	Espectrometría de masas
¹ H	Hidrógeno
H α	Protón alfa de un aminoácido.
H β	Protón beta en la cadena lateral de un aminoácido.
H ^N	Protón de amida en la cadena principal de un aminoácido.
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
KT _x	Toxina bloqueadora de canales iónicos de potasio.
LB	Luria Bertani

Abreviatura**Significado**

MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time Of Flight
MHz	MegaHertz
nOe	nuclear Overhauser effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
¹⁵ N	Nitrógeno quince
ppm	partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMSD	Root Mean Square Deviation
TFA	TriFluoroacetic Acid
TOCSY	TOTAL Correlated Spectroscopy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Secuencia de aminoácidos de la proteína TcoKIK.	14
Figura 2. Modelo completo de unión de TstKMK con un canal de potasio Kv-1.2 de ratas.....	15
Figura 3. Alineamiento múltiple de la TcoKIK con toxinas representativas de la subfamilia “BmTXKB”.	15
Figura 4. Formación de un enlace peptídico por condensación.....	17
Figura 5. Formación de un puente disulfuro, a través de la oxidación de las cisteínas.....	18
Figura 6. Representación del gráfico de Ramachandran	19
Figura 7. Representación de los niveles estructurales de las proteínas.....	19
Figura 8. Se observa un enlace coordinado entre un ion metálico unido covalentemente a un agente quelante, con una proteína etiquetada con histidinas.	22
Figura 9. Representación esquemática de RP-HPLC.	23
Figura 10. Diagrama del procedimiento para la determinación de estructuras de proteínas	26
Figura 11. Diagrama de flujo para la obtención y caracterización de la TcoKIK.....	30
Figura 12. Representación de la proteína de fusión.	31
Figura 13. Representación de la proteína de fusión de la TcoKIK. Se resalta el sitio de corte con enteroquinas.....	33
Figura 14. Cinética de expresión de la proteína de fusión en las cepas E. coli Rosetta gami™ y E. coli Rosetta™.....	37
Figura 15. Purificación de la proteína de fusión.....	39
Figura 16. Monitoreo del corte enzimático de la proteína de fusión	40
Figura 17. Monitoreo del corte enzimático de la proteína de fusión	41
Figura 18. Monitoreo del corte enzimático de la proteína de fusión	41
Figura 19. Cinética de corte con tritón.....	43
Figura 20. Cromatograma de la purificación de TcoKIK.	44
Figura 21. Espectro de masas MALDI-TOF del pico 1 purificado por HPLC.....	45
Figura 22. Espectro de DC de la TcoKIK.	47
Figura 23. Espectro ¹ H de la TcoKIK.	49

Figura 24. Espectro TOCSY de la TcoKIK.	50
Figura 25. Ampliación del sistema de espín del aspartato 39 presente en la secuencia de aminoácidos de la TcoKIK.	51
Figura 26. Espectro NOESY de la TcoKIK.	52
Figura 27. Gráfico de Ramachandran de las 20 estructuras calculadas en CYANA.	53
Figura 28. Estructura tridimensional obtenida para la proteína recombinante TcoKIK.	54
Figura 29. Asignación de las señales NOE en función de la secuencia de aminoácidos.	55
Figura 30. Diagrama representativo de los elementos de estructura secundaria esperados de acuerdo al método CSI para la TcoKIK.	57

1 RESUMEN

Los venenos de alacrán son una mezcla de proteínas de bajo peso molecular, neurotoxinas, nucleótidos, aminoácidos, oligopéptidos, cardipotoxinas, fosfinas hemolíticas, fosfodiesterasas, proteínas inhibitorias de algunas enzimas, entre otros. Además, es posible encontrar en el veneno de una sola especie de alacrán distintos tipos de toxinas, lo cual los hace capaces de producir en muchos casos potentes efectos sinérgicos en las víctimas. Estas toxinas han despertado un gran interés en el ámbito científico principalmente por su alta actividad y selectividad bloqueando canales iónicos humanos. Entender la forma en que estas toxinas interaccionan con los canales iónicos podría ayudar a diseñar péptidos más activos y selectivos ¹.

Tityus costatus es un alacrán de la región de la *mata atlántica o bosque atlántico* de Brasil, incluyendo el área de la ciudad de San Pablo, donde muchos accidentes humanos han sido reportados requiriendo atención médica; sin embargo, no existe mucha información acerca de los péptidos presentes en este veneno ². El hecho de que esta clase de péptidos presente una distribución filogenéticamente extensa sugiere que deben cumplir un importante papel funcional pero aun no completamente definido ³.

La identificación de nuevas toxinas activas sobre canales iónicos, de alguna manera, ha abierto el camino a nuevas investigaciones y ha facilitado el estudio de diversos aspectos bioquímicos: 1) La purificación de canales en células nativas, 2) La determinación de subunidades de canales iónicos, 3) La elucidación de la estructura molecular de canales de K⁺, y 4) El estudio del papel funcional que los canales de K⁺ desempeñan en células blanco ⁴. Por lo que uno de los mayores progresos en esta área es el resultado del descubrimiento de inhibidores peptídicos con alta afinidad sobre los canales de K⁺ en venenos de diferentes animales.

Debido a que la subfamilia β KTx ha sido poco caracterizada, a pesar de que es muy representativa en algunos venenos de alacrán ⁵, se seleccionó estudiar la TcoKIK, con el fin de obtener mayor información acerca de la relación que existe entre su

estructura tridimensional y la función biológica de esta subfamilia de proteínas. En este trabajo se presenta la obtención, purificación y caracterización por espectrometría de masas MALDI-TOF, resonancia magnética nuclear y espectroscopía de dicroísmo circular de la proteína recombinante TcoKIK. Los resultados obtenidos evidencian la existencia de una estructura terciaria, además de algunos elementos de estructura secundaria como son hélices α y hojas β .

2 ANTECEDENTES

2.1 Los alacranes y la especie *Tityus costatus*

Los alacranes son uno de los más antiguos grupos de animales terrestres, los cuales han mantenido una morfología estable por más de 400 millones de años de evolución. El veneno de estos organismos está compuesto por una mezcla compleja de sustancias, entre ellas: sales inorgánicas, aminoácidos libres, componentes heterocíclicos, neurotoxinas, nucleótidos, oligopéptidos, cardipotoxinas, fosfinas hemolíticas, fosfodiesterasas, péptidos y proteínas, principalmente enzimas, las cuales utilizan como defensa y para la captura de sus presas. Los componentes mejor caracterizados son péptidos que modifican la permeabilidad de canales iónicos de células excitables y no excitables ⁶.

Las picaduras de alacrán son un problema de salud pública en ciertos países, en donde se producen más de un millón de accidentes en humanos anualmente ⁷. Las especies más importantes causantes de accidentes son alacranes de los géneros: *Androctonus*, *Buthus* y *Leiurus* en África del Norte y en el Medio Este, *Centruroides* y *Tityus*, en el continente Americano, *Mesobuthus* en Asia y *Parabuthus* en África del Sur ⁸.

La toxina TcoKIK pertenece a la especie *Tityus costatus*, la cual es típica del bosque atlántico de Brasil; se encuentra distribuida desde el Estado de *Rio de Janeiro* hasta *Rio Grande do Sul*. En 1879, F. Karsch describe las especies utilizando especímenes colectados en Rio de Janeiro ⁹. Los adultos tienen entre 5 y 7 cm de longitud, color café amarillento con manchas en las patas y en los pedipalpos. Tienen una espina subaculear en el telson, muestran tres rayas longitudinales en la cara dorsal del mesosoma y se pueden encontrar en dos isoformas diferentes. Una muestra un cuerpo más claro del fondo con tres rayas oscuras, encontrados generalmente a nivel del mar; mientras que la isoforma maculosa tiene un cuerpo más oscuro y las rayas no están bien definidas pero convergentes ².

2.2 Toxinas bloqueadoras de canales de potasio (β -Ktx)

Los péptidos moduladores de canales iónicos han sido clasificados en diferentes familias, estas familias se clasifican con base en diferentes criterios tales como el tamaño de los péptidos, su aparición cronológica, toxicidad en humanos, o especificidad sobre canales iónicos. Basados en el último criterio, a su vez estos péptidos se pueden dividir en 4 familias. La familia 1 que contiene péptidos de entre 60-70 aminoácidos estabilizados por 4 puentes disulfuro que modulan la actividad de canales de Na^+ , la familia 2 que comprende péptidos de cadena corta y cadena larga (entre 30-40 y 60-64 aminoácidos, respectivamente) con 3 ó 4 enlaces disulfuro que bloquean canales de K^+ , la familia 3 contiene péptidos de cadena corta como insectotoxinas de aproximadamente 36 aminoácidos con 4 puentes disulfuro que inhiben canales de Cl^- y, por último, la familia 4 incluye péptidos que modulan canales de Ca^{2+} sensibles a rianodina ^{4,10}.

Para nuestro interés los péptidos pertenecientes a la familia 2 (Bloqueadores de canales de potasio) se encuentran divididos en las subfamilias α -KTx, β -KTx, γ -KTx, y κ -KTx basados en su similaridad estructural ⁴. Las escorpinas y toxinas específicas sobre canales de potasio de la familia beta (β -Ktx) continen 6 cisteínas formando 3 puentes disulfuro, y presentan dos dominios estructurales: una hélice α en el N-terminal y un C-terminal rico en cisteínas con el motivo Cs- α/β . Para el cual el dominio lineal se parece a péptidos antimicrobiales catiónicos, mientras que el dominio del motivo Cs- α/β se parece más a algunas defensinas de otros invertebrados, que a las toxinas de alacrán típicas ¹¹³.

A su vez esta familia β -Ktx, basada en la secuencia de aminoácidos, se clasifica en 3 diferentes grupos ³. La clase 1 contiene TsTXK β (Tst β KTx), AaTXK β , BmTXK β 2, Tdi β KTx, y Tco β KTx ^{4,12}, de las cuales sólo la TsTXK β (Tst β KTx) se ha caracterizado como un bloqueador de canales Kv ¹³. La clase 2 consiste de BmTXK β , Hge β KTx, TcoKIK, TdiKIK y TtrKIK. La proteína BmTXK β obtenida de manera recombinante es un bloqueador de canales de potasio en miocitos auriculares de conejo, es un rápido inactivante y está asociado con canales heteromultiméricos con subunidades Kv4.2 y Kv4.3 ¹⁴. La toxina Hge β KTx exhibe efectos citolíticos fuertes hacia diferentes organismos blanco, incluyendo bacterias

(*Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*), eritrocitos humanos y ovocitos de rana. Por último, la clase 3 incluye algunos péptidos tipo escorpina (e.g. escorpina, opiscorpina1–4, HgeScplp1, HgeScplp2, y heteroscorpina1) ¹⁵¹¹¹⁶.

Las secuencias de nucleótidos encontradas muestran que todos los genes de las especies *Tityus*, tienen una organización similar, la cual incluye un péptido señal largo de 19-25 residuos, seguido por una prosequencia corta de 8-19 residuos y la secuencia madura de 47 ó 60 residuos de aminoácidos.(1)

2.3 La toxina TcoKIK del alacrán *Tityus costatus*

La toxina TcoKIK fue aislada del veneno del alacrán *Tityus costatus*. La TcoKIK se compone de 47 aminoácidos como se muestra en la figura 5. Estudios realizados en 2007 por E. García ³ muestran alguna semejanza entre ésta y la familia β KTx. La TcoKIK fue clasificada en la subfamilia 2 de la familia beta (β -Ktx), debido a que la secuencia se alinea bastante bien con la secuencia de la BmTXK β ³ aislada del veneno del alacrán Chino *Buthus martensii* Kasch (BmK) (posición 3-23) (figura 1), lo cual sugiere que son secuencias homólogas producidas por auténticos genes ortólogos ³.

```

1       5       10      15      20      25      30
K I K S G W E R L T S E S E Y A C P A I D K F C E D H C A A K K A
  35      40      45
V G K C D D F K C N C I K L

```

Figura 1. Secuencia de aminoácidos de la proteína TcoKIK.

Por otro lado, estudios recientes clasifican al péptido TstKMK en la subfamilia "BmTXK β " de la familia beta (β -Ktx), presentando un alto porcentaje de similitud con la TcoKIK (figura 3). D. Almeida en el año 2013 ⁵ obtuvo la estructura tridimensional de la TstKMK mediante modelado computacional el cual fue afinado por dinámica molecular. Dicha estructura mostró un motivo estructural CS- α/β (figura 6) ⁵.

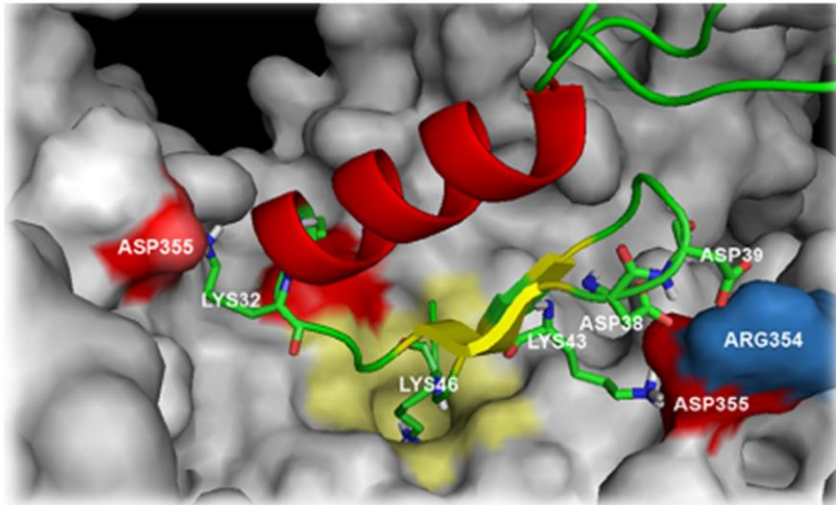


Figura 2. Modelo completo de unión de TstKMK con un canal de potasio Kv-1.2 de ratas. El N-terminal se presenta como estructura aleatoria en color verde. Toxina perteneciente a la familia β mTXKB⁵.

Recientemente, se caracterizó la Ts19 Frag-II¹⁷, perteneciente a la subfamilia 2 de la familia beta (β -Ktx) la cual exhibe un efecto bloqueador específico sobre canales Kv1.2 y ningún efecto sobre canales Nav¹⁷. La Ts19 Frag-II presenta un alto porcentaje de identidad con la TcoKIK como se muestra en la figura 3.

Toxina	Secuencia	TcoKIK ID (%)
TcoKIK	sp Q0GY42 1-47 -----KIKSGWERLTSESEYACPAIDKFCEDHCAAKKAVGKCDDDFKNCIKL--	100
TstKMK	sp P0C8W4 43-91 -----KDKMKAGWERLTSOSEYACPAIDKFCEDHCAAKKAVGKCDDDFKCKCIKL--	91,49
BmTXKB	sp Q9NJC6 30-90 KNIKEKLTEVKDKMKHSWNKLTSMSEYACPVIEKWCEDHCAAKKAIGKCEDTECKLKLRLK	68,09
Ts19 Frag. II	sp P86822 43-91 -----KDKMKAGWERLTSQSEYACPAIDKFCEDHCAAKKAVGKCDDDFKNCIKL--	93,62
cons	*:* :*:*** ***** *:*.*****.***:* :*:***	

Figura 3. Alineamiento múltiple de la TcoKIK con toxinas representativas de la subfamilia "BmTXKB". El alineamiento fue obtenido en el servidor T-COFFEE¹⁸.

Con base en el alto porcentaje de identidad que presenta la TcoKIK con las toxinas TstKMK y Ts19 Frag-II se esperaría una actividad bloqueadora sobre canales de potasio y un motivo estructural CS- α/β .

2.4 Canales Iónicos

El transporte de iones a través de los poros de las membranas es de vital importancia para las células biológicas. En organismos vivos, el transporte es

facilitado por estos canales que utilizan el flujo iónico para cumplir diversas funciones biológicas ¹⁹.

Los canales de potasio son un grupo diverso de proteínas integrales de membrana, pueden encontrarse en numerosos tipos de células musculares, neuronales, pancreáticas, linfocíticas y adiposas ²⁰. Los canales iónicos se encuentran involucrados en el mantenimiento del potencial de membranas en reposo, control de la excitabilidad cardíaca y neuronal, liberación de neurotransmisores, contractibilidad muscular y secreción hormonal, excitabilidad celular, liberación de neurotransmisores y activación de linfocitos ⁵⁴²¹.

Las toxinas de alacrán debido a su alta selectividad sobre canales iónicos de K⁺ se han convertido en una herramienta valiosa a la hora de evaluar la función de un canal específico de K⁺ en la célula, permitiendo que fuera posible a hoy en día diferentes avances como: la purificación de canales en células nativas, la determinación de subunidades de canales iónicos, la elucidación de la estructura molecular de canales de K⁺, y el estudio de la función de los canales de K⁺ en células blanco, principalmente células con cáncer ⁴.

3 Marco teórico

3.1 Proteínas

Las proteínas y péptidos son polímeros de α -aminoácidos, unidos por la formación de amidas entre el grupo α -carbonilo de un aminoácido y el grupo α -amino del siguiente aminoácido. El enlace peptídico se forma mediante una deshidratación de los aminoácidos como se muestra en la figura 4 ²². La donación del electrón del nitrógeno de amida al oxígeno del carbonilo produce un alto carácter de doble enlace al enlace peptídico.

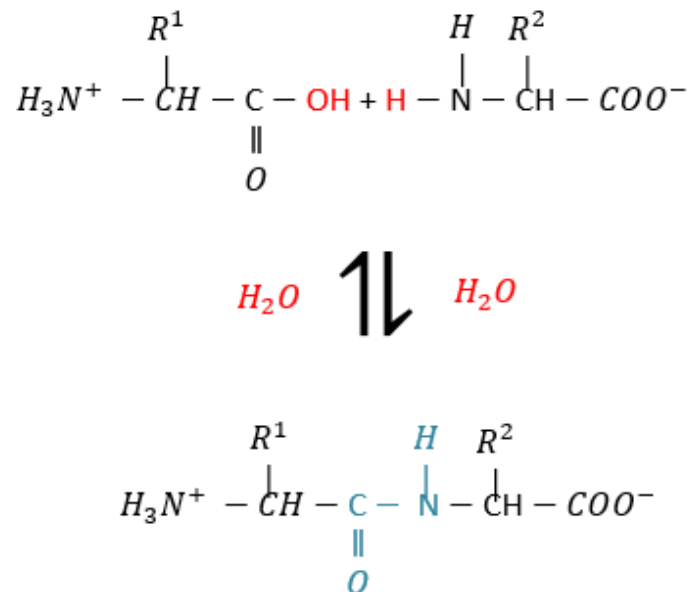


Figura 4. Formación de un enlace peptídico por condensación. El enlace peptídico se destaca en color azul.

Existen diferentes interacciones intramoleculares que le confieren estabilidad a las proteínas, incluyendo fuerzas de Van Der Waals, interacciones hidrofóbicas, interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno. Los puentes de hidrógeno son particularmente importantes para las proteínas, debido a que le confieren

direccionalidad y especificidad a las interacciones intramoleculares, estas interacciones, proveen la organización para diferentes plegamientos y la selectividad en interacciones proteína-ligando que permiten el reconocimiento molecular ²². Uno de los enlaces más importantes presentes, principalmente, en péptidos son los puentes disulfuro, los cuales son enlaces covalentes formados entre los átomos de azufre de los residuos cisteína a través de la oxidación, como se muestra en la figura 5. Estos puentes pueden ser intramoleculares o intermoleculares.

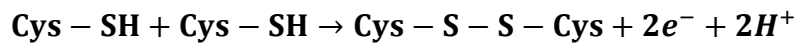


Figura 5. Formación de un puente disulfuro a través de la oxidación de las cisteínas.

Las proteínas se pueden definir en 4 diferentes niveles estructurales los cuales son:

La estructura primaria; en la cual encontramos una descripción principalmente de los enlaces peptídicos y puentes disulfuro que unen los aminoácidos de la cadena polipeptídica, por lo tanto, la estructura primaria se describe básicamente por la secuencia de los residuos de aminoácidos. Cada proteína tiene una secuencia de aminoácidos única, lo cual sugiere que hay una relación significativa entre la secuencia y la función biológica y proveen una información inestimable acerca de la evolución de la vida en la tierra.

Por otro lado, la **estructura secundaria** se refiere a cualquier segmento específico de una cadena polipeptídica, la conformación hélice α , la conformación hoja β y los giros β son algunos ejemplos muy estables y se encuentran ampliamente distribuidos en las proteínas. Es importante mencionar que todas las estructuras secundarias pueden describirse mediante los ángulos diedros ϕ y ψ asociados con cada residuo, como se muestra en el gráfico de Ramachandran en la figura 6, el cual nos brinda información relevante de la estructura secundaria de las proteínas ²³.

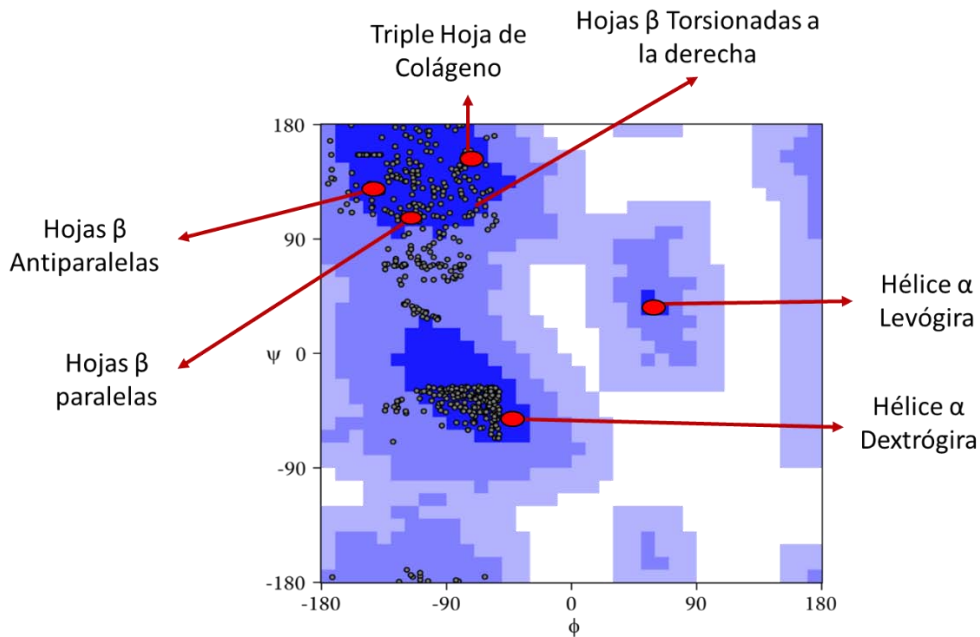


Figura 6. Representación del gráfico de Ramachandran, el cual permite obtener una aproximación acerca de la estructura secundaria de las proteínas.

La **estructura terciaria** es la disposición tridimensional global de todos los átomos de una proteína, donde los segmentos que interaccionan dentro de la cadena polipeptídica se mantienen en su posición característica terciaria principalmente por diferentes tipos de interacciones débiles entre los segmentos. Finalmente, la **estructura cuaternaria** se forma cuando existen dos o más subunidades proteicas en complejos tridimensionales [8]. Los diferentes niveles estructurales se ilustran en la figura 7.

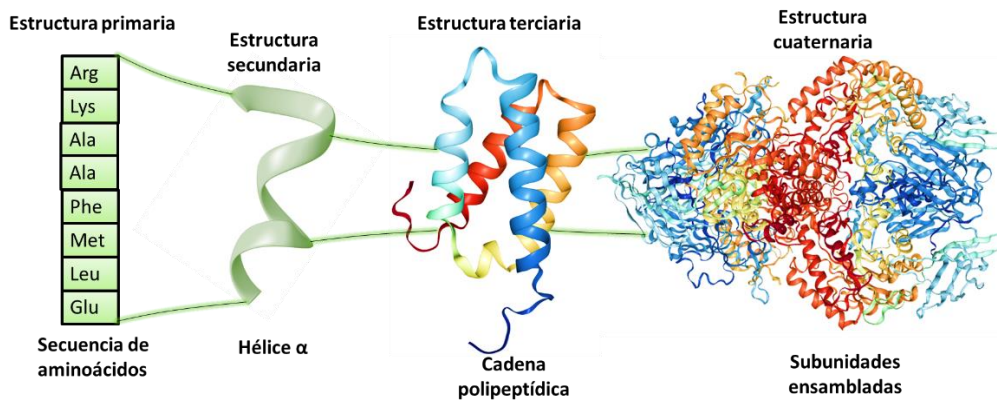


Figura 7. Representación de los niveles estructurales de las proteínas.

3.2 Producción de proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes se obtienen a partir de genes clonados. En la actualidad existen diferentes sistemas de expresión para producir proteínas recombinantes, los cuales emplean hospederos que pueden ser desde bacterias hasta células en cultivos de mamíferos o insectos. La bacteria más empleada para estos fines es *Escherichia coli*.

Escherichia coli es un organismo unicelular cuya reproducción es asexual, su simplicidad y el conocimiento de su fisiología y genética hacen que se facilite la expresión y bajen los costos de producción, debido a las estrategias simples para crecer y mantener el microorganismo. El corto tiempo de reproducción de *E. coli* permite su duplicación en menos de media hora ²⁴.

Para expresar un gen foráneo en un huésped se requieren tres pasos básicos:

1. Inserción del gen en el vector de expresión específico del hospedero.
2. Introducción del vector de expresión en el genoma del huésped.
3. Análisis de la capacidad de expresión de las cepas transformadas, donde influye principalmente el vector de expresión seleccionado.

3.3 Purificación de proteínas recombinantes

Existen diversos métodos de separación de proteínas recombinantes, los cuales se basan en diferentes propiedades como carga, tamaño y afinidad. Con base en esto, se han desarrollado diferentes técnicas para la purificación de proteínas: precipitación diferencial, filtración en membrana, filtración en gel, intercambio iónico, cromatografía de interacciones hidrofóbicas y cromatografía de afinidad.

3.3.1 Lisis celular

Mediante la lisis celular se rompen partes de la pared celular o la célula completa con el fin de liberar ciertas moléculas biológicas. Este contenido celular denominado lisado, está compuesto de proteínas, ADN, ARN, etc. Si consideramos

que se busca estudiar alguna proteína sobreexpresada en la célula, es importante que al destruir la protección de la membrana celular se evite la inactivación, desnaturalización y degradación de las proteínas extraídas por un medio no fisiológico (modificación del valor del pH).

Existen diferentes métodos para la lisis celular; métodos mecánicos y métodos químicos, los cuales incluyen el uso de detergentes o disolventes y la aplicación de alta presión mediante el uso de una prensa francesa. La desventaja de estos métodos es la dificultad para el control y ajuste de los parámetros del proceso.

La sonicación es una herramienta muy eficiente y fiable para la desintegración celular que permite un control completo sobre los parámetros del proceso. Mediante la aplicación de ondas ultrasónicas se genera cavitación rompiendo las paredes celulares y facilitando la liberación de los componentes del citoplasma, esto asegura una alta selectividad en la liberación de materiales y en la pureza del producto ²⁵.

3.3.2 Cromatografía de afinidad de metales inmovilizados

Un método de purificación eficiente para proteínas es la cromatografía de afinidad, donde generalmente se implementan etiquetas con cierta afinidad hacia la fase estacionaria, las cuales se encuentran insertadas en la proteína de fusión.

Un método ampliamente empleado es la cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC), donde las proteínas recombinantes deben tener una etiqueta corta de afinidad compuesta de residuos de polihistidina. La purificación por afinidad de etiqueta de histidinas presenta muchas ventajas, tales como, una alta afinidad de la etiqueta de histidinas en una matriz de agarosa de metal (Níquel, cobre o zinc)-ácido inminodiacético y una fácil elución con amortiguador de imidazol ²⁶ (figura 8).

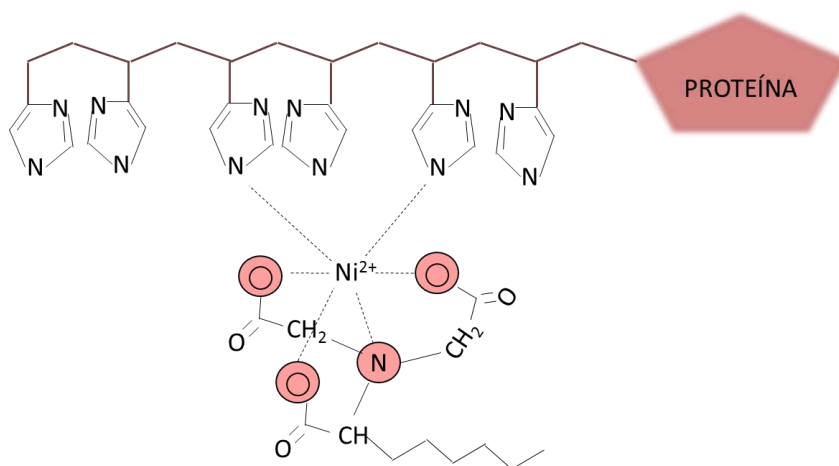


Figura 8. Se observa un enlace coordinado entre un ion metálico unido covalentemente a un agente quelante, con una proteína etiquetada con histidinas, las líneas rosa ilustran la cadena polipeptídica.

3.3.3 RP-HPLC Cromatografía de líquidos de alta eficiencia de fase reversa

El uso de cromatografía líquida de fase reversa (RP-HPLC) se ha ido incrementando en los últimos años, convirtiéndose en uno de los mejores métodos para separar mezclas de proteínas pequeñas. En RP-HPLC, la fase estacionaria es no polar, mientras que la fase móvil es polar. La fase estacionaria es normalmente sílice porosa con cadenas de *n*-alkilo enlazadas, principalmente octadecilo, así como octilo, hexilo, butilo y cadenas propilo.

Las columnas compuestas de sílice se utilizan con gran frecuencia en las separaciones de péptidos por RP-HPLC, el uso de fases poliméricas (divinilbenzeno poliestireno) y materiales compuestos (partículas de sílice con un revestimiento polimérico) son químicamente más estables a diferentes valores de pH. La fase móvil generalmente consiste de una mezcla de agua y solventes orgánicos, como acetonitrilo, metanol o isopropanol. El análisis de péptidos por RP-HPLC normalmente requiere un gradiente de elución.

Se debe tener en cuenta que las cadenas polipeptídicas interaccionan con grupos silanol libres presentes en la fase estacionaria. Se deben adicionar sales o ácidos fuertes a la fase móvil con el fin de bloquear estos grupos. Para reducir la

naturaleza polar de los péptidos, el procedimiento cromatográfico debe realizarse en valores de pH menores que 3, para que el grupo carboxilo de los aminoácidos (ácido aspártico y ácido glutámico) no se encuentre presente en su forma disociada. A estos valores de pH, los aminoácidos básicos como histidina, lisina y arginina se encuentran cargados y deben ser bloqueados mediante la formación de pares iónicos, para tal motivo el ácido trifluoroacético (TFA) se utiliza en la separación de péptidos ²⁷.

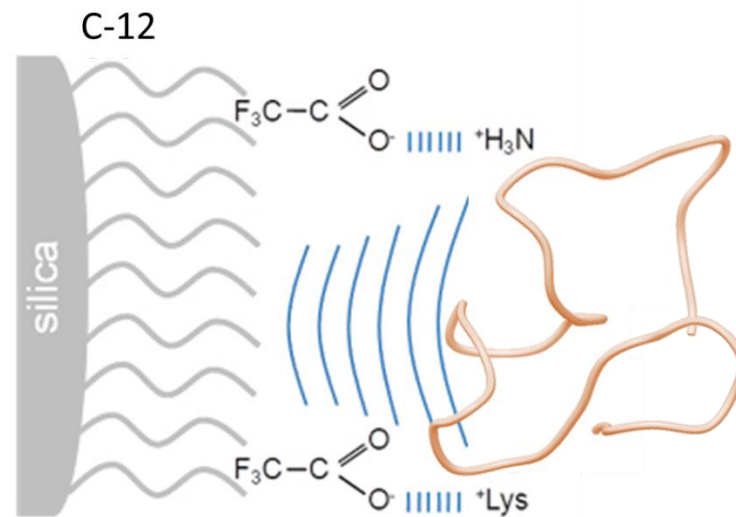


Figura 9. Representación esquemática de RP-HPLC aplicado a proteínas. Se ilustra como la proteína interacciona con la fase estacionaria (C-12), así como el TFA neutraliza las cargas de la proteína.

3.4 Caracterización de proteínas

La función de las proteínas y su especificidad de interacción dependen principalmente de la conformación que adoptan, la cual se conoce como estructura terciaria o conformación nativa ²⁸. Debido a esta relación entre la estructura y la función, las técnicas analíticas han sido y están siendo herramientas fundamentales para que los bioquímicos intenten comprender el proceso vital y el papel que las proteínas desempeñan en este proceso. Por muchos años la difracción de rayos X de cristales únicos fue la única técnica que permitió la determinación de estructuras de macromoléculas bioquímicas, treinta y ocho años después se le da el premio Nobel de Química a investigadores que contribuyeron a la aplicación de la espectrometría de masas (EM) y la resonancia magnética

nuclear (RMN) al análisis y determinación de estructuras de proteínas ²⁹. Por otro lado, es importante conocer que el plegamiento tridimensional de las proteínas no genera una estructura rígida. Estudios de difracción de rayos X y de RMN demuestran que tienen cierta flexibilidad, la cual, en muchas ocasiones, contribuye a que éstas puedan cumplir con su actividad biológica ³⁰.

3.4.1 Espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)

La espectrometría de masas MALDI-TOF ofrece una determinación rápida de las masas moleculares. Usualmente, se forman iones moleculares intactos, permitiendo la determinación de la masa de los péptidos y proteínas. Cuando tenemos subunidades de proteínas enlazadas no covalentemente, estas generalmente se disocian en cadenas de polipéptidos individuales, mientras que las cadenas peptídicas conectadas por enlaces covalentes, como puentes disulfuro, permanecen unidas.

En espectrometría de masas MALDI-TOF una pequeña cantidad de del analito de interés (1 µL) se cocrystaliza en una placa con una matriz sólida que contiene un cromóforo que absorbe luz ultravioleta o infrarroja (relación molar de la matriz y el analito 1000:1 a 100,000:1), las moléculas de proteína ionizada se liberan mediante la desorción (vaporización) de la mezcla de proteína y matriz de la superficie, por pulsos de láser de duración de nanosegundos, que se aceleran en un campo eléctrico en vacío. A menudo las proteínas o péptidos se liberan con una sola carga (z=1) aunque es frecuente la generación de especies multicargadas. Los iones con proporciones de masa/carga(m/z) baja se aceleran a velocidades más altas y alcanzan el detector antes que los iones con una alta relación m/z ³¹ de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$t = \frac{d}{\sqrt{2U}} \sqrt{\frac{m}{q}}$$

3.4.2 Resonancia magnética nuclear de proteínas

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica de gran importancia en la investigación científica y es una de las dos metodologías que existen para determinar la estructura molecular de macromoléculas a nivel atómico.

La RMN se basa en la interacción del momento magnético de un núcleo con un campo magnético. El momento magnético del núcleo está asociado con el espín nuclear, el cual es una forma de momento angular que posee el núcleo. El valor del espín nuclear está definido por el número de espín. El momento nuclear magnético asociado con el espín nuclear depende de las propiedades de un núcleo y su número de espín ³².

El hecho de que la mayoría de núcleos atómicos posean espín diferente de 0, al someter estos núcleos atómicos a un campo magnético fuerte, el momento magnético del núcleo tiende a orientarse preferentemente a favor del campo magnético aplicado y, por tanto, si se aplica una energía que obligue a los núcleos a invertir el sentido de su orientación, en este momento se puede decir que el sistema está en resonancia. A este fenómeno es al que se conoce como RMN ³³.

Con los datos que proporciona la RMN es posible determinar la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas, pero es necesario tener la estructura primaria para facilitar los análisis de los espectros de RMN. Para la determinación de la estructura tridimensional de la proteína es necesario asignar todas las señales de los espectros en dos dimensiones. Con los espectros TOCSY es posible determinar que señales corresponden al sistema de espín para cada aminoácido particular, junto con el experimento COSY ³⁴, el cual, permite observar núcleos que se encuentran acoplados a 2 o 3 enlaces de distancia, facilitando la asignación. Luego de esto se realiza la asignación secuencial de los aminoácidos en la estructura de la proteína con ayuda del experimento NOESY, el cual nos permite observar núcleos que se encuentran cercanos espacialmente, a menos de 5 Å de distancia. En la Figura 10 se ilustra un diagrama del procedimiento que se debe seguir para la determinación de la estructura tridimensional de proteínas ³⁵.

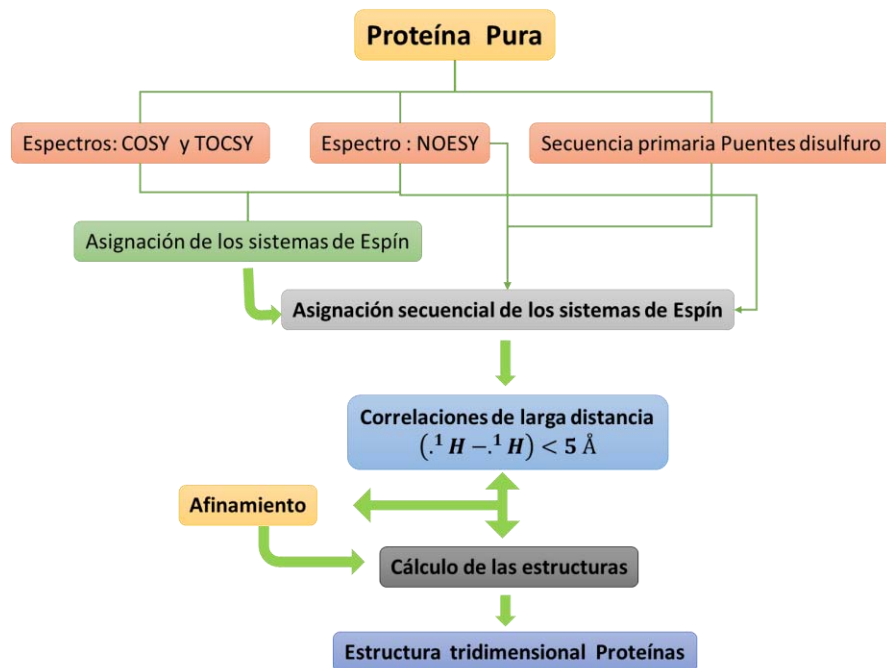


Figura 10. Diagrama del procedimiento para la determinación de estructuras de proteínas ³⁵.

La aplicación propuesta por el laboratorio de Wüthrich ³⁴ se basa en la asignación de los desplazamientos químicos de los protones de la cadena lateral y principal utilizando acoplamiento escalar, así como las correlaciones NOEs ³⁴. La elucidación de las cadenas laterales de los aminoácidos se basa principalmente en estimaciones de distancia obtenidas por los NOEs de larga distancia, suplementados con ángulos dihedros e información de puentes de hidrógeno obtenida a partir de constantes de acoplamiento escalar y tasas de intercambio de protón de amida ³⁶; por lo que la reconstrucción de la estructura se realiza utilizando algoritmos computacionales de geometrías de distancia ³⁷.

2.7.2.1 Índice de desplazamiento químico (CSI)

El método del índice de desplazamiento químico es una herramienta que nos permite obtener a partir de los desplazamientos químicos información valiosa acerca de la estructura de las proteínas. Por medio de este método es posible identificar los elementos de estructura secundaria de cada residuo en la secuencia de manera dependiente. Para que sea posible implementar esta herramienta, es necesario tener una asignación completa de los residuos presentes en la proteína.

El desplazamiento químico observado para un núcleo particular se compara con ciertos valores de referencia (anexo 3), el método asigna 3 índices -1, 0 ó 1, dependiendo de la variación en el desplazamiento químico observado, si es cercano al valor permitido o a uno de los extremos (valor de referencia $\pm 0,1$ ppm respectivamente), es decir, cuando el desplazamiento químico observado sobrepasa el valor de referencia $+0,1$ ppm se asigna el índice 1, por el contrario, si el desplazamiento químico observado sobrepasa el valor de referencia $-0,1$ ppm se asigna el índice -1. Repeticiones consecutivas en los índices permiten determinar los elementos de la estructura secundaria ³⁸.

4 HIPÓTESIS

Mediante el vector de expresión pET-32a se podrá obtener la toxina TcoKIK del alacrán *Tityus costatus* de manera recombinante en *Escherichia coli*, la cual se espera presente un plegamiento definido.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Estudiar y optimizar los parámetros de la expresión de la TcoKIK con el vector de expresión pET-32a en *Escherichia coli* y establecer las condiciones analíticas para la purificación de esta toxina.

5.2 Objetivos específicos

- Obtener la TcoKIK empleando el vector de expresión pET-32a en *Escherichia coli*.
- Purificar la proteína recombinante TcoKIK utilizando distintas técnicas cromatográficas.
- Caracterizar la proteína TcoKIK por espectroscopía de masas MALDI-TOF.
- Caracterizar la proteína TcoKIK por Dicroísmo Circular.
- Caracterizar la proteína TcoKIK empleando RMN.

6 DISEÑO EXPERIMENTAL

A continuación se resume el diseño experimental llevado a cabo para cumplir con los objetivos planteados en este proyecto (figura 11).



Figura 11. Diagrama de flujo para la obtención y caracterización de la TcoKIK.

Diseño del gen TcoKIK-pET32a

El diseño del gen se llevó a cabo teniendo en cuenta que se esperaba obtener la TcoKIK recombinante utilizando las cepas de *E. coli* Rosetta™ y *E. coli* Rosetta-gami™, con el fin de que alguna de estas cepas produjera la proteína de fusión soluble. Por tanto, se construyó el gen, de tal manera que obtuviera la proteína de fusión

con el diseño que se muestra a continuación (figura 12).

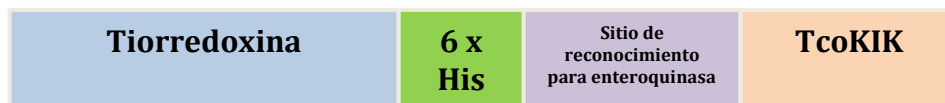


Figura 12. Representación de la proteína de fusión. En la figura se representan las regiones que constituyen a dicha proteína: el dominio de tiorredoxina, la secuencia de 6 histidinas consecutivas, el sitio de corte con enteroquinasa y la secuencia de aminoácidos de la proteína TcoKIK.

El gen se insertó en las bacterias productoras mediante transformación de células competentes de las cepas Rosetta™ y Rosetta-gami™ de *E. coli*. A continuación, se realizaron las cinéticas de expresión con el fin de observar que cepa producía mayor cantidad de proteína soluble; para esto, cada cepa transformada se inoculó en 100 mL de medio de cultivo Luria Bertani (LB)(ANEXO1) con los antibióticos apropiados. Los 100 mL de medio de cultivo se incubaron por 14 h, a 37 °C, luego se transfirieron a un matraz que contenía 1,5L de medio LB y los antibióticos (ampicilina 100 µg/mL y cloranfenicol 34 mg/mL para Rosetta™ y para Rosetta gami™ ampicilina 100 µg/mL, cloranfenicol 34 mg/mL, tetraciclina 5 mg/mL y kanamicina 30 mg/mL). Los matraces se incubaron a 37°C monitoreando continuamente el valor de la densidad óptica a 600 nm. Cuando el cultivo bacteriano alcanzó una densidad óptica de 0.7, se modificó la temperatura a 30°C y se agregó el agente inductor de la expresión isopropil β- tiogalactopiranososa (IPTG) 1.0 M, utilizando una concentración final en el cultivo bacteriano de 500 mM. En este momento, las bacterias se encuentran en la fase logarítmica del crecimiento bacteriano. La expresión de la proteína de fusión fue monitoreada en ambas cepas para determinar el tiempo donde ocurre la máxima expresión a 30°C.

Después de realizar la inducción de la expresión de proteína en ambas cepas, se tomaron muestras de 1 mL de cultivo a diferentes

intervalos de tiempo, las cuales fueron centrifugadas con el fin de coleccionar el paquete celular para ser resuspendido en 60 μ L de BL.

Una vez que se obtuvo la cinética de expresión en ambas cepas, se procedió a generar proteína de fusión a mayor escala en la cepa que presentó un mayor rendimiento. Luego de la expresión de proteína de fusión se debe extraer del microorganismo para continuar con la purificación de la proteína de interés, la TcoKIK. Para ello, se coleccionaron las células por centrifugación a 6.500 rpm, 4°C por 6 min. El paquete celular se resuspendió en BL (Apéndice 1) continuando con la lisis celular mediante choques sónicos. El extracto celular se centrifugó a 16.500 rpm, 4°C por 45 min, con el fin de separar la fracción soluble de la fracción insoluble. La fracción soluble fue purificada como se describe en el siguiente inciso.

Purificación

La producción de la proteína recombinante TcoKIK se desarrolló en tres pasos principales, los cuales fueron: aislamiento de la proteína de fusión del extracto celular, hidrólisis enzimática de la proteína de fusión con enteroquinasa y purificación de la proteína recombinante TcoKIK por cromatografía líquida de alta eficiencia de fase reversa.

6.2.1 Aislamiento de la proteína de fusión

El aislamiento de la proteína de fusión de interés fue posible empleando una columna de cromatografía de afinidad metal quelato HiTrap®, debido a que la proteína posee una etiqueta de 6 histidinas, las cuales son capaces de coordinar iones metálicos adheridos a la fase estacionaria de la columna, para este caso níquel. Luego de pasar el extracto celular por la columna, se realizó un lavado inicial con BL, con el fin de despegar todo aquello que no tiene afinidad por la columna. A continuación, se realizó un gradiente de elución con imidazol a diferentes concentraciones, con

péptidos provenientes del corte, que no fueron separados en la purificación por afinidad; para luego realizar una correcta caracterización de ella. Para esto primero se realizó la preparación de la muestra empleando un cartucho de extracción en fase sólida Strata® C-18 de 55 μm de tamaño de partícula y 140 Å de tamaño de poro con capacidad de 6 mL.

Se determinó la concentración de ACN necesaria para eluir la proteína; mediante un gradiente de concentración, encontrando que la fracción de ACN al 30% era la que contenía la proteína. La elución con ACN al 30% fue liofilizada y resolubilizada en ACN al 12%, para así llevar a cabo el paso final de la purificación, el cual se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia de fase reversa (RP-HPLC) en un equipo Pro-StarVarian equipado con un sistema de disolventes con gradiente binario. Se empleó una columna Jupiter 4 μ Proteo 90A C12 de 250 mm de largo y 4.6 mm de diámetro interno. Para este paso, se optimizó el gradiente de H₂O/ ACN (0,05% TFA) con el fin de obtener la TcoKIK con la mayor pureza posible. El flujo utilizado fue de 1mL/min detectando a una longitud de onda de 230nm.

Caracterización

6.3.1 Caracterización por espectrometría de masas

La caracterización inicial de la proteína se llevó a cabo mediante espectroscopía de masas MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight) en un equipo Bruker Daltonics en el laboratorio de servicios analíticos del Instituto de Química UNAM. Las muestras se prepararon tomando 1 μL de lo colectado tras la purificación por RP-HPLC y haciendo diluciones 1:10 con la matriz, ácido 4-hidroxi- α -ciano-cinámico, en una mezcla H₂O-ACN 2:1 con 0.05% de ácido trifluoroacético.

6.3.2 Determinación estructural por dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular se determinaron en el Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas (LFQIP) de la Facultad de Medicina de la UNAM. Se empleó un espectropolarímetro Jasco modelo J-720 con una celda de paso óptico de 0,1 cm.

6.3.3 Determinación estructural por resonancia magnética nuclear

Para la caracterización estructural por RMN, la muestra se preparó disolviendo 1 mg de la proteína recombinante (TcoKIK) en 275 μ L de 95/5 % de H₂O/D₂O. Se realizaron los experimentos COSY, TOCSY (tiempo de mezclado de 0,075 s) y NOESY (tiempos de mezclado de 0,15 s y 0,3 s) en un equipo Bruker de 700 MHz a 25°C, empleando la supresión del agua DPFGE. Se emplearon 512 incrementos complejos y 2048 puntos en la adquisición directa. Una vez adquiridos los FID's de cada experimento, se realizó el procesamiento de los datos, en el programa nmrPipe, y el ajuste de fase auxiliándose con la interfaz gráfica nmrDraw. La asignación de las señales de los sistemas de espín de la proteína se realizó en el programa CARRA 1.5 empleando la herramienta XEASY. Para realizar la asignación de los sistemas de espín de la TcoKIK se siguió la metodología propuesta por Wüthrich ³⁴.

Brevemente, este proceso se describe a continuación: se traslaparon los espectros COSY y TOCSY, analizando las señales, comparándolas con los patrones conocidos que se presentan en los aminoácidos (anexo 2) y comparando con la secuencia primaria de la proteína, de esta manera, se identificaron los tipos de aminoácidos observados en el espectro. Posteriormente, se realizó la asignación secuencial de los sistemas de espín, para esto ya teniendo identificado el tipo de aminoácido que corresponde a cada sistema de espín, se traslaparon los espectros TOCSY y NOESY. Las señales NOE diferentes a las

señales TOCSY corresponden a correlaciones en el espacio, con éstas podemos conocer los aminoácidos que se encuentran secuenciales y los residuos cercanos espacialmente y que no son secuenciales, estos últimos son evidencia de la estructura tridimensional del péptido. Por último, con base en la asignación realizada, se calculó la estructura tridimensional con ayuda del programa CYANA.

6.3.3.1 Método del índice de desplazamiento químico

Luego de realizar la asignación de todos los residuos presentes en la secuencia de la proteína, se comparó el desplazamiento químico de los protones alfa encontrados para cada aminoácido, con los valores esperados mostrados en el anexo 3. Como se mencionó anteriormente, cuando el desplazamiento químico fue mayor que el de referencia por 0,1 ppm o más, se asoció al índice 1, por el contrario, cuando se recorrió a un desplazamiento menor o igual a 0,1 ppm con respecto al valor de referencia se asoció al índice -1. Cuando no se presentó ninguno de los anteriores casos se asoció al índice 0.

7 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Expresión en *Escherichia coli*

En la figura 14 se muestra la cinética de expresión de la proteína de fusión en las cepas *E. coli* Rosetta gami™ y *E. coli* Rosetta™ en función del tiempo.

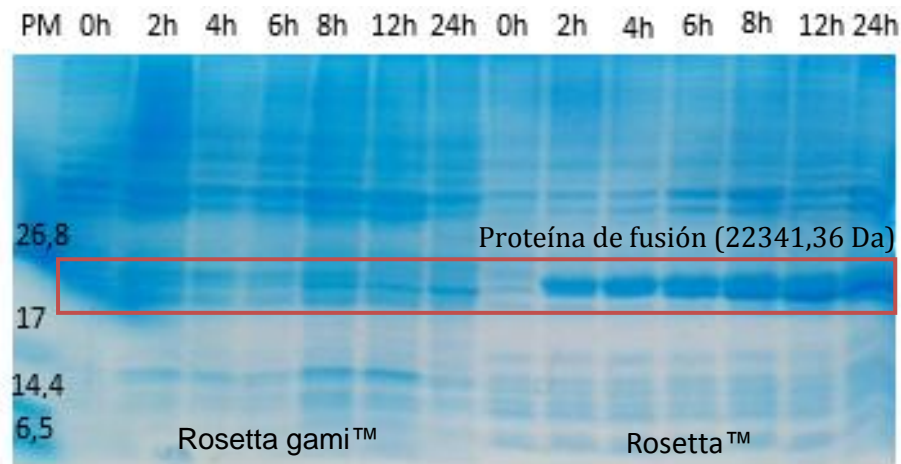


Figura 14. Cinética de expresión de la proteína de fusión en las cepas *E. coli* Rosetta gami™ y *E. coli* Rosetta™. La proteína de fusión se resalta en color naranja, tiene una masa molecular teórica de 22341,36 Da. El tiempo de inducción se fijó en 12 h para la cepa Rosetta™ de acuerdo a los resultados presentados en este gel de electroforesis (SDS desnaturizante).

El marcador de pesos moleculares empleado para los geles de poliacrilamida contiene 6 polipéptidos con un rango de masa molecular de ~1.4 a ~26.6 KDa, en la mayoría de geles no se observan los 6 estándares esperados, debido a que esta concentración de poliacrilamida (16%) no es suficiente para separar los polipéptidos de menor masa molecular o en algunos casos el gel

corrió en un tiempo mayor al adecuado, ocasionando que los polipéptidos más pequeños se salieran del gel. La masa molecular esperada para la proteína de fusión es de 22341,36 Da. Como se observa en la figura 14, es notable la diferencia en cantidad de proteína de fusión producida por ambas cepas. Puesto que para la cepa Rosetta gami™ la producción de proteína soluble es casi nula, mientras que para la cepa Rosetta™ la sobreexpresión de proteína es evidente. Por lo tanto, se decidió expresar la proteína de fusión en la cepa Rosetta™, empleando un tiempo de inducción de 12 h, debido a que no se nota mucha diferencia con respecto a 24 h, se empleó una concentración de 0,5mM de IPTG y una temperatura de incubación de 30°C.

La proteína de fusión se expresó en 6 L de medio de cultivo, empleando las condiciones óptimas de expresión, con el fin de obtener cantidad suficiente de proteína para la correcta caracterización de la TcoKIK. Luego de transcurrir 12 h de inducción; se colectó el paquete celular por centrifugación, obteniendo un rendimiento promedio de 3.3 g/L de medio de cultivo.

Luego de colectar el paquete celular, éste fue resuspendido en BL, empleando 12.5 mL por cada gramo de paquete celular. Seguidamente, se sonicó a 63 W durante 10 min en intervalos de 20 s con intermedios de 1 min 30 s en hielo. Este lisado obtenido se centrifugó por 45 min a 16500 rpm para continuar con el aislamiento de la proteína de fusión.

Purificación

El sobrenadante se filtró con una membrana de tamaño de poro de 0.45 μm y se hizo pasar por una columna HiTrap® cargada con Ni^{2+} previamente equilibrada. Las eluciones (25 mL c/u) se realizaron

empleando un gradiente de concentración de imidazol, con el fin de encontrar la concentración óptima de imidazol para desplazar por completo la proteína de fusión, como se muestra a continuación en el gel de poliacrilamida. Este proceso se realizó con un flujo de 5 mL/min.

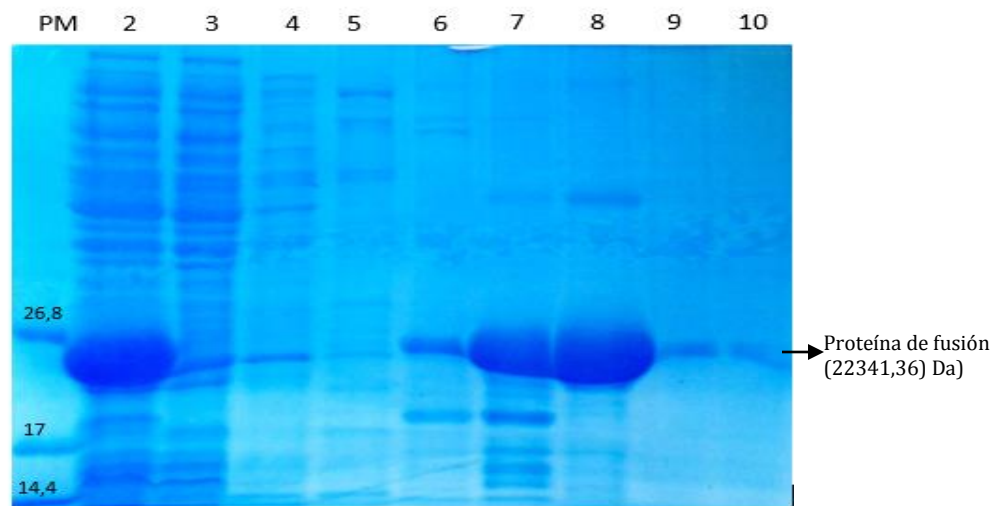


Figura 15. Purificación de la proteína de fusión. (PM) Marcador de pesos moleculares. (2) Lisado celular antes de ser pasado por la columna. (3) Fracción no retenida por la columna. (4) Fracción eluida con 5mM de imidazol. (5) Fracción eluida con 25mM de imidazol. (6) Fracción eluida con 50mM de imidazol. (7) Fracción eluida con 100mM de imidazol. (8) Fracción eluida con 200mM de imidazol. (9) Fracción eluida con 300mM de imidazol. (10) Fracción eluida con 500mM de imidazol. Solo se observan 3 bandas en el marcador de pesos moleculares debido a que los estándares más pequeños se salieron del gel.

En la figura 15 se observa que en las primeras fracciones eluyen proteínas con baja afinidad por la columna, por lo tanto, se decidió proceder con las siguientes purificaciones, realizar dos lavados previos a la elución de la proteína de fusión con 25 mM de imidazol y 50 mM de imidazol, para continuar así con la elución de la proteína de interés utilizando una concentración de 300mM de imidazol. En esta forma, se aseguró la elución completa de la proteína adherida a

la columna. Posteriormente, se realizó la desalación de la proteína de fusión en una columna de exclusión molecular PD-10®, con el fin de retirar el imidazol proveniente de la elución para que no interfiriera en la reacción de proteólisis. La proteína de fusión se cuantificó midiendo absorbancia a $\lambda=280\text{nm}$, para lo cual se obtuvo que el rendimiento de proteína de fusión por litro de cultivo fue de 31.33 mg/L.

Luego de determinar la concentración de la proteína de fusión, se procedió a buscar condiciones para un corte óptimo con la enzima enteroquinasa. Inicialmente, se partió del amortiguador recomendado por el manual de la enzima, el cual contenía 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM CaCl_2 , y 0.1% Tween-20 (anexo 1), para esto se varió la concentración de enzima y la temperatura. Se monitoreó el corte a diferentes tiempos con el fin de elegir las condiciones más favorables, tal como se observa a continuación.

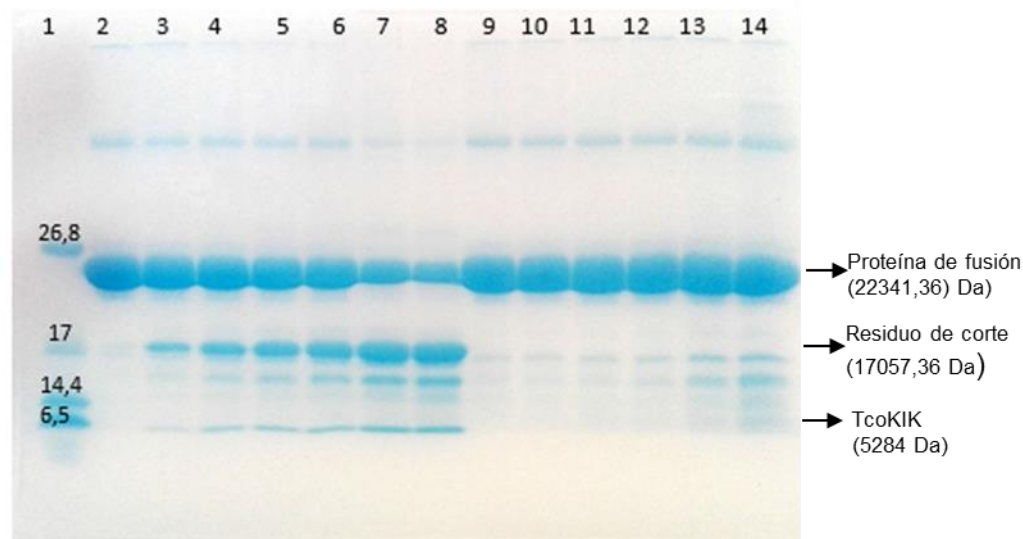


Figura 16. Monitoreo del corte enzimático de la proteína de fusión utilizando 0,1 U de enteroquinasa/mg proteína ($^{\circ}\text{T}$ = ambiente). (1) Marcador. (2) $t=0$ h. (3) $t=2$ h. (4) $t=4$ h. (5) $t=6$ h. (6) $t=8$ h. (7) $t=18$ h. (8) $t=24$ h. 0,01 u de enteroquinasa/mg proteína ($^{\circ}\text{T}$ = ambiente). (9) $t=2$ h. (10) $t=4$ h. (11) $t=6$ h. (12) $t=8$ h. (13) $t=18$ h. (14) $t=24$ h.

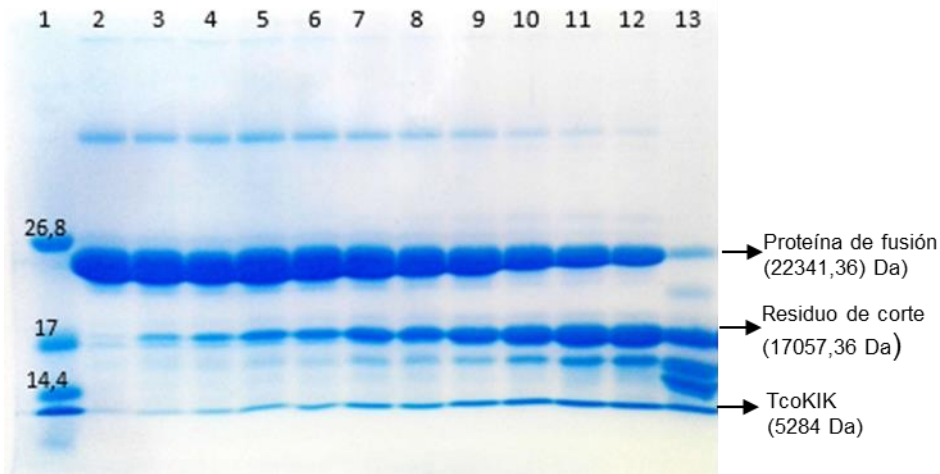


Figura 17. Monitoreo del corte enzimático de la proteína de fusión utilizando 0,001 U de enteroquinasa/mg proteína ($^{\circ}T$ = ambiente). (1) Marcador. (2) $t=0$ h. (3) $t=2$ h. (4) $t=4$ h. (5) $t=6$ h. (6) $t=8$ h. (7) $t=18$ h. (8) $t=24$ h. 0,1 u de enteroquinasa/mg proteína ($^{\circ}T=37^{\circ}C$). (9) $t=2$ h. (10) $t=4$ h. (11) $t=6$ h. (12) $t=8$ h. (13) $t=18$ h.

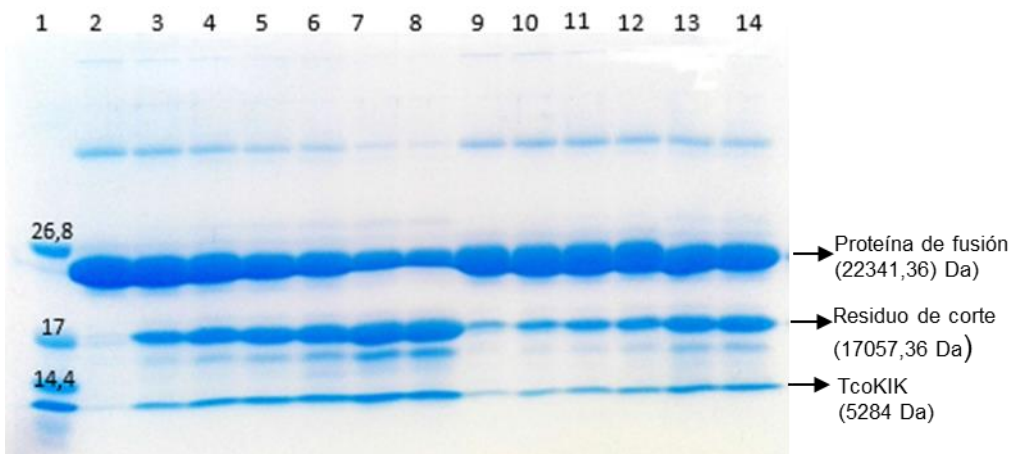


Figura 18. Monitoreo del corte enzimático de la proteína de fusión utilizando 0,01 u de enteroquinasa/mg proteína ($^{\circ}T=37^{\circ}C$) (1) Marcador. (2) $t=0$ h. (3) $t=2$ h. (4) $t=4$ h. (5) $t=6$ h. (6) $t=8$ h. (7) $t=18$ h. (8) $t=24$ h. 0,001 u de enteroquinasa/mg proteína ($^{\circ}T=37^{\circ}C$). (9) $t=2$ h. (10) $t=4$ h. (11) $t=6$ h. (12) $t=8$ h. (13) $t=18$ h. (14) $t=24$ h.

Con base en los resultados anteriores, se determinó que los cortes más eficientes se obtuvieron utilizando una temperatura de $37^{\circ}C$, puesto que a temperatura ambiente y por 24 h la digestión

enzimática fue casi nula. Además, es posible observar que al emplear bajas concentraciones enzimáticas, la digestión es muy lenta. Por lo tanto, se decidió que las mejores condiciones de corte fueron 0.1 unidad de enzima por cada mg de proteína de fusión, incubando la reacción a 37°C por 12 h, empleando una concentración final de proteína de fusión de 2.5 mg/mL.

Aunque estas condiciones de corte parecían óptimas para continuar con el proceso experimental, se determinó mediante espectrometría de masas y RMN que la proteína interacciona fuertemente con el tween 20, dificultando su purificación y caracterización final. Por este motivo, fue necesario modificar las condiciones de corte, para lo cual se probaron nuevas condiciones, las cuales se resumen en el siguiente cuadro.

Cuadro 1. Diferentes condiciones probadas para la digestión enzimática con enteroquinasa. Se muestra el resultado obtenido en cada proceso. Todas las digestiones se ensayaron a 37°C.

Agentes Caotrópicos	Concentración	Cantidad de enzima (U/mg)	Resultado
Ninguno	0	0,2	Cortes inespecíficos
Urea	100 mM 300 mM	0,2	Cortes inespecíficos
SDS	0,05%	0,2	Inhibición de la enzima
Urea	500 mM 1 M	0,15	Cortes inespecíficos
ACN	5%	0,15	Cortes inespecíficos
NaCl	50 mM	0,1-0,3	Cortes inespecíficos
Tritón	0,05% 0,025%	0,1	Corte completo en

Por lo tanto, se decidió utilizar tritón 0,05% como agente caotrópico, para la digestión con enteroquinasa, empleando un tiempo total de 6 h, con el fin de evitar que se generaran cortes inespecíficos.

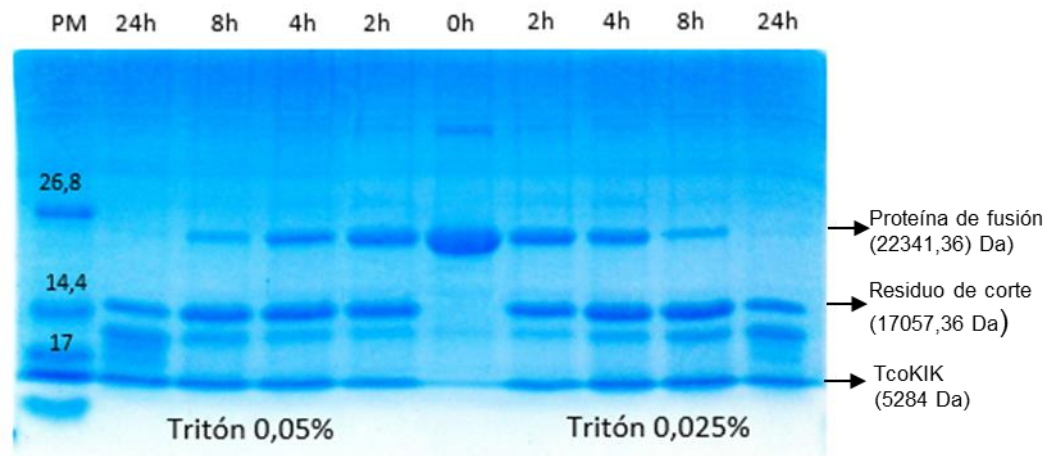


Figura 19. Cinética de corte con tritón. Se observa en el lado derecho del gel la digestión enzimática de la proteína de fusión empleando una concentración de tritón de 0,025%, mientras en el lado izquierdo se emplea una concentración de tritón de 0,05%.

Transcurrido el tiempo necesario para el corte, la disolución de reacción se filtró con una membrana de $0,45\ \mu\text{m}$ y se pasó nuevamente por una columna HITRAP® cargada con Ni^{2+} , con el fin de retirar el residuo de corte. La fracción que contenía la TcoKIK se colectó inmediatamente, realizando un lavado con 5 volúmenes de columna (25mL) del amortiguador de corte.

Cromatografía líquida de fase reversa

En la figura 20 se ilustra el cromatograma obtenido en la purificación de la TcoKIK cortada con el agente caotrópico tritón, además en líneas punteadas se muestra el gradiente de

concentración optimizado para esta proteína.

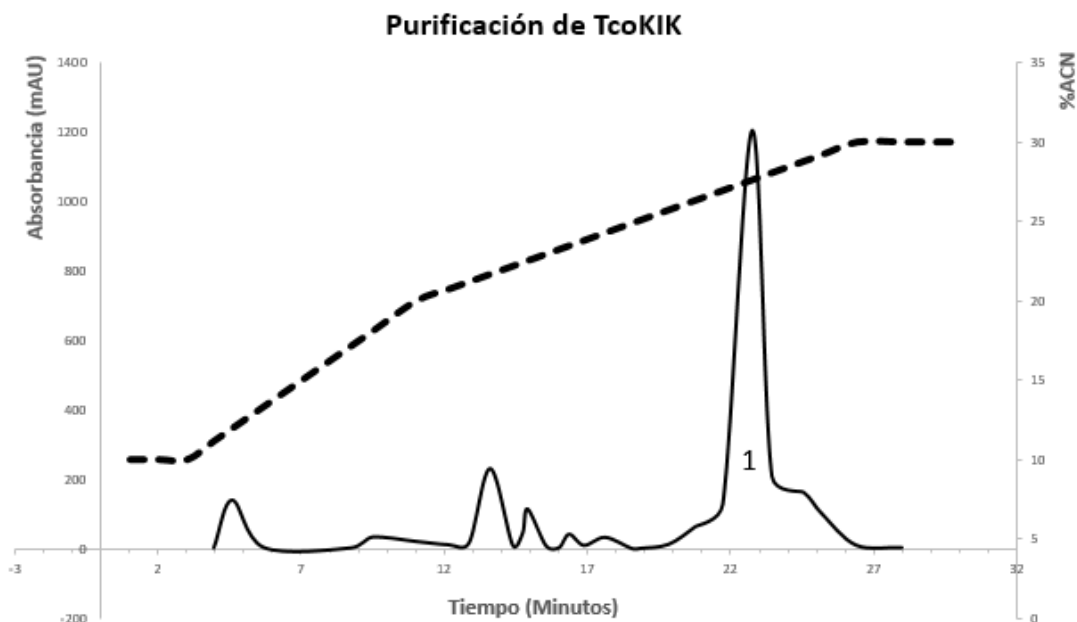


Figura 20. Cromatograma de la purificación de TcoKIK. Se ilustran los picos correspondientes a los productos del corte de la proteína de fusión con la proteasa enteroquinasa. La línea punteada indica el gradiente optimizado, es decir, se muestra el cambio de concentración de acetonitrilo con respecto al tiempo. El pico enumerado como (1) señala el tiempo de retención de la TcoKIK.

Cabe mencionar que al intentar la purificación de la proteína cortada con Tween 20, ésta se adhería fuertemente a la fase estacionaria de diferentes columnas probadas (C-12, C-18, C-4), requiriendo el uso de condiciones extremas para su limpieza.

En la figura 20 se observa que la TcoKIK eluye en un tiempo de retención de 22 min y 27% de acetonitrilo. La fracción equivalente al pico (1) fue liofilizada y posteriormente cuantificada, obteniéndose un rendimiento de 0.530 mg de proteína TcoKIK por litro de cultivo bacteriano.

Caracterización

Espectrometría de masas MALDI-TOF

Para confirmar la obtención de la proteína TcoKIK, se realizó la caracterización por espectrometría de masas del pico purificado por HPLC, se emplearon dos estándares de calibración: uno de ellos con una masa equivalente a 3402 Da y el otro con una masa de 5295 Da.

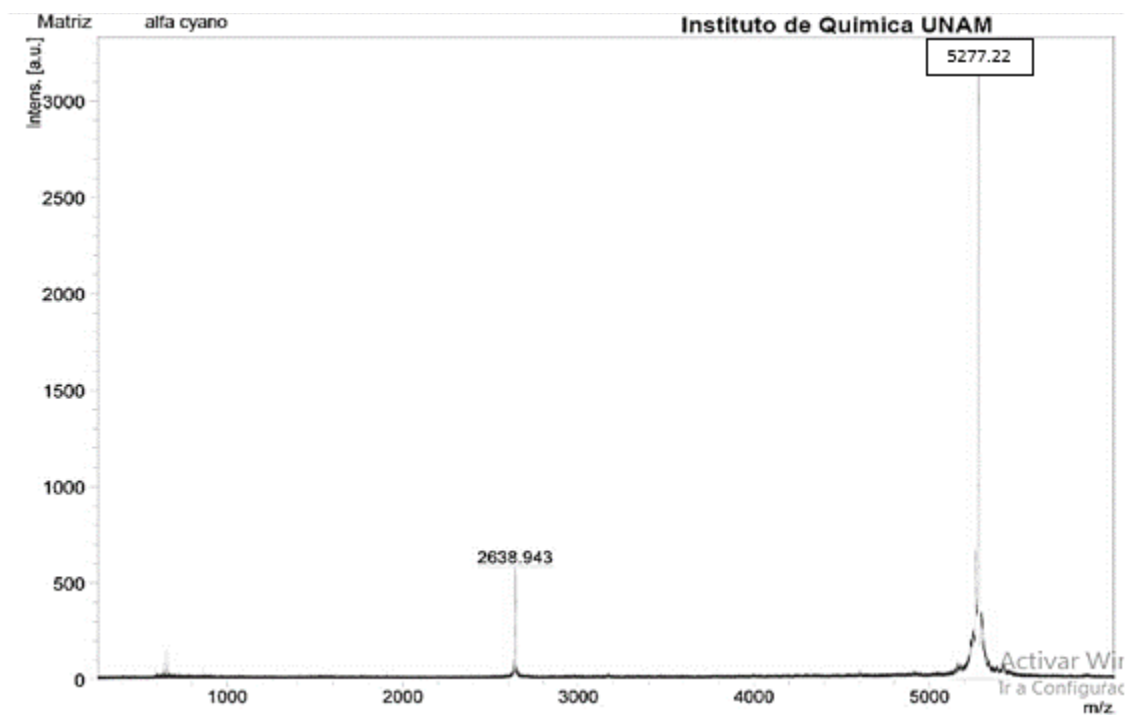


Figura 21. Espectro de masas MALDI-TOF del pico 1 purificado por HPLC. Se observa una relación de m/z experimental para la molécula protonizada $[M+ H]^+$ de 5277.22 que es congruente para la proteína TcoKIK oxidada con una masa teórica de 5278 Da, además se observa un pico equivalente a la proteína doblemente cargada (2638.94).

Debido a la alta resolución que presenta esta técnica y con la realización de una buena calibración, fue posible además de obtener la masa molecular de la proteína, determinar el número de puentes disulfuro formados. Teniendo en cuenta que por cada puente

disulfuro presente en la proteína, debe existir una diferencia de masa/carga de 2 unidades, entre la especie oxidada y la especie reducida (ausencia de enlace disulfuro).

La masa teórica para la TcoKIK en estado reducido es de 5284 Da, si asumimos que ésta se encuentra en estado oxidado, con la formación de tres puentes disulfuro, debido a las 6 cisteínas presentes, la masa que se espera es de 5278 Da, lo cual se corrobora con la relación de m/z encontrada en el espectro de masas (figura 21) de 5277.22, además es posible observar el pico correspondiente a la proteína doblemente cargada (2638.94).

Caracterización estructural por espectroscopía de dicroísmo circular (DC)

Esta medición se realizó como una prueba previa a la caracterización estructural por RMN, con el fin de determinar si existían ciertos elementos de estructura secundaria observables por esta técnica y, por ende, confirmar que ésta se obtuvo con algún plegamiento definido, capaz de conferirle su actividad. Para esto la proteína se disolvió en agua milli Q pH=7, obteniendo una concentración final de 0.515 mg/mL, la concentración de proteína se determinó en un espectrofotómetro Shimadzu BioSpec-nano empleando la elipticidad molar teórica de 7365 calculada mediante la herramienta ExPASy ProtParam³⁹, a continuación se pasó por un filtro de 0.22 μm , y se empleó un volumen final de 500 μL . El espectro resultó de la acumulación de 4 barridos (50 nm min⁻¹) en intervalos de 1 nm, con un tiempo de integración de 16 s entre 200 y 280 nm a 25 °C. No fue posible obtener información a menores longitudes de onda debido a que el equipo empleado no lo permite.

Los datos se normalizaron empleando la siguiente ecuación:

$$Elip_{\cdot MRW} = \frac{CD * M_{MRW}}{10 * C * L}$$

Donde

CD = señal del dicroísmo (miligrados)

MMRW = Masa Media por residuo, que en el caso de TcoKIK = 114,87Da

C = concentración de proteína en mg/mL. (0.5601 mg/mL)

L = longitud del paso de luz de la celda, que en este caso es = 0.1 cm

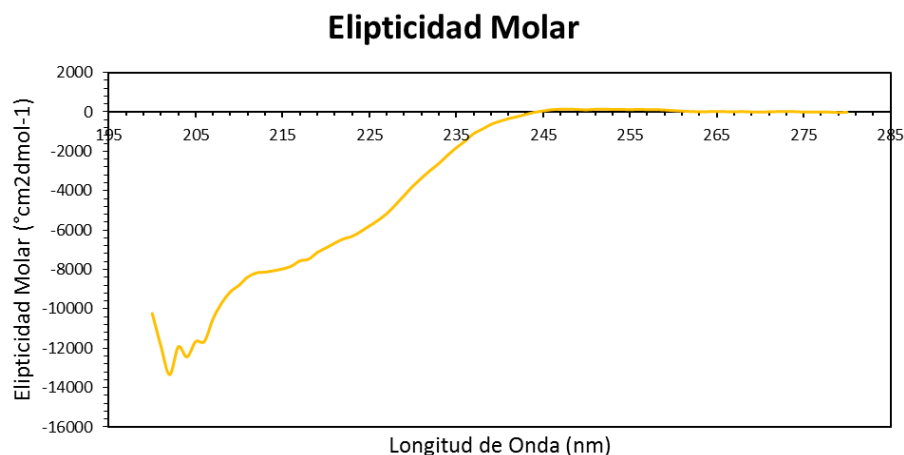


Figura 22. Espectro de DC de la TcoKIK.

Por medio de la espectroscopía de DC en la región espectral del UV lejano (190-250 nm) es posible estimar la estructura secundaria de las proteínas, a estas longitudes de onda, el cromóforo es el enlace peptídico, y la señal se origina cuando éste se localiza en un ambiente regular plegado ⁴⁰, por lo tanto, es posible diferenciar entre α -hélice, hojas β , y estructuras helicoidales aleatorias debido a que dan lugar a un espectro de DC de forma y magnitud característica ⁴¹.

En el espectro de DC se puede observar que la TcoKIK posee un plegamiento característico, mostrando cierto contenido de alfa hélice (con mínimos en 208 y 222), sin embargo, se debe tener en

cuenta que las proteínas con motivos estructurales $\alpha+\beta$ y α/β casi siempre tienen espectros dominados por el componente α -helicoidal y, por lo tanto, con frecuencia muestran bandas con un sólo espectro ancho mínimo entre 210 y 220 nm debido a las contribuciones superpuestas de α -hélices y hojas β , lo cual se observó en el espectro de esta proteína.

Los datos obtenidos fueron analizados empleando el método SELCON3 en el servidor DichroWeb ⁴², se obtuvo el siguiente análisis de estructura secundaria (Tabla 2).

Cuadro 2. Análisis de estructura secundaria de los datos obtenidos del experimento de dicroísmo circular en el servidor DichroWeb.

Result	Helix1	Helix2	Strand1	Strand2	Turns	Unordered	Total
Guess	0.006	0.086	0.299	0.161	0.109	0.339	1
SVD	0.059	0.108	0.168	0.087	-0.003	0.275	0.694
Convergent	0.007	0.087	0.296	0.159	0.106	0.339	0.994
Stage2	0.008	0.087	0.295	0.159	0.106	0.340	0.994
final	0.022	0.095	0.290	0.156	0.105	0.343	1.011

En el cuadro 2 se puede observar que de acuerdo al método empleado SELCON3 la toxina TcoKIK presenta 2,2 % de estructura hélice ordenada y 9,5 % de estructura hélice desordenada. Así como 29 % de hojas ordenadas y 16 % de hojas desordenadas, 10 % de giros y 34 % de estructura desestructurada.

Caracterización estructural por RMN

Se registraron los experimentos de RMN ¹H, TOCSY, COSY y NOESY. En la figura 23 se ilustra el espectro monodimensional de ¹H, donde se muestra ampliada la región en el desplazamiento químico de 6.25 a 9.50 ppm donde aparecen los protones de amida de la cadena principal, la dispersión observada en estas señales constituye una evidencia de que la TcoKIK presenta estructura

terciaria.

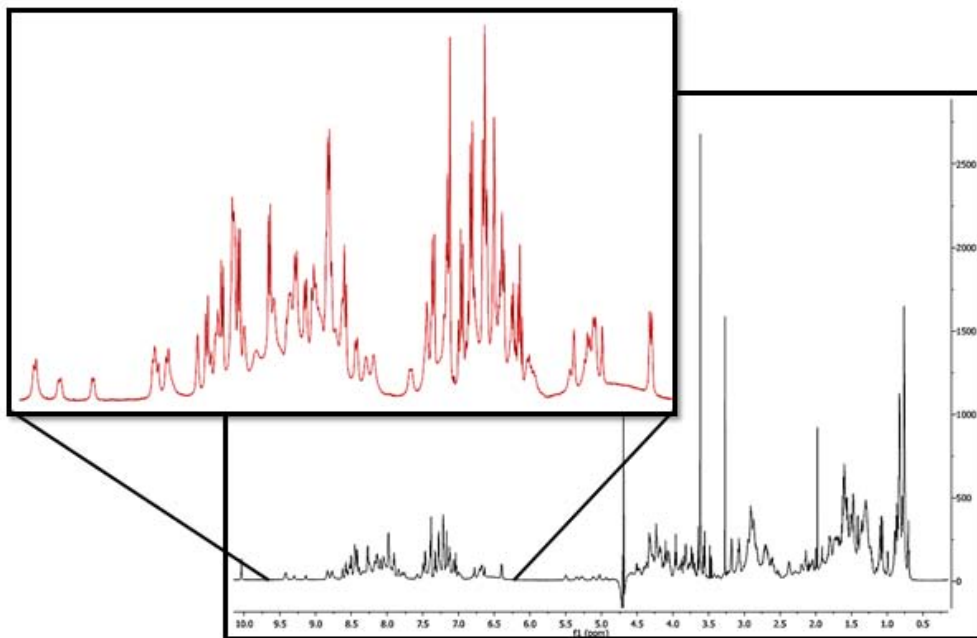


Figura 23. Espectro ^1H de la TcoKIK. Se muestra ampliada la zona donde aparecen las señales correspondientes a los protones de amida.

En la figura 24 se presenta el espectro bidimensional TOCSY obtenido para la TcoKIK. Por medio del experimento TOCSY se encontró cada sistema de espín, el cual es característico para cada aminoácido.

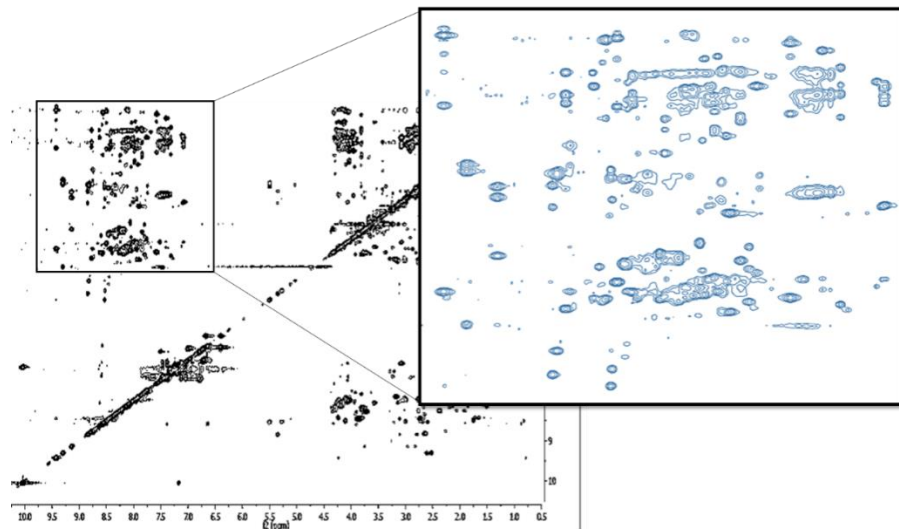


Figura 24. Espectro TOCSY de la TcoKIK. Se muestra ampliada la zona donde encontramos las señales pertenecientes a protones de amida acoplados a los otros protones de la cadena lateral para cada sistema de espín.

En la figura 24 se muestra el espectro TOCSY de la TcoKIK. En la región ampliada encontramos las señales pertenecientes a protones de amida acoplados a los otros protones de la cadena lateral para cada sistema de espín. En la región de las amidas es diferenciable un sistema de espín de otro, tal como se muestra en la figura 25, mientras que en otras zonas se dificulta la caracterización, debido al alto contenido de traslape de señales. En la figura 25 se realiza una amplificación de un sistema de espín específico, correspondiente al aminoácido aspartato 39 en la secuencia de aminoácidos. Se puede observar claramente las señales pertenecientes al protón alfa y los dos protones beta ubicados en la cadena lateral del aminoácido mencionado. De esta manera se asignaron 46 de 47 aminoácidos presentes en la proteína, la asignación secuencial fue posible empleando el experimento NOESY, el cual se ilustra en la figura 26.

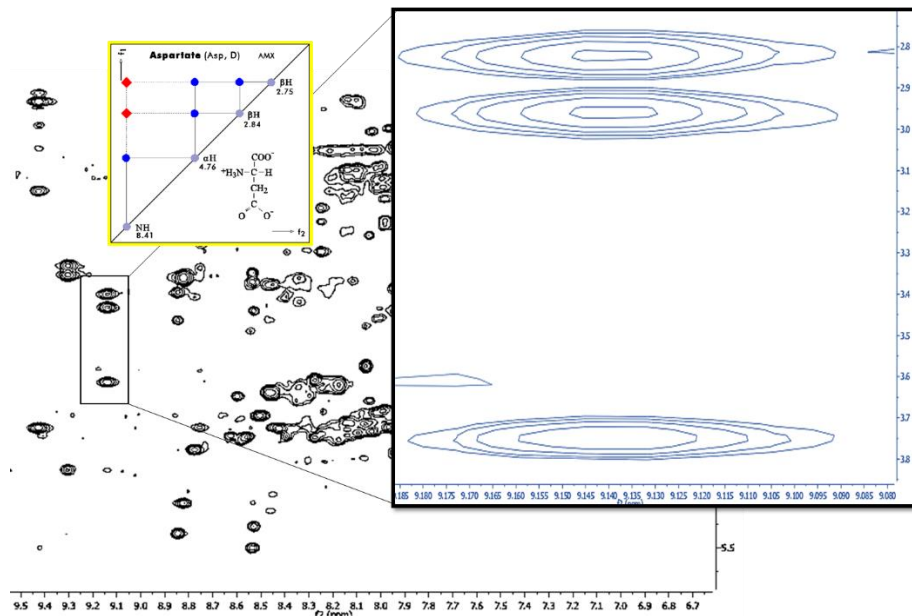


Figura 25. Espectro bidimensional TOCSY de la TcoKIK. En el recuadro pequeño se resaltan las señales correspondientes al aminoácido aspartato número 39 en la secuencia de aminoácidos de la proteína, estas señales se ilustran ampliadas en color azul. En el recuadro amarillo se muestran las señales junto con los desplazamientos químicos esperados para el sistema de espín de este aminoácido.

En la figura 26 se observa el espectro bidimensional NOESY obtenido para la TcoKIK, el cual se clasifica por zonas, mostrando para cada una de ellas, los protones que se encuentran acoplados a una distancia menor o igual a 5 Å, dependiendo su ubicación en la cadena lateral. Este espectro nos muestra información relevante acerca de los elementos de estructura secundaria presentes en la proteína.

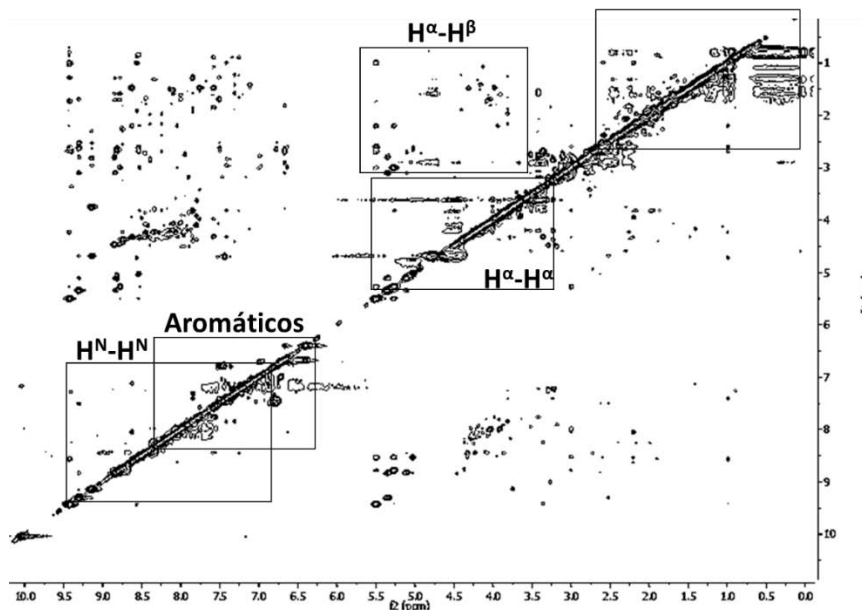


Figura 26. Espectro NOESY de la TcoKIK. Se resaltan ciertas zonas donde podemos observar interacciones entre protones específicos de la cadena lateral de los aminoácidos.

En la figura 26 también se observan diferentes señales que podrían ser evidencia de la existencia de elementos de estructura secundaria; por ejemplo, las señales debidas a las interacciones H^N-H^N del aminoácido i con el $i+1$ y del aminoácido i con el $i+2$ aparecen frecuentemente cuando hay presencia de hélices alfa, al igual que las interacciones H^N-H^α generalmente son evidencia de la presencia de hojas beta en la estructura.

Además de los elementos de estructura secundaria, es posible determinar la conectividad de puentes disulfuro entre las cisteínas presentes, mediante interacciones, principalmente, entre los protones beta de éstas.

Se asignaron 46 sistemas de espín, así como el 91% de las señales NOE presentes en el espectro, obteniéndose una estructura de baja resolución con un RMSD de 4.29 como se muestra en la figura 28, esta baja resolución debida principalmente al alto traslape de

señales que presentan los experimentos bidimensionales, lo cual dificulta la asignación del 100% de las señales NOE.

El gráfico de Ramachandran de la figura 27 muestra los ángulos ψ y ϕ de las 20 estructuras obtenidas en el cálculo de estructura de CYANA. Donde el 51.3% de los pares de ángulos diedros se encuentran en las zonas más favorecidas, el 48.3% se encuentra en la zona adicionalmente permitida, mientras que el 0.4% se encuentra en la zona generosamente permitida.

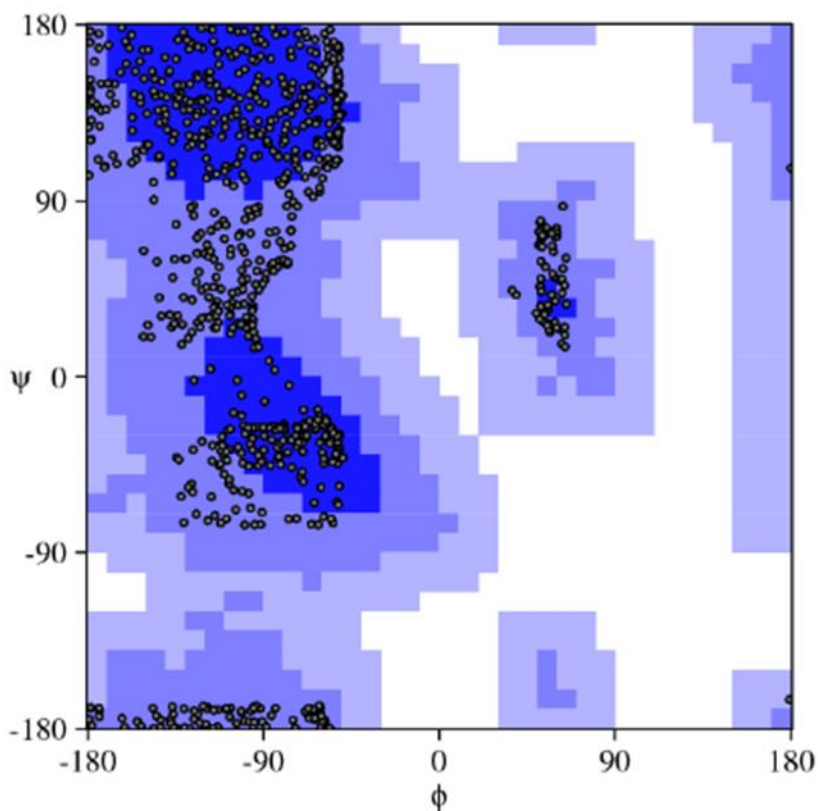


Figura 27. Gráfico de Ramachandran de las 20 estructuras calculadas en CYANA. Se observan 4 regiones de diferente color, las cuales se clasifican estadísticamente en: 1) No permitidas, representadas de color blanco. 2) Regiones generosamente permitidas, color azul claro. 3) Regiones adicionalmente permitidas, tonalidad intermedia del color azul. 4) Regiones favorecidas, color azul oscuro.

En la figura 28, se presenta la estructura calculada en CYANA, la cual presenta muy baja resolución y no se pueden apreciar los elementos de estructura secundaria esperados. Lo cual puede deberse al alto traslape de señales, el cual dificulta la obtención de una buena aproximación de las restricciones de distancia. Esto sugiere que el análisis de la estructura tridimensional para proteínas de este tamaño se encuentra favorecido mediante experimentos de triple resonancia.

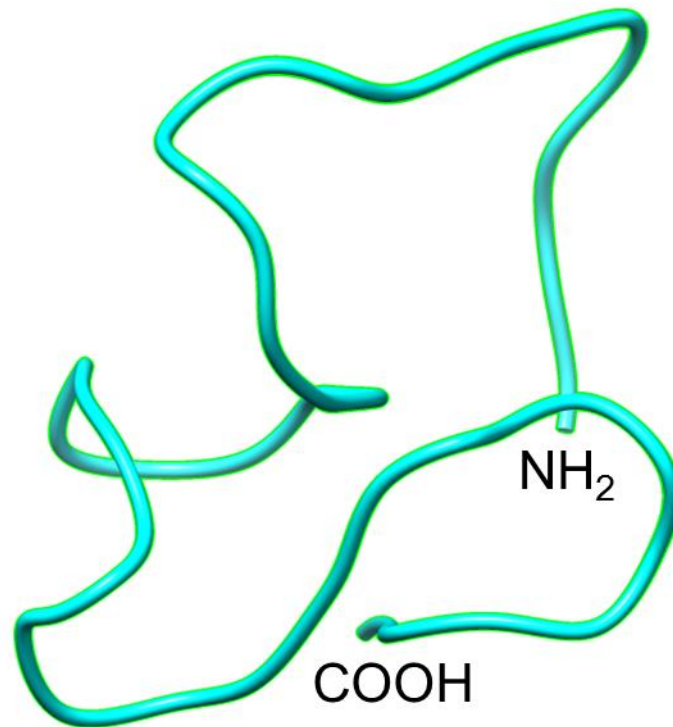


Figura 28. Estructura tridimensional obtenida para la proteína recombinante TcoKIK.

Con el fin de obtener una estructura tridimensional de mejor resolución para esta proteína, es necesario el enriquecimiento

isotópico y la obtención de experimentos de triple resonancia, con el fin de obtener una mejor dispersión de las señales y, a su vez, una mejor aproximación de las distancias intrarresiduales.

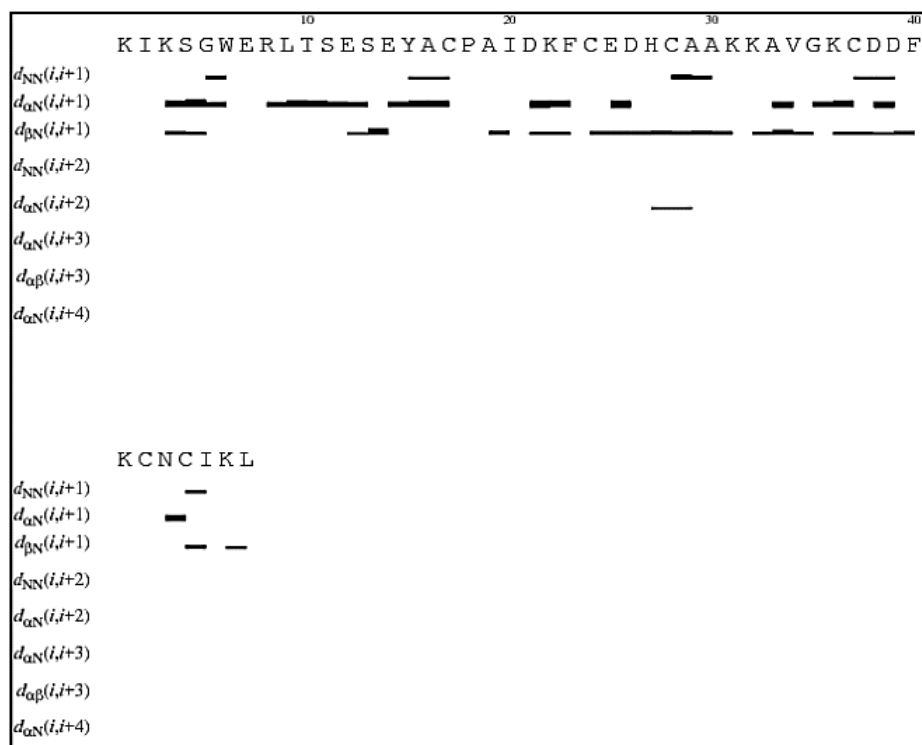


Figura 29. Asignación de las señales NOE en función de la secuencia de aminoácidos. En las filas $d_{NN}(i, i+1)$, $d_{\alpha N}(i, i+1)$ y $d_{\beta N}(i, i+1)$; la altura de las barras es proporcional a la intensidad relativa de la señal NOE. En los siguientes 5 renglones, las barras horizontales marcan la existencia de la señal NOE con las características descritas en la primera columna, entre los protones de los aminoácidos ubicados en los extremos de la barra.

En la figura 29 se presenta la asignación de señales NOE en función de los aminoácidos. En las primeras tres filas la altura de las barras es proporcional a la intensidad de las señales NOE y, por ende, a la distancia espacial. Este análisis cobra una gran importancia debido a que la presencia de hélices alfa se puede reflejar en presentar en el renglón $d_{NN}(i,i+1)$ señales NOE de intensidad relativa mediana o fuerte; al igual que las interacciones a larga distancia $d_{NN}(i,i+2)$

también son evidencia de la presencia de las hélices alfa.

4.3.1 Método del índice de desplazamiento químico

Los resultados obtenidos luego de asignar el índice para cada residuo se muestran en la cuadro 3.

CHEMICAL SHIFT INDEX																				
	K	I	K	S	G	W	E	R	L	T	S	E	S	E	Y	A	C	P	A	I
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1		•							•						•	•	•	•		•
0				•	•							•								
-1			•			•	•	•	•	•	•	•	•	•						•
	D	K	F	C	E	D	H	C	A	A	K	K	A	V	G	K	C	D	D	F
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
1					•						•			•	•	•	•	•		
0		•		•					•			•							•	
-1	•		•			•	•	•	•	•									•	•
	K	C	N	C	I	K	L													
	41	42	43	44	45	46	47													
1							•													
0																				
-1	•	•	•	•	•	•														

Cuadro 3. Índice de desplazamiento químico para cada residuo presente en la secuencia de aminoácidos de la TcoKIK. Se presenta en color azul los aminoácidos involucrados en hojas beta, mientras que en color rosa se presentan los aminoácidos involucrados en hélices alfa. La secuencia de aminoácidos se presenta desde el extremo amino terminal hasta el extremo carboxilo terminal.

El método CSI muestra que existen diferentes elementos de estructura secundaria en la proteína, como lo son hélices alfa y hojas beta. En el cuadro 3 se muestran resaltados en color azul los aminoácidos involucrados en hojas beta y en color rosa los aminoácidos involucrados en hélices alfa, mientras que los residuos que no se encuentran resaltados, se encuentran en zonas no estructuradas. Esta variación en el desplazamiento químico se debe principalmente a que en las hojas beta los protones alfa presentan una alta exposición al solvente, ocasionando un efecto de desprotección y a su vez un mayor desplazamiento químico. Mientras que en las hélices, los protones alfa presentan una menor exposición al solvente, lo cual produce un efecto de protección sobre

éstos desplazándolos a menores partes por millón.

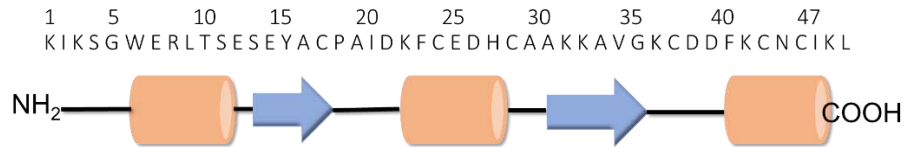


Figura 30. Diagrama representativo de los elementos de estructura secundaria esperados de acuerdo al método CSI para la TcoKIK. Los cilindros rosa representan hélices alfa y las flechas azules hojas beta.

La figura 30 ilustra los elementos de estructura secundaria esperados para la TcoKIK según el método CSI, estos resultados infieren un diferente plegamiento de ésta con respecto a otras proteínas bloqueadoras de canales de potasio, lo cual abre la perspectiva de un nuevo motivo estructural.

8 CONCLUSIONES

- Se obtuvo la proteína recombinante TcoKIK, en el vector pET-32a con un plegamiento definido.
- La cepa *E. coli* Rosetta™ mostró un mayor rendimiento en la producción de proteína de fusión soluble que *E. coli* Rosetta gami™.
- Se encontraron condiciones óptimas para la obtención y purificación de la proteína recombinante TcoKIK.
- Se establecieron parámetros ideales para la digestión enzimática con enteroquinasa, encontrando que el agente caotrópico tritón disminuye el tiempo de corte a 8 horas en relación con las condiciones propuestas para la enzima.
- La toxina TcoKIK interacciona fuertemente con el Tween 20, dificultando su purificación.
- Se realizó la caracterización estructural de la TcoKIK utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF, dicroísmo circular y RMN.
- Se observó una relación de m/z experimental para la molécula protonizada $[M+ H]^+$ de 5277.22 que es congruente para la proteína TcoKIK oxidada con una masa teórica de 5278 Da.
- Mediante la caracterización estructural por dicroísmo circular y el análisis de datos empleando el método SELCON3 en el servidor DichroWeb, fue posible determinar que la proteína recombinante TcoKIK presenta un plegamiento característico, mostrando la presencia de cierto contenido de estructura secundaria.
- Los experimentos de RMN mostraron evidencia de la existencia de plegamiento definido en la estructura de la TcoKIK.
- Es necesario enriquecer la proteína con ^{15}N y ^{13}C con el fin de

obtener experimentos de triple resonancia para obtener una estructura tridimensional con una mayor resolución.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Andreotti, N.; Di Luccio, E.; Sampieri, F.; De Waard, M. . S. Molecular modeling and docking simulations of scorpion toxins and related analogs on human SKCa2 and SKCa3 channels. *Peptides* **26**, 1095–1108 (2005).
2. Diego-García, E. *et al.* The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: Genes, peptides and function. *Toxicon* **45**, 273–283 (2005).
3. Diego-García, E. *et al.* Wide phylogenetic distribution of Scorpine and long-chain β -KTx-like peptides in scorpion venoms: Identification of ‘orphan’ components. *Peptides* **28**, 31–37 (2007).
4. Tytgat, J. *et al.* A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: α -KTx molecular subfamilies. *Trends Pharmacol. Sci.* **20**, 444–447 (1999).
5. Almeida, D. D., Torres, T. M., Barbosa, E. G., Lima, J. P. M. S. & De Freitas Fernandes-Pedrosa, M. Molecular approaches for structural characterization of a new potassium channel blocker from *Tityus stigmurus* venom: cDNA cloning, homology modeling, dynamic simulations and docking. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **430**, 113–118 (2013).
6. Quintero-Hernández, V., Jiménez-Vargas, J. M., Gurrola, G. B., Valdivia, H. H. & Possani, L. D. Scorpion venom components that affect ion-channels function. *Toxicon* **76**, 328–342 (2013).
7. Chippaux, J. P. & Goyffon, M. Epidemiology of scorpionism: A global appraisal. *Acta Trop.* **107**, 71–79 (2008).
8. Caliskan, F. *et al.* Molecular cloning and biochemical characterization of the first Na⁺-channel α -type toxin peptide (Acra4) from *Androctonus crassicauda* scorpion venom. *Biochimie* **95**, 1216–1222 (2013).
9. Karsch, F. Scorpionologische Beitrage. *Mitt. Munch. Ent. Ver* **3**, 97–136 (1879).
10. Possani, L. D., Merino, E., Corona, M., Bolivar, F. & Becerril, B. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. *Biochimie* **82**, 861–868 (2000).
11. Conde, R., Zamudio, F. Z., Rodr, M. H. & Possani, L. D. Scorpine , an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Lett.* **471**, 165–168 (2001).
12. Rodríguez De La Vega, R. C. & Possani, L. D. Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. *Toxicon* **43**, 865–875 (2004).

13. Pucca, M. B. *et al.* Ts8 scorpion toxin inhibits the Kv4.2 channel and produces nociception in vivo. *Toxicon* **119**, 244–252 (2016).
14. Cao, Z. *et al.* Expression, purification and functional characterization of a recombinant scorpion venom peptide BmTXK β . *Peptides* **24**, 187–192 (2003).
15. Rodríguez De La Vega, R. C. & Possani, L. D. Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: Biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon* **46**, 831–844 (2005).
16. Schwartz, E. F. *et al.* Mass spectrometry analysis, amino acid sequence and biological activity of venom components from the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Toxicon* **51**, 1499–1508 (2008).
17. Cerni, F. A. *et al.* Isolation and characterization of Ts19 Fragment II, a new long-chain potassium channel toxin from *Tityus serrulatus* venom. *Peptides* **80**, 9–17 (2016).
18. Notredame C, Higgins DG, H. J. T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* **17**, 302:205 (2000).
19. Maffeo, C.; Bhattacharya; S.; Aksimentiev, A. Modeling and simulation of ion channels. **12**, 6250–6284 (2012).
20. Khabiri, M., Nikouee, A., Cwiklik, L., Grissmer, S. & Ettrich, R. Charybdotoxin unbinding from the mKv1.3 potassium channel: A combined computational and experimental study. *J. Phys. Chem. B* **115**, 11490–11500 (2011).
21. Chen, Z. *et al.* Genomic and Structural Characterization of Kunitz-Type Peptide LmKTT-1a Highlights Diversity and Evolution of Scorpion Potassium Channel Toxins. *PLoS One* **8**, 1–10 (2013).
22. Phillips, M. M. C. and G. N. *Handbook of Proteins: structure, function, and methods.* (2007).
23. 18. Lehninger.Principios.de.Bioquimica.5a.Edicion.pdf.
24. Córdoba, R. H., Algecira, E. A., Poutoi, P. R., Barrera, A. A. *Pichia pastoris* one alternative for human glycoprotein production of therapeutic use fermentation strategies. *Rev. Colomb Biotecnol* **5**, 1–16 (2003).
25. Advances in Preparation of Biological Extracts for Protein Purification. in *Chapter 18*
26. Cao, H., L. R. Quantitative evaluation of His-tag purification and immunoprecipitation of tristetraprolin and its mutant proteins from transfected human cells. *Biotechnol Prog* **25**, 461–467 (2009).
27. Leo.M.L. *Food Analysis by HPLC.*
28. Jimenez. *Biología Celular Y Molecular.* (2003).

29. Cozzone, A. J. Proteins: Fundamental Chemical Properties. *Encycl. life Sci.* (2002).
30. Creighton, T. *Proteins structures and molecular properties.* (1993).
31. Richard M. Caprioli,*Terry B. Farmer, andJocelyn G. Molecular Imaging of Biological Samples: Localization of Peptides and Proteins Using MALDI-TOF MS. *Anal. Chem.* **69**, 4751–4760 (1997).
32. Mlynárik, V. Introduction to nuclear magnetic resonance. *Anal. Biochem.* **529**, 4–9 (2017).
33. Del Río Portilla, F. Análisis estructural de proteínas por resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas. *Educación Química* 14 (2003).
34. Wüthrich, K., Wider, G., Wagner, G., and Braun, W. Sequential resonance assignments as a basis for determination of spatial protein structures by high resolution nuclear magnetic resonance. *J. Mol. Biol* **155**, 311–319 (1982).
35. Del Río Portilla, F. Determinación de la estructura de proteínas por resonancia magnética nuclear. *Mensaje Bioquímico* (2003).
36. Kumar, A., Ernst, R. R. & Wüthrich, K. A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton-proton cross-relaxation networks in biological macromolecules. *Top. Catal.* **95**, 1–6 (1980).
37. Havel, T.F., and Wuthrich, K. A distance geometry program for determining the structures of small proteins and other macromolecules from nuclear magnetic resonance measurements of intramolecular ¹H-¹H proximities in solution. *Bull. Math. Biol* **46**, 673–678. (1984).
38. Freeman, R. & Compounds, H. Chemical Shifts. **31**, 1–21 (1995).
39. <https://web.expasy.org/protparam/>.
40. Kelly S.M., P. N. C. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochim Biophys Acta* 161–185 (1997).
41. Kelly S. M., Jess T. J., P. N. C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta* **1751**, 119 –139 (2005).
42. <http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>.

APÉNDICE

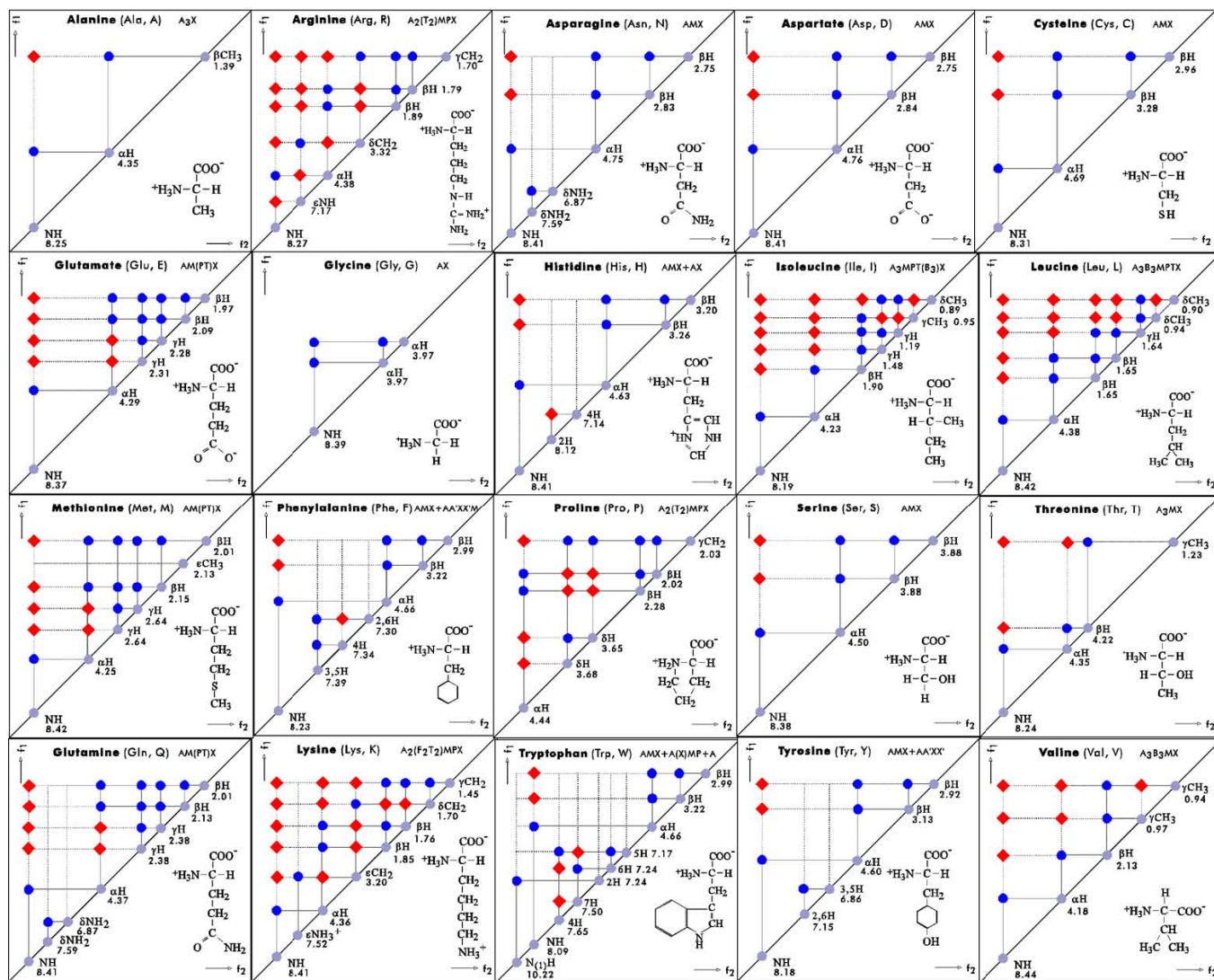
ANEXO 1. Medios de cultivo y disoluciones

MEDIO LURIA BERTANI (LB)	
Tripsina	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	10 g/L
pH	7

AMORTIGUADOR DE LISIS (BL)	
Tris	50.0 Mm
NaCl	300.0 mM
Imidazol	20.0 mM
pH	8.0

AMORTIGUADOR DE CORTE SIN AGENTE CAOTRÓPICO	
Tris	50.0 Mm
CaCl₂	1 mM
pH	8.0

ANEXO 2. Patrones TOCSY y COSY de los aminoácidos más comunes.



ANEXO 3. Valores de referencia de los desplazamientos químicos empleados para el método CSI ³⁸.

Residue	¹ H α ±0.1 ppm	¹³ C α ±0.7 ppm	¹³ C β ±0.7 ppm	¹³ C'±0.5 ppm
Ala	4.4	52.5	19.0	177.1
Cys(red)	4.7	58.8	28.6	174.8
CYS(ox)		58.0	41.8	175.1
Asp	4.8	54.1	40.8	177.2
Glu	4.3	56.7	29.7	176.1
Phe	4.7	57.9	39.3	175.8
Gly	4.0	45.0		173.6
His	4.6	55.8	32.0	175.1
Ile	4.0	62.6	37.5	176.8
Lys	4.4	56.7	32.3	176.5
Leu	4.2	55.7	41.9	177.1
Met	4.5	56.6	32.8	175.5
Asn	4.8	53.6	39.0	175.5
Pro	4.4	62.9	31.7	176.0
Gln	4.4	56.2	30.1	176.3
Arg	4.4	56.3	30.3	176.5
Ser	4.5	58.3	62.7	173.7
Thr	4.4	63.1	68.1	175.2
Val	4.0	63.0	31.7	177.1
Trp	4.7	57.8	28.3	175.8
Tyr	4.6	58.6	38.7	175.7