



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

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

De defensa a riesgo mortal: Conversión y estudio estructural por RMN de la defensina 1 del alacrán *Centruroides limpidus limpidus* en una neurotoxina.

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q. Fátima Carolina Escobedo González

Tutor: Dr. Federico del Río Portilla  
Instituto de Química

Ciudad de México, Mayo 2018



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

De defensa a riesgo mortal: Conversión y estudio estructural por RMN de la defensina 1 del alacrán *Centruroides limpidus limpidus* en una neurotoxina

**T E S I S**  
**PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**Q. FÁTIMA CAROLINA ESCOBEDO GONZÁLEZ**



Ciudad de México,

2018

Jurado Asignado:

PRESIDENTE: Dr. Rogelio Rodríguez Sotres  
VOCAL: Dr. Armando Ariza Castolo  
VOCAL: Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda  
VOCAL: Dra. Alejandra Hernández Santoyo  
SECRETARIO: Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio 1, departamento de Química de Biomacromoléculas, Instituto de Química Universidad Nacional Autónoma de México.

Presentación en congresos

El trabajo fue presentado en la conferencia: 58th Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference March 26-31, 2017 Asilomar Conference Center, Pacific Grove. California; Poster session "NMR Conversion study of a recombinant Scorpion Defensin into a Neurotoxin"

Este Proyecto fue posible gracias al apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT; número de becario 596794) y al apoyo del proyecto PAPIIT IN207516 de la DAGAPA

Agradecimientos especiales

Al Laboratorio Universitario de RMN.

A la Dra. Elisa Carrillo Flores por realizar las pruebas de actividad sobre el canal Kv1.3.

Q. Fátima Carolina Escobedo González

Sustentante

Dr. José Federico del Río Portilla

Asesor

**ÍNDICE**

<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS .....</b>	<b>5</b>
<b>ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS .....</b>	<b>6</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>8</b>
<b>MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>9</b>
• Péptidos y Proteínas .....	9
• Péptidos antimicrobianos .....	12
• Defensinas.....	15
• Neurotoxinas y canales iónicos .....	17
• Teoría de la diada funcional.....	20
• Defensina 1 .....	21
• Determinación estructural de péptidos y proteínas por Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	24
• Índice de desplazamiento químico.....	29
• Cálculos estructurales mediante el programa CYANA.....	31
• Validación estructural.....	34
• Expresión de proteínas recombinantes .....	38
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>40</b>
<b>OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>40</b>
Objetivos Particulares.....	40
<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>41</b>
• Expresión de las PF en una cepa de <i>E. coli</i> .....	41
• Purificación de las proteínas de fusión.....	42
• Reacción de proteólisis enzimática .....	42
• Purificación de los GS- o GM-péptidos mediante Cromatografía líquida de fase reversa	43
• Caracterización mediante espectrometría de masas.....	43
• Espectroscopia de resonancia magnética nuclear .....	44
• Reacción de corte con CNBr.....	44
• Prueba de actividad antibacteriana.....	44
• Prueba de actividad en canales iónicos regulados por voltaje .....	45
<b>RESULTADOS Y ANÁLISIS .....</b>	<b>46</b>
• Expresión y purificación de las PF en una cepa de <i>E. coli</i> .....	46
• Reacción de proteólisis enzimática .....	47
• Purificación de los GS- o GM-péptidos por Cromatografía líquida de fase reversa .....	48
• Caracterización mediante espectrometría de masas.....	49
• Espectroscopia de resonancia magnética nuclear .....	50
• Reacción de corte con CNBr.....	62
• Prueba de actividad antibacteriana y en canales iónicos regulados por voltaje.....	63
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>68</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>69</b>
<b>ANEXO I. ESTRUCTURA TERCIARIA DE LA DEF1 .....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXO II. ESPECTROS TOCSY Y NOESY DE LOS PÉPTIDOS CARACTERIZADOS .....</b>	<b>72</b>
<b>ANEXO III. SISTEMAS DE ESPÍN DE LOS AMINOÁCIDOS .....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO IV. VALORES REFERENCIA EMPLEADOS EN EL ÍNDICE DE DESPLAZAMIENTO QUÍMICO...77</b>	
<b>ANEXO V. GRÁFICOS DE RAMACHANDRAN Y DE INTERACCIONES NOE.....</b>	<b>78</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de una cadena peptídica.....	9
<b>Figura 2.</b> Estructura secundaria de una proteína.....	11
<b>Figura 3.</b> Interacción de péptidos antimicrobianos con la membrana celular.....	13
<b>Figura 4.</b> Estructuras de las cinco subfamilias de defensinas.....	15
<b>Figura 5.</b> Estructura terciaria del canal KV1.3.....	18
<b>Figura 7.</b> Estructura primaria de la Def1. Se resaltan en colores la conectividad entre cisteínas.....	22
<b>Figura 8.</b> Estructura de baja resolución de la Def1.....	22
<b>Figura 9.</b> Estructura terciaria M2D1.....	23
<b>Figura 10.</b> Estructura preliminar de la M3D1.....	24
<b>Figura 11.</b> Alineamiento secuencial de Def1 y sus mutantes.....	24
<b>Figura 13.</b> Sistemas de espín de algunos aminoácidos.....	27
<b>Figura 14.</b> Esquema de interacción NOE [39].....	29
<b>Figura 15.</b> Gráfico de Ramachandran.....	37
<b>Figura 16.</b> Diseño de la proteína de fusión.....	41
<b>Figura 17.</b> Purificación mediante cromatografía de afinidad a Ni <sup>2+</sup> de la PF-M1D1.....	46
<b>Figura 18.</b> Reacción de corte de la PF-M1D1 con la proteasa trombina.....	47
<b>Figura 19.</b> Purificación de los péptidos cromatografía de fase reversa.....	48
<b>Tabla 3.</b> Masa teórica y experimental.....	49
<b>Figura 20.</b> Espectros unidimensional <sup>1</sup> H RMN.....	51
<b>Figura 21.</b> Comparación de espectros <sup>1</sup> H RMN.....	52
<b>Figura 23.</b> Espectro NOESY de la GS-M1D1.....	55
<b>Figura 24.</b> Gráfico de Ramachandran de la GS-M1D1.....	56
<b>Figura 25.</b> Estructura obtenida mediante el programa CYANA para la GS-M1D1.....	58
<b>Figura 26.</b> Interacciones de las señales NOEs presentes en la estructura de la GS-M1D1.....	59
<b>Figura 27.</b> Cantidad y tipo de restricciones de distancia del modelo estructural de la GS-M1D1.....	60
<b>Figura 28.</b> Estructuras de menor energía obtenidas después del afinamiento con AMBER.....	61
<b>Figura 29.</b> Sobreposición de las estructuras secundarias de la GS-D1,GS-M1D1,GM-M2D1 y GM-M3D1.....	61
<b>Figura 31.</b> Purificación de la reacción de corte con CNBr.....	63
<b>Figura 32.</b> Actividad de los péptidos GS-DEF1 y GS-M1D1 frente al canal KV1.3.....	64
<b>Figura 33.</b> Influencia de los residuos GS- y GM- en la actividad de la M1D1.....	65
<b>Figura 34.</b> Comparación de la actividad de los péptidos GM-M1D1 GM-M2D1 y GM-M3D1.....	65
<b>Figura 35.</b> Gráficas de actividad frente al canal Kv1.3.....	66
<b>Figura 36.</b> Curva de relación dosis respuesta del péptido M3D1 sobre el canal Kv1.3.....	67

## Abreviaturas, Acrónimos y Símbolos

<sup>1</sup> H	Hidrógeno
<sup>1</sup> H $\alpha$	Hidrógeno en posición alfa
<sup>1</sup> H $\beta$	Hidrógeno en posición beta
<sup>1</sup> HN	Hidrógeno de amida
ACN	Acetonitrilo
AmPs	Péptidos antimicrobianos (Antimicrobial peptides)
B <sub>0</sub>	Intensidad del campo magnético.
BMRB	Banco de Datos de Resonancia Magnética Biológica (Biological Magnetic Resonance Bank)
CAMQ	Cromatografía de afinidad metal quelato
Cil-dlp	<i>Centruroides limpidus limpidus</i> defensin-like peptide (péptido tipo defensina)
CNBr	Bromuro de cianógeno
CS- $\alpha/\beta$	motivo alfa/beta estabilizado por cisteínas (Cysteine stabilized alpha/beta motif)
CSI	índice de desplazamiento químico (Chemical Shift Index)
COSY	Espectroscopia de correlación (CORrelated SpectroscopY)
$\delta$	Desplazamiento químico
Def1	Defensina1
DPFGSE	Double Pulsed Field Gradient Spin Echo
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
$\gamma$	Constante giromagnética
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
kDa	Kilo Dalton; Da = 1g/mol
KTx	Toxina bloqueadora de canales iónicos de potasio.
LB	Luria Bertani
M1D1	Mutante Y20K de la defensina1
M2D1	Doble mutante Y20K, Q32Y de la defensina 1
M3D1	Mutante Y20K, Q32Y, DIQY 24-26 de la defensina 1
MALDI-TOF	desorción/ionización láser asistida por matriz- tiempo de vuelo (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time of Flight)
MHz	Mega Hertz
NOE	Efecto nuclear Overhauser (Nuclear Overhauser Effect)
NOESY	Espectroscopía de mejoramiento nuclear Overhauser (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy)
PDB	Banco de Datos de Proteínas (Protein Data Bank)
ppm	partes por millón
PF	Proteína de fusión
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMSD	Desviación del valor cuadrático medio (Root Mean Square Deviation)
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
TFA	Ácido trifluoroacético (Trifluoroacetic acid)
TOCSY	Espectroscopía de correlación total (Total Correlated Spectroscopy)
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano.

## Composición de las disoluciones empleadas

Las disoluciones utilizadas en este trabajo para los procesos de producción y purificación son:

Medio Luria Bertani (LB): 10 g/L Tripsina, 5 g/L Extracto de levadura, 10 g/L NaCl, pH 7.0

Disolución A: 50 mM Tris, 300 mM NaCl, 4M urea pH 8.0

Disolución B: 50 mM Tris, 300 mM NaCl, 2M urea pH 8.0

Disolución C: 50 mM Tris, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol, 2 M urea

Disolución D: 50 mM Tris, 300mM NaCl pH 8.0

Disolución E: 50 mM Tris, 300mM NaCl, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub> pH 8.0

Disolución F: 50 mM Tris, 300 mM NaCl, 50 mM imidazol

Disolución ND96: 96 mM NaCl, KCl<sub>2</sub> mM, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, pH 7.5

## Resumen

Las defensinas son péptidos antimicrobianos de bajo peso molecular presentes en el sistema inmune de animales y plantas. Las de insecto se caracterizan, estructuralmente hablando, por tener un plegamiento compuesto por una hélice  $\alpha$  y una hoja  $\beta$  estabilizado por tres enlaces disulfuro (CS- $\alpha/\beta$ ). Este mismo motivo estructural se ha observado también en toxinas bloqueadoras de canales de potasio presentes en el veneno de alacranes. Las similitudes estructurales y de secuencia primaria sugieren una relación filogenética entre defensinas y toxinas de alacrán. Dicha relación se puede corroborar mediante la realización de cambios específicos sobre la estructura primaria de una defensina, obteniendo así nuevas moléculas con posible actividad tipo toxina bloqueadora de canales de potasio.

El presente trabajo presenta la conversión mediante ingeniería genética, de la defensina 1 (Def1) en una neurotoxina (M3D1). Para lograr este objetivo se trabajó en la optimización de los procesos de producción y purificación de cinco péptidos: GS-Def1, GS-M1D1, GM-M1D1, GM-M2D1 y GM-M3D1. Logrando incrementar los rendimientos finales de ellos hasta en un factor de 6, comparado con los descritos en trabajos previos. Al obtener todos los péptidos en cantidades suficientes, se mejoró la caracterización estructural de los péptidos GS-Def1 y GM-M3D1.

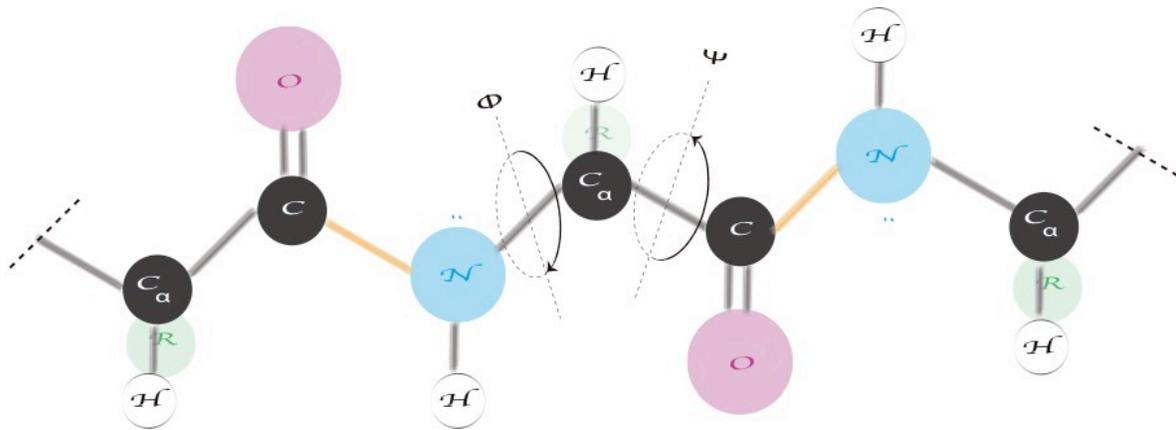
Comparando las estructuras de todos los péptidos se comprobó que las modificaciones en la estructura primaria no afectan la conservación del motivo estructural CS- $\alpha/\beta$ . En contraste, la evaluación electrofisiológica de los péptidos muestra que se indujo un cambio en la actividad biológica de estas moléculas frente al canal Kv1.3. Las pruebas muestran que las mutaciones aumentan 588% la actividad de bloqueo sobre el canal de potasio Kv1.3, donde destaca la  $IC_{50}$  para la M3D1 con un valor de 20  $\mu$ M.

De este modo se corroboró la estrecha relación estructural defensina-toxina, y el nexo filogenético que existe entre la defensina 1 y su versión mutante con actividad de toxina bloqueadora de canales de potasio.

## Marco Teórico

### • Péptidos y Proteínas

Los péptidos y proteínas son las macromoléculas biológicas más abundantes y diversas. Están conformados por aminoácidos unidos covalentemente mediante enlaces peptídicos. El enlace peptídico se genera mediante la unión del grupo carbonilo de un aminoácido y el nitrógeno del grupo amino de otro, este enlace posee un carácter intermedio entre un enlace simple y uno doble, lo cual impide la rotación libre del grupo amida (C-N). Sin embargo, los enlaces de los carbonos alfa ( $C_{\alpha}$ -C=O y N- $C_{\alpha}$ ) son sencillos permitiendo el movimiento a través de los ángulos de rotación  $\Psi$  y  $\Phi$  respectivamente, como se observa en la figura1[1].



**Figura 1.** Esquema de una cadena peptídica[2]. Representación de la cadena principal en péptidos y proteínas, se resaltan de color naranja los enlaces peptídicos y se señalan enlaces ( $C_{\alpha}$ -C=O y N- $C_{\alpha}$ ) que originan los ángulos de rotación  $\Phi$  y  $\Psi$ .

Las proteínas desempeñan un papel fundamental para la vida ya que de su presencia y actividad dependen todos los procesos biológicos. Entre sus funciones destacan la estructural, como en el caso del colágeno y la queratina; la reguladora de actividad celular, función que efectúan las hormonas; de transporte como la que cumple la hemoglobina; de defensa natural, un ejemplo representativo son los anticuerpos; y como catalizadores biológicos, por ejemplo, la actividad observada en enzimas como la pepsina[3]. Las funciones de las proteínas en general son muy diversas, estas funciones dependen tanto de los aminoácidos que las constituyen como del ordenamiento y la conformación espacial que adoptan

(plegamiento). Las conformaciones de una proteína dependen de la suma de interacciones covalentes, hidrofóbicas, electrostáticas y de puentes de hidrógeno entre los átomos que la constituyen, además de su interacción con otras moléculas.

Cada proteína puede estudiarse a partir de cuatro niveles estructurales :

La estructura primaria se refiere al número e identidad de aminoácidos que componen la cadena peptídica, así como al orden de estos en la secuencia lineal. Por lo tanto, las características de la proteína dependerán del tipo de aminoácidos que la conformen.

La estructura secundaria se refiere a la disposición espacial definida que algunos fragmentos locales de la cadena peptídica pueden adoptar. Estas conformaciones se estabilizan mediante interacciones interatómicas, tanto repulsivas como atractivas, un ejemplo de estas últimas son los puentes de hidrógeno. La estructura secundaria de un péptido puede describirse como una función de los ángulos diedros de los átomos de la cadena principal. Se ha observado estadísticamente que cada aminoácido tiene ciertas preferencias para formar algún tipo de estructura secundaria, las cuales parecen estar dictadas por factores estructurales tales como el impedimento estérico y la repulsión de cargas [4], por lo que la presencia de la estructura secundaria depende directamente de la estructura primaria, ya que ciertas combinaciones de aminoácidos favorecen o dificultan la formación de estos motivos estructurales.

Algunos ejemplos más comunes de este nivel estructural son las hélices alfa y hebras beta, las cuales se pueden describirse de la siguiente manera.

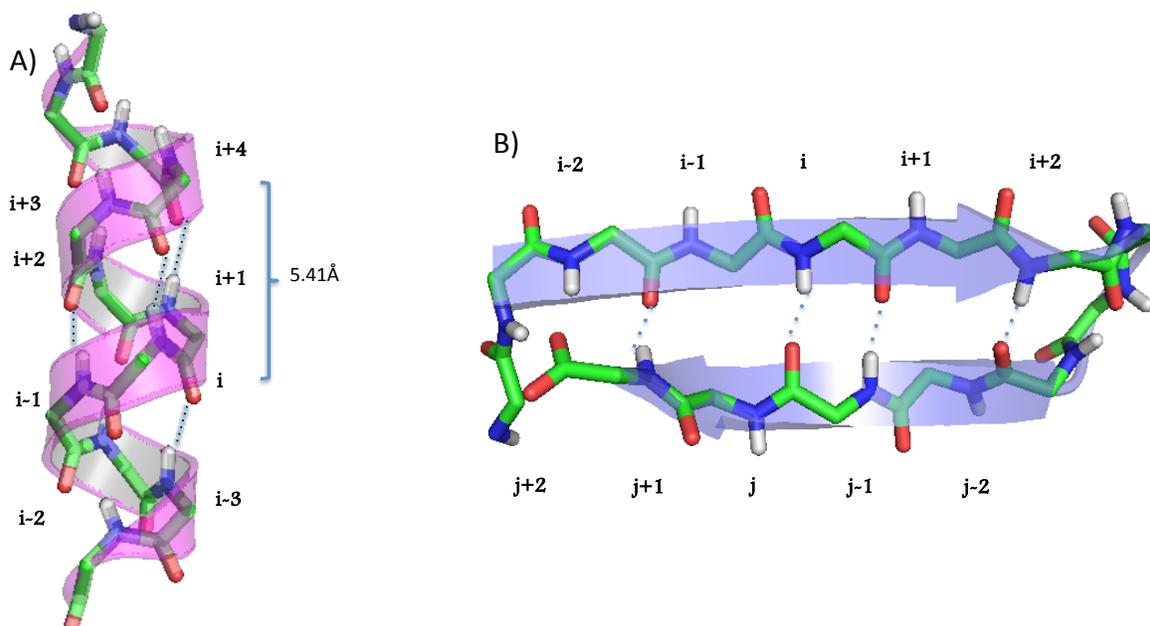
### Hélice alfa

La hélice alfa tiene 3.6 residuos por giro y una translación por residuo de 1.5 Å resultando en una translación de 5.41 Å por giro, con ángulos de torsión  $\Phi$   $-57^\circ$  y  $\Psi$   $-47^\circ$  favorables para la mayoría de los residuos. En este tipo de estructura los átomos de la cadena principal se encuentran cercanos provocando interacciones tipo puente de hidrógeno entre el oxígeno del grupo carbonilo de cada residuo (i)

con el HN del aminoácido ( $i+4$ ) de la cadena principal, la distancia del oxígeno al nitrógeno mide 2.86 Å. Algunos aminoácidos como la metionina, alanina, leucina, glutamina y leucina promueven la formación de esta estructura secundaria [4] (Figura 2 A) .

### Hoja beta

Otra estructura secundaria muy común son las hojas  $\beta$ , las cuales se encuentran conformadas por hebras  $\beta$ . Son consideradas un tipo especial de hélice con 2.0 residuos por giro y una translación de 3.4 Å por residuo. Esta conformación sólo es estable cuando las hebras forman la estructura conocida como hoja beta, es decir, cuando se encuentra interaccionando mediante puentes de hidrógeno con otra hebra adyacente que se encuentre paralela o antiparalela a la primera. Por lo general, las hojas betas formadas por hebras antiparalelas son más estables que las paralelas. Los ángulos de torsión en una hoja  $\beta$  antiparalela son:  $\Phi -139^\circ$   $\Psi +135^\circ$  [1]. La presencia de aminoácidos como treonina, isoleucina, valina, fenilalanina, tirosina y triptófano promueven la formación de hebras beta (Figura 2 B).



**Figura 2.** Estructura secundaria de una proteína. En línea interrumpida se señalan las interacciones por puentes de hidrógeno que estabilizan las estructuras; A) hélice  $\alpha$ , y B) hoja  $\beta$  antiparalela.

El tercer nivel estructural de las proteínas hace referencia a la disposición tridimensional global del conjunto de estructuras secundarias ya que en una misma molécula pueden encontrarse distintos tipos de estructura secundaria. La estructura terciaria también incluye las cadenas laterales hidrofóbicas o hidrofílicas de la proteína, así como de las fuerzas de atracción o repulsión electrostática, puentes salinos y enlaces disulfuro.

El último nivel estructural es la estructura cuaternaria se presenta en proteínas oligoméricas formadas por más de una cadena polipeptídica y es la disposición espacial de las subunidades individuales que constituyen a estas moléculas compuestas.

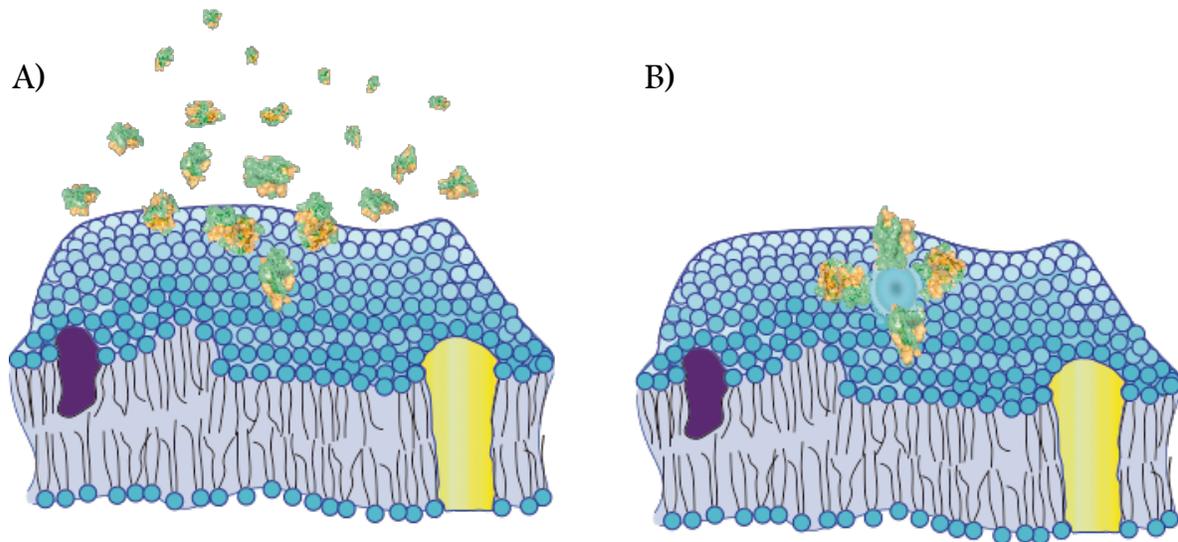
- **Péptidos antimicrobianos**

Los péptidos antimicrobianos (AmPs; por sus siglas en inglés) son polipéptidos generalmente catiónicos constituidos por menos de 100 aminoácidos, presentan carga neta positiva entre +2 y +9 debido principalmente a su alto contenido de arginina y lisina. Cerca del 30% de sus residuos son de carácter hidrofóbico y están dispuestos en el núcleo de la estructura de modo que el péptido adopta una estructura anfipática. Estos forman parte esencial del sistema inmune de una amplia gama de especies entre los que se encuentran artrópodos, anfibios, insectos, plantas y mamíferos [5], [6]. Su gran distribución en los reinos animal y vegetal sugiere que estos péptidos han desempeñado un papel fundamental en la adaptación de los organismos multicelulares complejos a los diferentes entornos a los que se ven expuestos y, por tanto, en la evolución de las especies [7].

Los AmPs presentan un amplio espectro de actividad antiviral, antifúngica y antibacteriana. Debido a su actividad y su bajo potencial para inducir resistencia en microorganismos, se han considerado, en las últimas décadas, como una importante alternativa para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos y antitumorales para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por bacterias con resistencia a múltiples fármacos [8], [9].

El mecanismo de acción de los AmPs no se conoce exactamente. En general, se

propone que actúan específicamente sobre la membrana de los microorganismos, principalmente bacterias, mediante la interacción electrostática del péptido con las membranas de los agentes patógenos ocasionando alteraciones de la estructura membranal, formando poros que causan fugas en la célula aumentando su permeabilidad (Figura 3). Esto provoca un efecto en cascada que inicia con la despolarización de la membrana, posteriormente al agotamiento de ATP y la inhibición de la respiración, ocasionando la muerte celular [7], [10], [11].



**Figura 3.** Interacción de péptidos antimicrobianos con la membrana celular[2]. A) Etapa inicial compartida por los diversos modelos de acción propuestos para péptidos antimicrobianos, doónde se observa la interacción con la membrana celular. B) Inducción de la formación de un poro en la membrana celular por acción de péptidos antimicrobianos.

Las teorías sugieren que la alta especificidad de estos péptidos contra microbios se debe a que las membranas bacterianas están organizadas de tal forma que el extremo exterior de la bicapa lipídica, está muy poblada por lípidos con grupos fosfolípidicos cargados negativamente. Por ejemplo, las bacterias Gram-negativo poseen dos membranas lipídicas entre las que se localiza una fina pared celular de peptidoglicano, la membrana externa está compuesta de lipopolisacáridos (LPS), que se mantiene unida por los iones magnesio y calcio uniendo los fosfoazúcares cargados negativamente. La adición de péptidos catiónicos a dichas membranas produce el desplazamiento del metal, dañando la membrana externa [7]. Por el contrario, la parte exterior de las membranas de plantas y animales está

compuesta principalmente por lípidos sin carga neta lo que dificulta la interacción con estas moléculas cargadas positivamente trayendo como consecuencia la alta especificidad de acción de estas moléculas peptídicas contra microorganismos. Estos péptidos se han clasificado en 4 grupos con base en su composición de aminoácidos y estructura [8],[9]:

El primer grupo contiene péptidos antimicrobianos aniónicos; son péptidos muy pequeños, con una masa molecular entre 721.6 - 823.8 Da. Estos péptidos requieren zinc como cofactor para la actividad antimicrobiana y son activos contra bacterias Gram-positivo y Gram-negativo. Ejemplo de este grupo es la dermidina de los humanos.

El segundo grupo está constituido por péptidos catiónicos, conformados por aproximadamente 40 aminoácidos (4 kDa) sin cisteína(s). En solución acuosa muchos de estos péptidos no tienen estructura definida, pero la molécula entera o una parte de ésta adopta estructura de hélice  $\alpha$  en presencia SDS o lípidos.

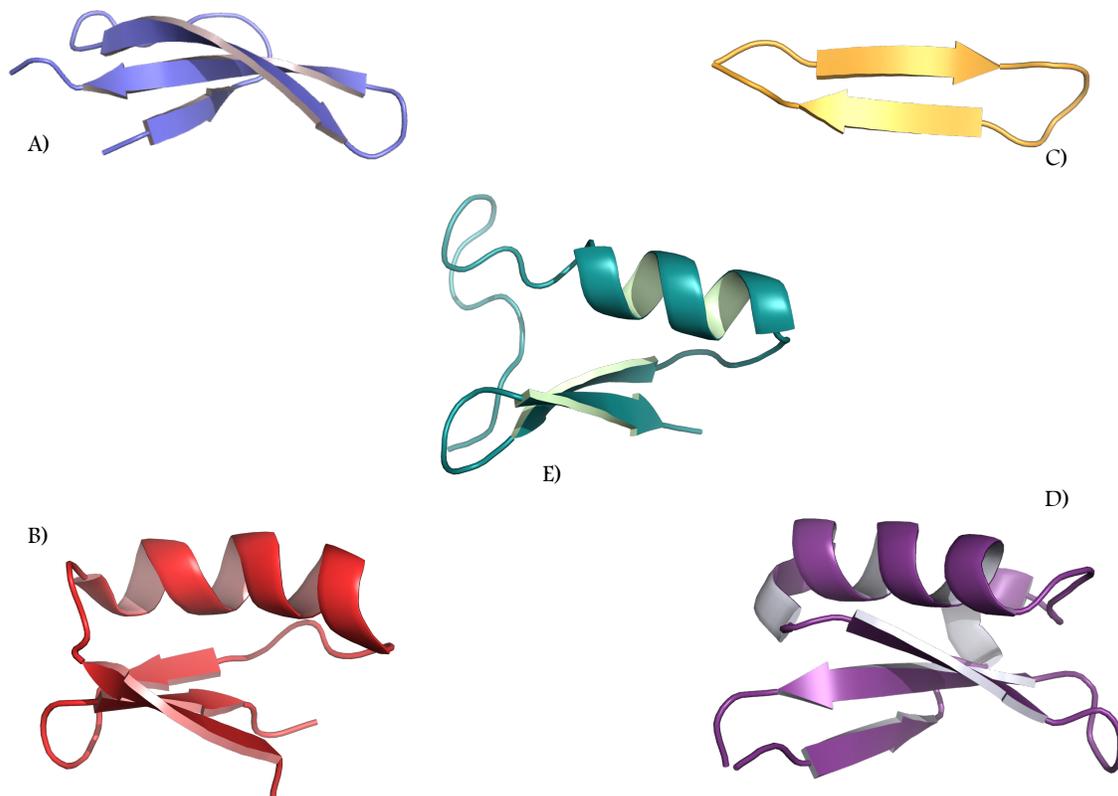
El tercer grupo está formado por péptidos catiónicos ricos en ciertos aminoácidos. Estos péptidos carecen de residuos de cisteína y son lineales. Integrantes representativos de este grupo son las bactericinas (ricos en residuos de prolina y arginina) y las histatinas (ricos en histidina).

El cuarto y último grupo está formado por péptidos catiónicos que contienen residuos de cisteína y se encuentran estabilizados por enlaces disulfuro; su estructura es rica en hebras  $\beta$ . A este grupo pertenecen las protegrinas y defensinas [12].

De los AmPs más importantes que se han identificado en seres humanos y otros mamíferos son las defensinas, las catelicidinas y las histatinas. Sin embargo, las defensinas se encuentran en una mayor diversidad de organismos.

- Defensinas

La de las defensinas es la familia de AmPs más ampliamente distribuida en la naturaleza. Estas forman parte del sistema inmune de plantas, hongos, reptiles, insectos y mamíferos, incluyendo los seres humanos [13]. Su nombre se debe precisamente al papel que desempeñan en la defensa del huésped contra infecciones microbianas. En general, las defensinas son pequeños péptidos catiónicos, ricos en cisteínas y estabilizados mediante enlaces disulfuro, lo cual contribuye a su resistencia a la proteólisis o desnaturalización [14]. Dentro de la familia de defensinas se distinguen cinco subfamilias :  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\theta$ -, -vegetales y defensinas de insecto (Figura 4). Todas se caracterizan por tener un plegamiento rico en hojas beta [13],



**Figura 4.** Estructuras de las cinco subfamilias de defensinas a)  $\alpha$ - b)  $\beta$ - c)  $\theta$ - d) -vegetales e) defensinas de insecto. Todas comparten un plegamiento rico en hojas beta.

Las  $\alpha$ -defensinas se encuentran en mamíferos, incluyendo seres humanos. Son péptidos pequeños de 29-35 residuos, contienen seis cisteínas

distribuidas en la secuencia con el siguiente patrón general: C-X<sub>1</sub>-C-X<sub>3-4</sub>-C-X<sub>9</sub>-C-X<sub>6-10</sub>-C-C donde X representa cualquier residuo diferente de cisteína y el subíndice la cantidad de residuos entre cisteínas. La conectividad entre las unidades de cisteínas es: Cys1-Cys6, Cys2-Cys4 y Cys3-Cys5 según el orden de aparición en la secuencia primaria. Se expresan principalmente en leucocitos, granulocitos, ciertos linfocitos o por células intestinales de Paneth [15]. Estudios recientes sugieren que esta subfamilia de defensinas contribuyen al combate contra la infección por el VIH [16]. Su plegamiento consisten en una hoja  $\beta$  de triple hebra [14].

Las  $\beta$ -defensinas se encuentran de igual manera que la subfamilia  $\alpha$  - en mamíferos; sin embargo, difieren entre sí en la longitud de los segmentos de aminoácidos entre los residuos de cisteínas, presentando el patrón C-X<sub>4-8</sub>-C-X<sub>3-5</sub>-C-X<sub>9-13</sub>-C-X<sub>4-7</sub>-C-, la conectividad entre ellas es Cys1-Cys5, Cys2-Cys4, Cys3-Cys6, particularmente, presentan una carga neta ligeramente más positiva [10]. Se han encontrado en células epiteliales y tiene una potente actividad contra las bacterias Gram-negativo y la levadura del género *Cándida*[17]. El plegamiento de esta subfamilia se caracteriza por una hélice alfa en el extremo N-terminal seguida de una hoja  $\beta$  de triple hebra.

Las  $\theta$ -defensinas son péptidos cíclicos de 18 residuos identificadas en leucocitos del mono Rhesus (*Macaca mulatta*). Se piensa que se generan por empalme y ciclación a partir de dos de los segmentos de nueve aminoácidos de péptidos precursores de tipo  $\alpha$ -defensina [5, 7]. Exhiben actividad antibacteriana, antifúngica y antivirales contra el herpes e inactivan las esporas de ántrax en la etapa de germinación [18]. Su estructura cíclica está constituida por dos hebras beta antiparalelas estabilizadas mediante tres enlaces disulfuro.

Las defensinas de plantas e insectos difieren de las defensinas de vertebrados debido a que éstas pueden contener seis o más residuos de cisteínas. Las defensinas vegetales se encuentran en todo el reino vegetal y en hongos, están constituidas de 45-55 residuos. Su gama de actividad biológica es amplia actuando como agentes antifúngicos, antibacterianos e inhibidores de enzimas.

Tienen de 6 a 8 cisteínas que participan en hasta cuatro enlaces disulfuro cuya conectividad es Cys1-Cys8, Cys2-Cys5, Cys3-Cys7, Cys4-Cys6; los cuales estabilizan la estructura tridimensional constituida por una hélice alfa y un hoja beta de triple hebra [19], [20].

Las defensinas de insecto y artrópodos se encuentran principalmente en su hemolinfa, pueden secretarse en respuesta a lesiones o infecciones bacterianas; presentan un motivo estructural formado por un asa en el extremo N terminal seguida de una hélice alfa y una hoja beta antiparalela unidas mediante 3 enlaces disulfuro asociados con la siguiente secuencia: ...C...CX<sub>3</sub>-C-...Gly-X-C-...-C-X-C, observándose las conectividades Cys1-Cys4, Cys2-Cys5 y Cys3-Cys6 [21]. Esta organización tridimensional CS- $\alpha/\beta$  es también común con las neurotoxinas de alacrán [22]. Dicha observación apoya la hipótesis de un origen común entre las defensinas y las toxinas bloqueadoras de canales iónicos.

- **Neurotoxinas y canales iónicos**

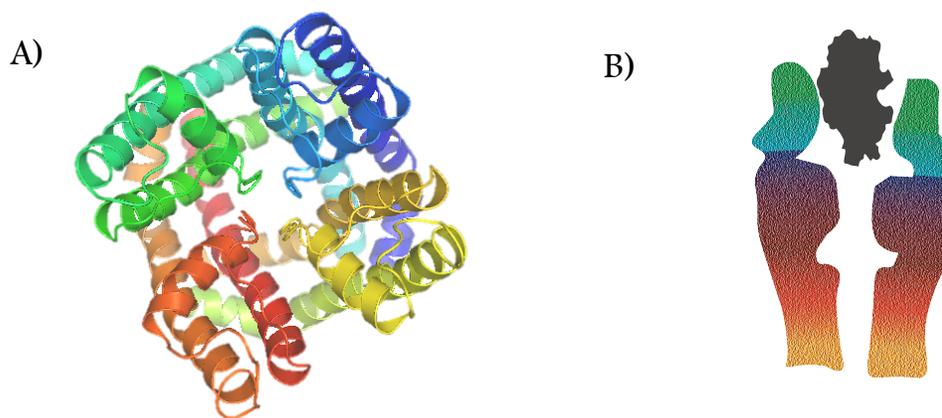
Los venenos de escorpión son una mezcla compleja de una gran diversidad de sustancias entre las que se encuentran sales inorgánicas, aminoácidos libres, componentes heterocíclicos, péptidos y proteínas [23]. Los péptidos y proteínas neurotóxicas que se encuentran en el venenos del escorpión pueden afectar algunas veces de manera letal a los organismos que entran en contacto con ellas, debido a que actúan modulando la permeabilidad de diferentes tipos de canales iónicos de las células, afectando así la generación de señales eléctricas para la comunicación de las células nerviosas [23], [24]. Las neurotoxinas pueden clasificarse de acuerdo al canal iónico al cual afectan ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$ ) [25].

Los canales iónicos son complejos multiprotéicos transmembranales conformados por unidades de homo o heterotetrámeros (Figura 5 A), mediante los cuales se permite y regula específicamente el paso de iones o moléculas de agua hacia el interior o exterior de la célula. De esta manera, regulan las señales eléctricas en la célula, que a su vez controlan la contracción de los

músculos, la secreción de hormonas, la sensación del entorno, la influencia en el metabolismo intracelular, la transducción de señales, la expresión génica y la síntesis de proteínas [26].

Los canales iónicos de potasio se subdividen en: canales de potasio regulados por voltaje (Kv), canales de potasio activado por calcio (KCa), canales de potasio rectificantes (Kir) y canales de potasio de dos poros (K2P) [27]. Concretamente, los canales de potasio regulados por voltaje se clasifican en 12 subfamilias en función de su homología en secuencia de aminoácidos [26].

Las toxinas de escorpión pueden inhibir la conducción iónica a través de alguno de los tipos de canales de potasio al interactuar de manera muy específica con el vestíbulo, que es la vía de entrada extracelular al canal (Figura 5B). El bloqueo del poro por la toxina impide que el ion entre en la cavidad. La interacción toxina-canal depende de varios factores como son el tamaño de la toxina para entrar adecuadamente en el vestíbulo, y de la calidad y cantidad de interacciones, es decir de la afinidad de la toxina con el canal [28].



**Figura 5.** Estructura terciaria del canal KV1.3. A) estructura terciaria del canal Kv1.3 B) representación del bloqueo del poro del canal por una toxina KTx.

En general, las toxinas específicas para los canales de potasio (KTx) contienen aproximadamente 22-64 residuos de aminoácidos, pueden presentar diferentes motivos estructurales; los cuales usualmente se encuentran estabilizados por 2-4 enlaces disulfuro. Dentro de éstas pueden distinguirse cuatro familias:  $\alpha$ -KTx,  $\beta$ -KTx,  $\gamma$ -KTx y  $\kappa$ -KTx, las cuales interactúan con

diferentes tipos de canales de potasio, incluidos los canales Kv dependientes de voltaje (como Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3 etc.).

Las  $\alpha$ -KTx es la familia más grande y está conformada por 18 subfamilias. Los péptidos pertenecientes a esta familia contienen de 23 a 43 aminoácidos cuya estructura terciaria está conformada por una hélice alfa y una hoja beta (estructura similar a las defensinas de insecto) estabilizadas entre si mediante 2 a 4 enlaces disulfuro. En este caso, la conectividad de cisteínas encontrada es Cys1-Cys4, Cys2-Cys5 y Cys3-Cys6 cumpliéndose para dos enlaces que Cys(i) – Cys(j) y Cys(i+4) – Cys(j+2) siendo i y j el lugar de dicha cisteína en la secuencia primaria.

La familia de  $\beta$ -KTx está conformada por péptidos de aproximadamente 60 aminoácidos, son conocidas también como toxinas “de cadena larga”. Sin embargo, no se cuenta con suficiente información experimental de su estructura terciaria.

Las  $\gamma$ -KTx son toxinas bloqueadoras del canal de potasio Kv11.1 el cual tiene importante relevancia en la actividad eléctrica del corazón. Se componen de 36 a 47 aminoácidos con la presencia de 3 ó 4 enlaces disulfuro, adoptando el motivo estructural CS- $\alpha/\beta$ .

Las toxinas pertenecientes a la familia  $\kappa$ -KTx muestran una estructura terciaria conformada por dos hélices alfa estabilizada por 2 enlaces disulfuro, motivo estructural conocido como CS- $\alpha/\alpha$ . Estas toxinas presentan pobre actividad como bloqueadoras de canales iónicos de potasio y su conectividad entre cisteínas es Cys1-Cys4 y Cys2-Cys3.

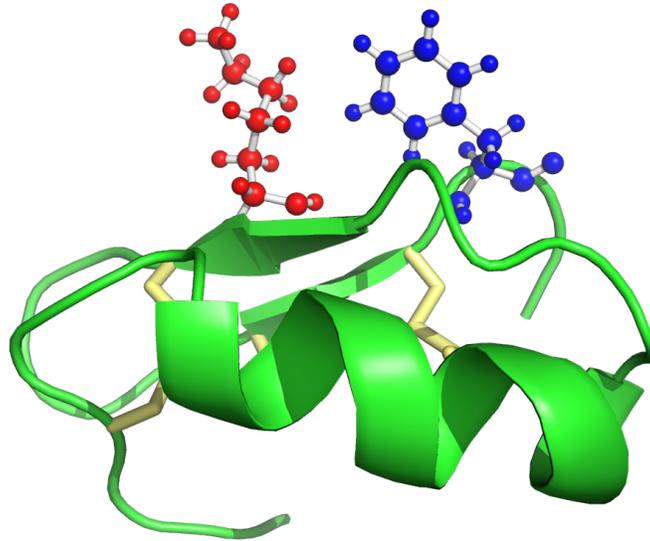
De manera interesante, las toxinas que afectan específicamente al canal Kv1.3 presentan un motivo estructural que consiste en una hélice  $\alpha$  y una hoja  $\beta$  de dos o tres hebras (CS- $\alpha/\beta$ ) [29], motivo estructural compartido, como se mencionó antes, con algunas defensinas [30], [31]. Al realizar un alineación de la estructura primaria de diversas toxinas específicas a los canales Kv, varios autores han identificado la conservación de algunos residuos específicos de los cuales, se propone, depende la interacción con el canal y, por tanto, son

los que guían la actividad biológica [31], [32]. Esta teoría es conocida como la teoría de la diada funcional.

- **Teoría de la diada funcional**

Esta teoría fue propuesta por primera vez por *Dauplais et al.*, en 1997 en la cual se asocian las propiedades funcionales de las toxinas con unos pocos residuos importantes (diada funcional). Dicha propuesta se basa en los procesos de reconocimiento proteína-proteína en los cuales se ha demostrado que son una pequeña proporción de los residuos los que forman las áreas de contacto en los complejos, ejemplo de esto es el caso de las enzimas, cuya actividad depende principalmente de algunos residuos que son esenciales para la catálisis [33].

En toxinas, la diada funcional se compone de un residuo de Lys combinado con un residuo aromático (típicamente Tyr o Phe) o un alifático (Leu) que se encuentran a una distancia de 6 a 7 Å entre sí, distancia medida entre los carbonos alfa [32], [34],[35]. Se cree que el residuo básico ingresa gracias a su cadena lateral en el poro del canal iónico, colocándose en el centro de un anillo compuesto por los grupos carbonilo de cuatro residuos ácidos equivalentes (Asp o Glu), cada uno perteneciente a una de las cuatro subunidades que forman un canal de  $K^+$  [36]–[38]. El residuo aromático o alifático de la diada funcional interactúa mediante fuerzas hidrofóbicas con un grupo de residuos aromáticos (Tyr y Trp), generalmente pertenecientes a una subunidad  $\alpha$  del canal de  $K^+$ , logrando con esto un incremento en la afinidad de la toxina por el canal. La diada funcional se ha encontrado en toxinas aisladas de anémonas de mar y venenos de escorpión. En las toxinas provenientes del veneno de escorpión se ha identificado que la diada funcional se localiza generalmente en la estructura de la hoja  $\beta$  [31]. (Figura 6)



**Figura 6.** Estructura terciaria de la toxina Pi1 del alacrán *pandinus imperator* PDB: 2PTA. En está figura se encuentran resaltados los aminoácidos que conforman la diadaa funcional.

El descubrimiento reciente de una defensina de planta que exhibe la capacidad como toxina bloqueadora de canales de potasio, así como el motivo estructural conservado entre defensinas y toxinas sugiere nuevamente que estas dos moléculas podrían tener un nexo filogenético entre sí [39].

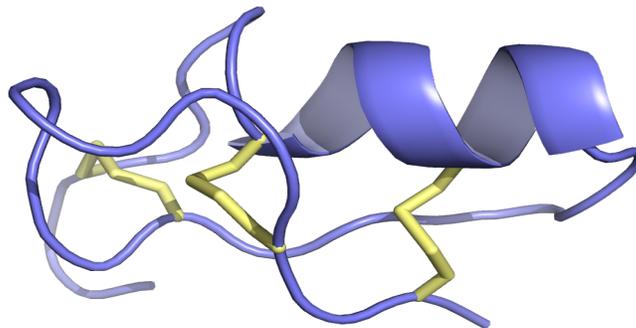
### • Defensina 1

La defensina 1 (Def1) también nombrada CII-dlp, se encuentra en las bases de datos uniprot y ADAM con el número Q6GU94 y ADAM\_6705 respectivamente. Es inducida en la hemolinfa del alacrán *Centruroides limpidus limpidus* [33] como respuesta a una lesión. El primer aislamiento de esta defensina en su forma nativa fue hecho en 2004. Su secuencia nativa consta de 32 residuos de aminoácidos de los cuales 6 son cisteínas enlazadas mediante enlaces disulfuro con el patrón característico en defensinas de insecto: Cys1–Cys4, Cys2–Cys5, Cys3–Cys6 (Figura 7) [25]. Su masa molecular con las cisteínas oxidadas es de  $3816.9 \pm 1$  Da, presenta una carga ligeramente catiónica debido a la presencia en su estructura primaria de 3 aminoácidos cargados positivamente (lisina y arginina) y su punto isoeléctrico teórico es 8.65.



**Figura 7.** Estructura primaria de la Def1. Se resaltan en colores la conectividad entre cisteínas.

Ésta defensina presenta actividad antibacteriana cooperativa contra bacterias Gram-positivo (*B. subtilis*, *S. aureus*) y Gram-negativo (*E. coli* DH5-alfa y *K. pneumoniae*), al ser combinada con dos péptidos presentes en la hemolinfa del alacrán [33]. En el año 2011, empleando resonancia magnética nuclear, se obtuvo una estructura preliminar de baja resolución (con un RMSD de 2.4 Å). Proporcionando un indicio de su estructura terciaria, la cual se encontró que estaba conformada por una hélice alfa y una hoja beta antiparalela estabilizadas mediante enlaces disulfuro (motivo CS- $\alpha/\beta$ ) (Figura 8) [40].

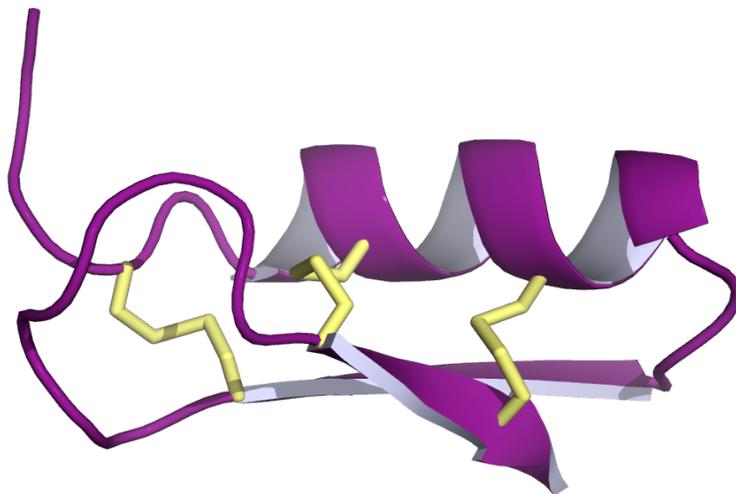


**Figura 8.** Estructura de baja resolución de la Def1 reportada en el 2011 [40]. Se aprecia un indicio del motivo estructural CS- $\alpha/\beta$ , no fue posible definir las hebras beta debido a la poca cantidad de muestra obtenida. El valor de RMSD del conjunto de estas estructuras fue de 2.34 Å

Dicho motivo estructural es compartido con algunas neurotoxinas presentes en el veneno de escorpión. Basándose en dichas similitudes estructurales, diversos autores han propuesto que las defensinas de insectos y las toxinas bloqueadoras de canales iónicos podrían tener un ancestro en común. Por lo que se planteó el proyecto, del cual forma parte la presente tesis, de realizar dos mutaciones puntuales sobre la Def1 (siguiendo la teoría de la diada funcional) y una deleción para obtenerse de esta manera, un péptido tipo

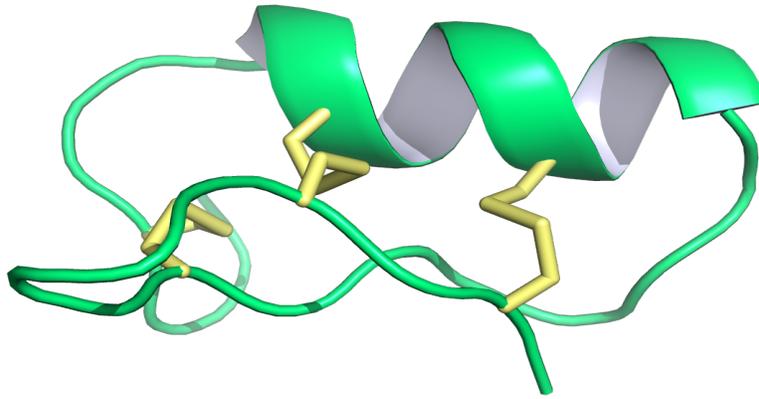
toxina bloqueadora de canales de potasio a partir de una defensina, y de esta manera aportar una evidencia más de la relación defensina-toxina (ver anexo I). La primera mutación consistió en cambiar una tirosina, un aminoácido de tipo aromático que se encuentra en la posición 20, por lisina la cual es un aminoácido cargado positivamente, en adelante nos referiremos a este péptido como M1D1. La segunda mutación consistió en cambiar glutamina en la posición 32 por tirosina, es decir un aminoácido polar sin carga por un aminoácido aromático (M2D1). La última mutación la cual consiste en una delección de los aminoácidos IQY presentes en las posiciones 24-26. En el presente trabajo se hará referencia a esta molécula que cuenta con las dos mutaciones previas y la delección como mutante 3 de la defensina 1 (M3D1). Al realizar estas tres mutaciones se pretende obtener un péptido tipo defensina que presente actividad como toxina bloqueadora del canal iónico de potasio Kv1.3.

En 2015 se obtuvo la estructura terciaria de la M2D1 (con RMSD de 0.66 Å) que exhibió el motivo estructural CS- $\alpha/\beta$  (Figura 9). [2]



**Figura 9.** Estructura terciaria M2D1. En esta estructura se observa el motivo estructural CS  $\alpha/\beta$  característico de defensinas de insecto y toxinas bloqueadoras de canales de potasio. El ensamble de estructuras obtenido tuvo un valor de RMSD de 0.66 Å [2].

El péptido M3D1 se purificó en 2014 y fue posible obtener su estructura terciaria preliminar (Figura 10) [41]. Sin embargo, no se corroboró su actividad biológica.



**Figura 10.** Estructura preliminar de la M3D1. Se puede apreciar la formación de una hélice  $\alpha$ ; sin embargo, la hoja beta no se alcanza a definir [41].

En la figura 11 se incluyen la secuencia de aminoácidos de los péptidos que conforman el proyecto de investigación y que se sintetizaron y caracterizaron en la presente tesis.

GS-Def1	GS-ACQFW	SCNSS	CISRG	YRQGY	CWGIQ	YKYCQ	CQ
GS-M1D1	GS-ACQFW	SCNSS	CISRG	YRQGK	CWGIQ	YKYCQ	CQ
GM-M1D1	GM-ACQFW	SCNSS	CISRG	YRQGK	CWGIQ	YKYCQ	CQ
GM-M2D1	GM-ACQFW	SCNSS	CISRG	YRQGK	CWGIQ	YKYCQ	CY
GM-M3D1	GM-ACQFW	SCNSS	CISRG	YRQGK	CWG--	--KYCQ	CY

**Figura 11.** Alineamiento secuencial de Def1 y sus mutantes. Se resalta en color las diferencias en secuencia primaria.

- **Determinación estructural de péptidos y proteínas por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)**

La espectroscopia de RMN es una técnica capaz de resolver la estructura tridimensional de péptidos y proteínas a un nivel atómico. Su principal ventaja es el análisis estructural y de procesos dinámicos en medio fisiológico o muy cercanos a este último.

Existen dos parámetros de la RMN que nos ayudan a identificar los patrones de absorción (señales) y realizar la determinación estructural de una proteína. El primer parámetro es el desplazamiento químico ( $\delta$ ), el cual se expresa como

una relación que involucra la frecuencia a la que se observa un núcleo, ( $\nu$  cpd), relativa a la de un estándar, ( $\nu$  ref).

$$\delta = \frac{\nu_{cpd} - \nu_{ref}}{\nu_{ref}}$$

Este parámetro es la medida indirecta del entorno químico que rodea a los núcleos, definiendo y modulando las frecuencias de resonancia. Con ayuda del desplazamiento químico podemos identificar los tipos de núcleos en una molécula y distinguirlos por su ambiente químico [42]. La tabla 1 muestra una clasificación de los tipos de hidrógenos en una proteína de acuerdo con su desplazamiento químico.

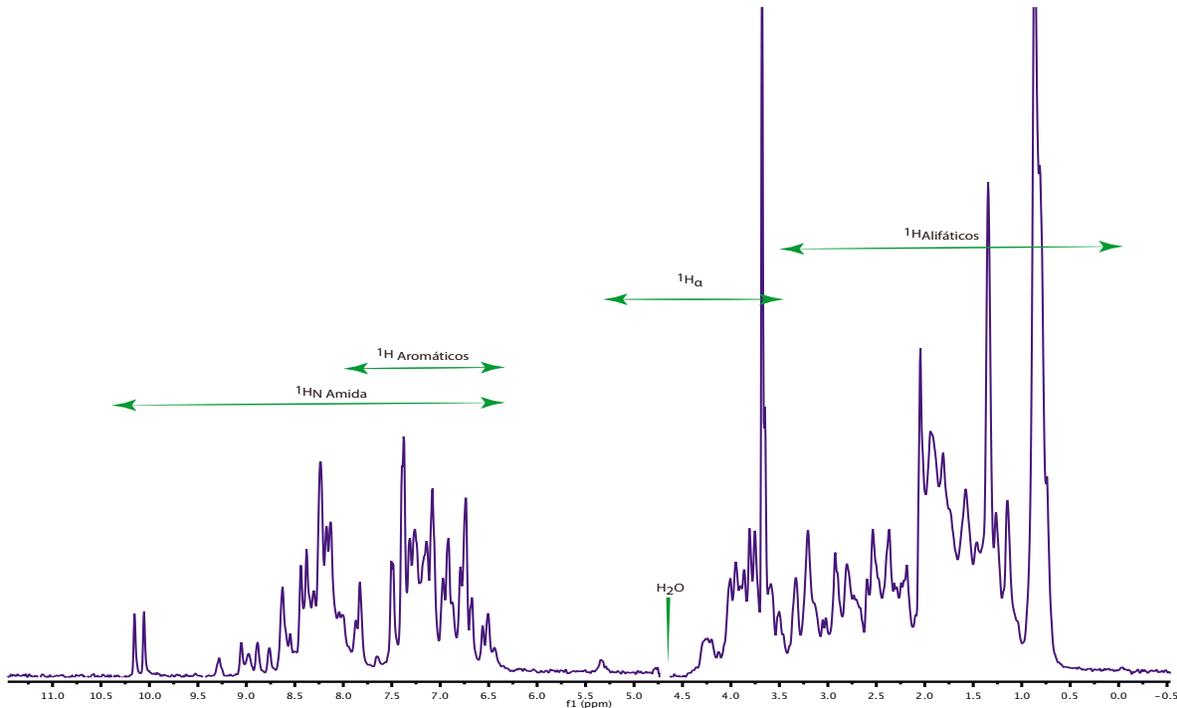
**Tabla1.** Desplazamientos químicos de los tipos de hidrógenos presentes en una proteína.

<u>Tipo de hidrógeno</u>	<u>Desplazamiento químico típico</u> (ppm)
$^1\text{H}_\text{N}$ de amida	De 6.5 a 10.0
$^1\text{H}$ aromáticos	De 6.5 a 8.0
$^1\text{H}_\alpha$	De 3.5 a 5.5
$\text{CH}_3$ y $\text{CH}_2$ de cadena lateral	De 3.5 a -1.0

Cuando se obtiene un espectro  $^1\text{H}$  de RMN de una proteína, las señales que se observan son la suma de las señales de los protones de todos los aminoácidos presentes en su estructura primaria. Debido al alto traslape entre ellas los espectros unidimensionales de una proteína son imposibles de interpretar. Sin embargo, son de gran importancia al proporcionarnos información sobre la existencia o ausencia de plegamiento en dicha proteína.

En un espectro de  $^1\text{H}$  de una proteína con estructura terciaria definida, las señales de  $^1\text{H}_\text{N}$  de amida de la cadena principal suelen verse distribuidas entre

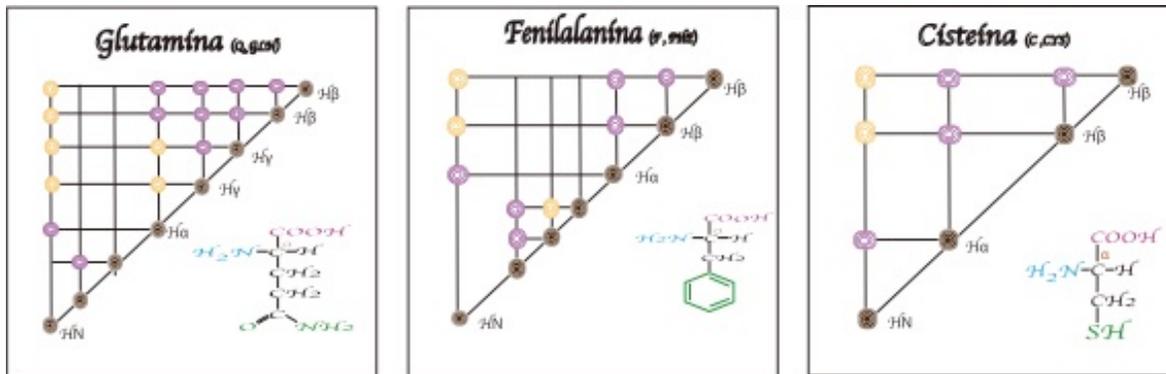
6.5 y 10 ppm (Figura 12); debido a que los  $^1\text{H}_\text{N}$  se encuentran formando puentes de hidrógeno lo que genera un ambiente químico único y perfectamente definido para cada uno de dichos protones.



**Figura 12.** Espectro  $^1\text{H}$  de una proteína plegada. Se muestran las principales regiones de desplazamientos químicos de los tipos de hidrógenos presentes en una proteína.

El segundo parámetro principal es el acoplamiento. Este parámetro es originado por la interacción entre dos núcleos magnéticamente activos. Existen dos tipos de acoplamientos en RMN:

El primero llamado acoplamiento escalar o indirecto ( $J$ ), se transmite a través de los electrones que forman el enlace químico. Gracias a este tipo de acoplamiento es posible obtener información de los núcleos contiguos, es decir, se puede identificar los núcleos que se acoplan entre ellos mismos formando un sistema de espín completo. En el caso de las proteínas cada aminoácido puede distinguirse de los otros debido a que tiene su propio sistema de espines (figura 13).



**Figura 13.** Sistemas de espín de algunos aminoácidos. En color **amarillo** se representan las correlaciones TOCSY y en **rosa** las correlaciones COSY.

El segundo tipo de acoplamiento se da por la interacción de dipolos magnéticos cercanos en espacio (acoplamiento dipolar o directo). Gracias a este parámetro, se observa el efecto nuclear Overhauser y es posible identificar los sistemas de espín que se encuentran cercanos espacialmente, obteniendo información acerca del plegamiento de una proteína.

Para lograr la interpretación de los espectros de RMN de estas macromoléculas es un requisito indispensable la obtención de espectros multidimensionales. Para proteínas pequeñas, menores a 7kDa se puede obtener su estructura tridimensional mediante el uso de experimentos de RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  bidimensionales homonucleares como son  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY;  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY y  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY. Sin embargo, cuando la proteína es mayor, resulta muy complicada la interpretación de los espectros bidimensionales de RMN debido al traslape de señales. Para solucionar este problema se emplean experimentos heteronucleares, multidimensionales empleando proteínas marcadas con isótopos de  $^{13}\text{C}$  o  $^{15}\text{N}$  o ambos.

En los experimentos multidimensionales, se observa una serie de señales con las coordenadas iguales, a éstas se le llama señales en la diagonal, las cuales corresponden a las señales del espectro monodimensional. Las señales que se localizan fuera de la diagonal son las que se interpretan. Para la correcta asignación de estos espectros es importante conocer la secuencia de aminoácidos que conforman la proteína.

Para la elucidación estructural de todos los péptidos involucrados en esta investigación se emplearon los espectros homonucleares bidimensionales mencionados anteriormente.

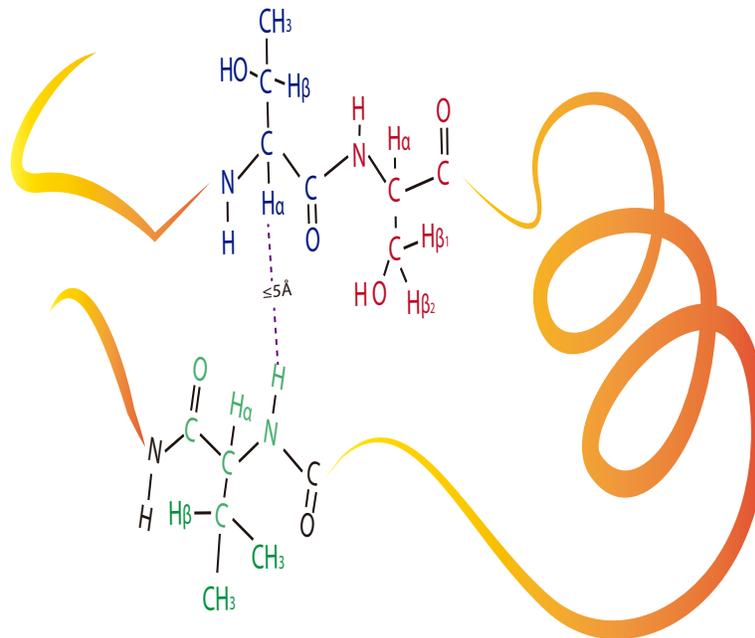
En el experimento COSY se pueden observar la correlación del desplazamiento químico via el acoplamiento entre espines nucleares a dos y a tres enlaces de distancia. En una proteína se pueden observar señales provocadas por el acoplamiento entre los protones de amida con los protones alfa, los alfa con los beta, correlaciones entre cadenas alifáticas y correlaciones de sistemas aromáticos de cada aminoácido

En el experimento TOCSY se muestra la correlación de todos los núcleos que se encuentran formando un sistema de espines, es decir todos los núcleos que se acoplan escalarmente entre ellos. Al analizar el espectro TOCSY de una proteína debemos encontrar al menos tantos sistemas de espín como aminoácidos conformen su estructura primaria.

El NOESY es el experimento más importante para la determinación estructural de proteínas debido a que en él se manifiestan las interacciones dipolares entre núcleos espacialmente cercanos debido al efecto NOE entre dos núcleos que se encuentran próximos espacialmente (a no más de 5 Å de distancia entre sí). La intensidad de las señales debidas al NOE puede relacionarse con la distancia entre los núcleos que la generan por medio de la ecuación:

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

Donde  $k$  es una constante de proporcionalidad y  $r_{\text{AB}}$  es la distancia entre el núcleo A y el núcleo B. Debido al efecto NOE, se logra determinar las interacciones entre protones que se encuentren espacialmente cerca debido a la estructura tridimensional que presenta la proteína en estudio a pesar de que se encuentran alejados en la secuencia primaria (Figura 14).



**Figura 14.** Esquema de interacción NOE [43]. Se esquematiza la interacción entre protones cercanos espacialmente a pesar de su lejanía en la secuencia primaria.

Con el experimento NOE se lleva a cabo la asignación de sistemas de espín tanto secuencial como a larga distancia, lo que definirá la estructura terciaria [44], [45].

Una vez identificados los sistemas de espines de los aminoácidos que conforman la proteína y antes de la determinación completa de las estructuras tridimensionales de alta resolución que conlleva un mayor tiempo, se puede obtener información estructural de manera muy rápida y confiable únicamente con los datos obtenidos por estos espectros de RMN utilizando el método del índice de desplazamiento químico.

- **Índice de desplazamiento químico**

El método del CSI (índice de desplazamiento químico) es uno de los indicadores más confiables para identificar la ubicación y el tipo de estructura secundaria presente en las proteínas. Este método correlaciona los cambios en el desplazamiento químico de los átomos  $^1\text{H}_\alpha$ ,  $^{13}\text{C}_\alpha$ ,  $^{13}\text{C}_\beta$  y  $^{13}\text{CO}$  de cada aminoácido con la información estructural tridimensional de la proteína. Esto

es posible debido a que dichos cambios en el desplazamiento químico se deben en su mayoría a la existencia de interacciones del tipo puentes de hidrógeno que estabilizan las estructuras secundarias.

Para identificar la presencia de estructura secundaria el método CSI compara el desplazamiento químico observado en los espectros de RMN con valores de referencia establecidos para los aminoácidos en tripéptidos (ver Anexo IV). A cada átomo se le asigna uno de tres valores: +1, 0 ó -1, dependiendo del valor de la diferencia en el desplazamiento químico observado.

En hélices alfa, todos los protones de amida excepto los del N terminal participan en enlaces de hidrógeno  $CO(i)/NH(i+4)$  (Figura 2) provocando desplazamientos de los protones  $H\alpha$  a menores ppm (promedio de -0.39 ppm) y NH (promedio de -0.19 ppm) así como el de los carbonos de  $C\alpha$  a mayores ppm en promedio de +2.6 ppm).

En hojas beta, los protones de amida (excepto en los extremos) participan en enlaces de hidrógeno, lo que da como resultado una disminución del intercambio H/D. Provocando un efecto de desplazamiento químico de HA hacia mayores partes ppm (promedio de +0.38) y de NH (promedio de +0.29 ppm) y el efecto a menores ppm para los carbonos  $C\alpha$  (promedio de -1.4 ppm). Por ejemplo, si el desplazamiento químico de  $^1H\alpha$  de cierto aminoácido es mayor o menor que el valor de referencia CSI en  $\pm 0.1$  ppm se le asigna un valor de índice de + 1 o - 1, respectivamente; si la diferencia en los cambios químicos es menor a  $\pm 0.1$  ppm se asigna un valor de índice de cero.

Posteriormente, se analiza el conjunto de los índices asignados de la siguiente manera: si existen un conjunto de tres o más índices  $H\alpha$  consecutivos con + 1 (-1 para CA/CO) esto indica la presencia de hebra  $\beta$ ; de la misma manera, si existe un conjunto (no necesariamente consecutivos) de cuatro o más índices -1 (+1 CA/CO) sin ser ininterrumpidos por un índice de valor contrario esto identifica la presencia de una hélice alfa. Cualquier otra combinación de índices se designan como estructura aleatoria [46].

El método CSI es exacto al 90-95% no sólo para identificar la presencia de estructura secundaria, si no que además proporciona certidumbre sobre la ubicación de dichas estructuras en la cadena polipeptídica [46].

- **Cálculos estructurales mediante el programa CYANA**

La determinación de la estructura de péptidos y proteínas por RMN en solución se basa en las restricciones de distancia derivadas de las interacciones señaladas en el espectro NOESY, por tal motivo se necesita una gran cantidad de señales NOESY asignadas. Sin embargo, no todas las señales NOESY proporcionan información suficiente sobre la estructura terciaria del péptido, ya que las señales correspondientes a interacciones de sistemas de espín secuenciales proporcionan numerosas señales NOE con poca información sobre la estructura terciaria, por el contrario, las interacciones a larga distancia son las que brindan mayor información para la obtención de una estructura tridimensional precisa.

Para el cálculo estructural se toman en cuenta además de las restricciones de distancia experimentales, longitudes de enlace, ángulos de enlace, quiralidad y planaridad [47]. El cálculo de la estructura 3D se realiza en el programa CYANA como un problema de minimización para una función objetivo que mide el acuerdo entre una estructura y el conjunto de restricciones dado.

Por lo general, el cálculo estructural de macromoléculas no es una tarea sencilla. La obtención de un conjunto completo de restricciones de distancia a partir de un espectro NOESY es necesariamente un proceso iterativo, en el que las estructuras calculadas a partir de un número limitado de restricciones de distancia, sirven para reducir la ambigüedad de las asignaciones equívocas debido al solapamiento de señales.

Las restricciones de distancia ambiguas permiten múltiples posibilidades de asignación en un cálculo de estructura y no es posible realizar una búsqueda exhaustiva de conformaciones permitidas. Por ejemplo, para un péptido pequeño conformado por 32 aminoácidos, de alrededor de 500 átomos, el cálculo estructural estará restringido por un número similar de restricciones

determinadas experimentalmente junto con condiciones estereoquímicas y estéricas. Para disminuir los grados de libertad se considera a la proteína como un cuerpo rígido conectado por enlaces giratorios, por tanto, los grados de libertad son exclusivamente ángulos de torsión, es decir, rotaciones sobre enlaces simples [45].

El cálculo de la estructura se lleva a cabo utilizando el algoritmo de dinámica de ángulo de torsión y una simulación de incremento y estabilización de la temperatura (simulated annealing) que se aplica a un número determinado de conformeros de inicio con valores de ángulo de torsión aleatorios. El número de conformeros de inicio aleatorio es típicamente 200 pero puede aumentarse para sistemas difíciles con baja convergencia. De estos conformeros se toman los 20 que presenten los valores más bajos de la función objetivo final y se guardan como un ensamble estructural. Dicha función objetivo se define de manera tal que es cero sí y sólo sí todas las restricciones de distancia experimentales y las restricciones de ángulo de torsión se cumplen y todos los pares de átomos satisfacen una comprobación de la ausencia de superposición estérica. Los cálculos de la estructura típicamente comprenden siete ciclos. Para iniciar el cálculo estructural el programa requiere de la secuencia de aminoácidos (archivo.seq), lista de desplazamientos químicos (archivo.prot), la lista de interacciones nOes asignadas (archivo.peaks) y, opcionalmente, la lista de restricciones inferiores (archivo.lol).

El programa lee los archivos de entrada listados en el párrafo anterior; posteriormente, calibra las restricciones de distancia y genera una lista de asignaciones creando para cada pico de cruce todas las posibles asignaciones tomando en cuenta los desplazamientos químicos. Posteriormente, filtra las asignaciones tomando como criterios que los desplazamientos químicos y la distancia entre átomos no excedan los límites de tolerancia, generando entonces las restricciones de distancia para todos los picos de cruce. Finalmente, calcula una estructura mediante un proceso dinámico de ángulos de torsión usando un protocolo de enfriamiento simulado. La estructura creada en este paso se usará como el archivo de entrada para el siguiente ciclo. La

precisión de la determinación de la estructura normalmente mejora con cada ciclo subsiguiente.

El protocolo de recocido consta de cinco etapas:

1. *Minimización inicial*. Se aplica una minimización corta para reducir las interacciones de alta energía que podrían alterar el algoritmo de dinámica del ángulo de torsión. Se realizan 100 pasos de minimización de gradiente conjugado, incluyendo sólo restricciones de distancia entre átomos de hasta 3 residuos a lo largo de la secuencia y otros 100 pasos de minimización que incluyen todas las restricciones.
2. *Fase de alta temperatura*. Se realiza un cálculo dinámico de ángulo de torsión a alta temperatura constante típicamente, 10,000 K.
3. *Enfriamiento lento*. Cálculo de la dinámica del ángulo de torsión con enfriamiento lento cerca de la temperatura cero K.
4. *Fase de baja temperatura con átomos de hidrógeno individuales*. Incorporación de todos los átomos de hidrógeno en el control del traslapamiento estérico
5. *Minimización final*. Una minimización final que consta de 1000 pasos de gradiente conjugado.

En el cálculo de la estructura final se garantiza que todas las interacciones NOE tengan asignaciones únicas a un sólo par de átomos de hidrógeno. Esto facilita el uso de programas de afinamiento y análisis posteriores que no pueden manejar restricciones de distancias ambiguas [44].

### **Dinámica Molecular**

Por lo general, las estructuras obtenidas mediante métodos de geometrías de distancia tienden a tener niveles energéticos altos, por lo que podrían ser estructuras poco precisas, debido a esto es necesario realizar un afinamiento posterior que las someta a una minimización energética. Basándose en gradientes de energía potencial se provocan movimientos en los átomos que

dan como consecuencia la relajación estructural hasta alcanzar un mínimo en la energía potencial.

El campo de fuerzas se define usando aproximaciones de la física clásica, de acuerdo con la suma de las contribuciones de Fuerzas de Van der Waals atractivas y repulsivas, interacciones electrostáticas, potenciales energéticos para girar los ángulos de torsión y para deformar ángulos y longitudes de enlace. En los cálculos de dinámica molecular los átomos de la estructura inicial están en movimiento hasta que alcanzan un mínimo energético. Para garantizar que el mínimo alcanzado es el global, se simula un calentamiento del sistema a una temperatura alta, que posteriormente se disminuye gradualmente. Durante todo el proceso se mantiene la influencia del campo de fuerzas lo que permite la posibilidad de explorar distintas conformaciones además de las restricciones experimentales de distancia interatómica. De la misma manera que en el cálculo estructural con CYANA, el proceso de minimización se repite de manera iterativa utilizando las estructuras finales de cada ciclo como las iniciales del siguiente proceso de enfriamiento hasta alcanzar el mínimo global. Este tipo de simulaciones también se pueden realizar incluyendo moléculas de disolvente generalmente agua lo que permite obtener una mejor estructura (estructura afinada).

- **Validación estructural**

Para determinar la calidad de las estructuras obtenidas mediante RMN se emplean diferentes parámetros como el número y tipo de restricciones NOE a corta, mediana y larga distancia empleados en cada cálculo, el valor de RMSD del conjunto de estructuras obtenido, las restricciones de ángulos de torsión de los aminoácidos, observados en gráficos tipo Ramachandran. Es importante destacar que para que una estructura sea considerada confiable cada uno de estos parámetros debe cumplir satisfactoria e individualmente con las restricciones de distancia impuestas experimentalmente mediante la interpretación de un espectroscopista capacitado.

El valor RMSD es la medida de la desviación estándar de la distancia entre los átomos (generalmente de la cadena principal) que conforman la proteína

en los distintos modelos calculados al ser superpuestos. Se considera que una estructura converge a una solución adecuada cuando el RMSD de los modelos es menor o igual a 1 Å. Sin embargo, este no es el único ni el parámetro más importante a considerar.

### Número y tipo de restricciones NOE

En general, las estructuras resultas por RMN son confiables mientras más restricciones sean establecidas. El número de restricciones depende de la cantidad de interacciones NOE asignadas. Dependiendo del tipo de estructura secundaria que presente la proteína se observan distintas interacciones NOE.

Las restricciones de RMN características para hélice  $\alpha$  son:

- Presencia de un patrón de interacciones NOE de mediana a fuerte intensidad entre los protones de amida del aminoácido  $i$  con su consecutivo ( $d_{NN} i, i + 1$ )
- Numerosas interacciones de los protones alfa con los beta del aminoácido  $i$  con el aminoácido que se encuentra en la posición  $i+3$  en la cadena peptídica ( $d_{\alpha\beta} i, i + 3$ )
- Interacciones del protón alfa del aminoácido en posición  $i$  con el protón de amida del aminoácido  $i+3$  y con el  $i+4$  ( $d_{\alpha N} i, i + 3, d_{\alpha N} i, i + 4$ ).
- También, se puede observar interacciones entre los protones de amida del aminoácido  $i$  con el vecino  $i+2$  ( $d_{NN} i, i + 2$ )
- Fuertes señales NOE entre ( $d_{\beta N} i, i + 1$ ), suelen ser más fuertes que en las hojas beta o en conformaciones aleatorias.

En el caso de las hojas  $\beta$ , las restricciones de RMN características son:

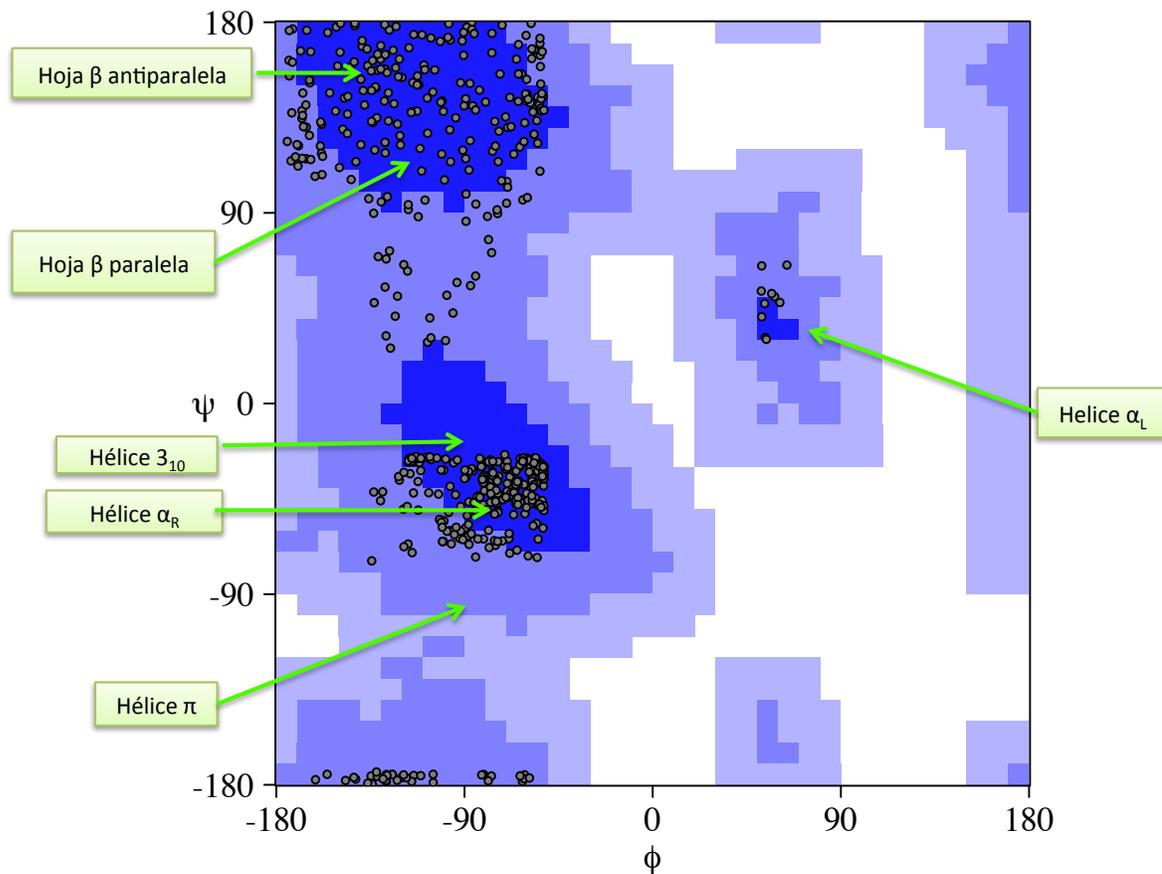
- Los fuertes interacciones NOE ( $d_{\alpha N} i, i + 1$ ),
- Interacciones muy débiles o ausentes  $d_{NN} (i, i + 1)$ ,
- Interacciones intracatenarias  $d(i, j)$  muy características. En hojas beta antiparalelas estas interacciones NOE son de intensidad medianas a fuertes.

## El Gráfico de Ramachandran

Es un diagrama donde se grafica la distribución de los ángulos diedros  $\psi$  y  $\phi$  (Figura1) de los aminoácidos de una proteína en los modelos estructurales calculados.

Para la obtención de estos gráficos los átomos se tratan como esferas duras con dimensiones correspondientes a sus radios de van der Waals. Las regiones **azules** corresponden a conformaciones donde no hay choques estéricos, es decir, éstas son las regiones permitidas. Las áreas **azul claro** muestran las regiones permitidas, con distancias un poco más cortas. Los ángulos  $\phi$  y  $\psi$  que hacen que las esferas colisionen corresponden a conformaciones estéricamente poco permitidas de la estructura del polipéptido regiones en color **lila**; estas regiones son definidas por una distancia mínima de contacto entre los átomos de los aminoácidos vecinos ( $i + 1$ ) y ( $i - 1$ ), para un aminoácido 'i'. Las áreas blancas corresponden a las conformaciones donde los átomos en el polipéptido se acercan más que la suma de sus radios de van der Waals. Estas regiones están estéricamente prohibidas para todos los aminoácidos excepto para la glicina. Las regiones no permitidas generalmente implican impedimento estérico entre el grupo  $C\beta$  metileno de la cadena lateral y los átomos de la cadena principal. La glicina no tiene cadena lateral y, por lo tanto, puede adoptar ángulos  $\phi$  y  $\psi$  en las cuatro regiones [1].

El valor de los ángulos diedros  $\psi$  y  $\phi$  en los residuos de una proteína nos proporciona, también, indicios de la presencia de estructura secundaria (Figura 15).



**Figura 15.** Gráfico de Ramachandran. Se señalan las regiones donde típicamente aparecen los ángulos diedros de los aminoácidos que se encuentran en cierta estructura secundaria.

Por ejemplo, si se observan residuos consecutivos con ángulos de torsión alrededor de los valores estándar ( $\phi = -57^\circ$  y  $\psi = -47^\circ$ ) es un indicio de la formación de hélice  $\alpha$ . Si los ángulos se encuentran alrededor de los valores ( $\phi = -139^\circ$  y  $\psi = 135^\circ$ ) es un indicio de la formación de una hoja beta en una disposición paralela y si estos valores están cercanos a ( $\phi = -119^\circ$  y  $\psi = -113^\circ$ ) la disposición sería antiparalela. (Tabla 2)

**Tabla 2.** Valores de ángulos diedros  $\psi$  y  $\phi$  en diferentes estructuras secundarias

Estructura secundaria		$\Phi$ en grados	$\Psi$ en grados	$\omega$ en grados	No. De residuos por giro	Translación por residuo (Å)
Hoja antiparalela	$\beta$	-139	+135	-178	2.0	3.4
Hoja paralela	$\beta$	-119	+113	180	2.0	3.2
Hélice dextrogira	$\alpha$	-57	-47	180	3.6	1.5
Hélice $3_{10}$		-49	-26	180	3.0	2.0
Hélice $\pi$		-57	-70	180	4.4	1.15

- **Expresión de proteínas recombinantes**

La resonancia magnética nuclear es una técnica poderosa con la cuál podemos obtener información acerca de la existencia de estructura secundaria de péptidos y proteínas, además permite conocer la estructura terciaria de moléculas, que debido a la naturaleza de estas su análisis con otras técnicas sería complicado. Además, que nos permite obtener la estructura terciaria de las mismas en disolución. A pesar de todas estas ventajas es una técnica que requiere una cantidad considerable de muestra; sin embargo, aunque las proteínas se encuentran en todos los organismos, existen proteínas específicas como el caso de las toxinas y defensinas cuya abundancia en el organismo nativo es muy baja en cuanto a concentración. Esto hace que su aislamiento de la fuente natural sea un proceso muy complicado. Una buena alternativa para facilitar y mejorar su obtención y, por tanto, el estudio de este tipo de moléculas es empleando técnicas de recombinación génica. La técnica general consiste en aislar el gen que codifica para una proteína específica, insertarlo por medio de un vector (plásmido) a otro organismo (sistema de

expresión) que puede ser una bacteria, levadura, célula de insecto o de mamífero. A estas proteínas que son expresadas en un organismo diferente al que las producen naturalmente se le conoce como proteínas recombinantes [40]. Para proteínas que no tienen modificaciones postraduccionales (glicosilaciones, amidaciones, hidroxilaciones, etc.), el empleo de un sistema de expresión bacteriano es muy común, debido al bajo costo y manejo sencillo que conlleva.

A pesar del incremento en la producción de proteínas recombinantemente, no es un tarea sencilla, sobre todo cuando la proteínas que se desean obtener son proteínas tóxicas para la bacteria y/o ricas en enlaces disulfuro, como es el caso de defensinas y toxinas. El rendimiento de este tipo de péptidos se ve muy disminuido puesto que en la bacteria se tienden a formar cuerpos insolubles; en ellos, se encuentra la proteína de interés formando agregados o con un plegamiento distinto al nativo. Otra de las grandes ventajas de emplear técnicas recombinantes en la síntesis de proteínas es precisamente que pueden ser diseñadas con secuencias de residuos de aminoácidos específicas para evitar en lo posible problema de solubilidad o para facilitar la purificación. Usualmente, para solucionar el problema de solubilidad, se adicionan a la proteína de interés otras proteínas chaperonas que aumenten la solubilidad o propicien la correcta formación de los enlaces disulfuro. Una proteína empleada con frecuencia es la tioredoxina. Ésta una proteína que actua reduciendo los enlaces disulfuro menos estables que se generan en el péptido de interés con lo cual se favorece la formación de los enlaces más estables [48].

### Hipótesis

Realizando dos mutaciones puntuales y una *delección* en la estructura primaria de la Def1 se podrá obtener una nueva molécula M3D1 que exhiba propiedades tipo toxina bloqueadora del canal Kv1.3. Este cambio en la actividad biológica no afectará considerablemente el motivo estructural CS- $\alpha/\beta$ .

### Objetivo General

Obtener de manera recombinante los péptidos Def1, M1D1, M2D1 y M3D1 en cantidades suficientes para caracterizar de manera estructural y funcional el efecto de cada una de las mutaciones realizadas durante el proceso de la conversión experimental de la Def1 en toxina bloqueadora del canal Kv1.3.

### Objetivos Particulares

- Optimizar los procesos de expresión, purificación y proteólisis enzimática para obtener la Def1, M1D1, M2D1 y M3D1.
- Producir en un sistema heterólogo en *E. coli* las proteínas de fusión (PF)
- Purificar las PF por métodos cromatográficos.
- Realizar corte enzimático de las PF para la obtención de los péptidos de interés: GS-Def1, GS-M1D1, GM-M1D1, GM-M2D1, GM-M3D1.
- Caracterizarlas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.
- Adquirir, procesar e interpretar sus espectros de RMN.
- Calcular y afinar las estructuras mediante dinámica molecular en vacío y con agua como disolvente explícito.
- Realizar pruebas de actividad antibacterianas.
- Realizar corte con CNBr para la obtención de los péptidos sin los residuos GM-
- Realizar pruebas electrofisiológicas sobre el canal Kv 1.3.



Las células competentes fueron transformadas mediante choque térmico; se cultivó la cepa transformada a 37°C en 50 mL de medio LB con 100 µg/mL de ampicilina y 34 µg/mL de cloranfenicol a 200 rpm durante 12 h. Este cultivo fue diluido 1:100 en medio LB con igual concentración de antibióticos. Cuando los cultivos alcanzaron una densidad óptica entre 0.6 a 0.7 medida a 600 nm, se indujo la expresión con IPTG 0.5 mM. Las células se incubaron a 18°C durante 18 horas con agitación constante de 200 rpm. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron con una fuerza centrifuga de 6,000 x g durante 10 minutos para separar las células del medio.

- Purificación de las proteínas de fusión

Las células se resuspendieron en 10 mL de disolución A (la composición de todas las disoluciones a las que se hace referencia en esta sección se encuentra en la sección de disoluciones, página 7, del presente trabajo) por gramo de bacterias. Las células se colocaron en un baño de hielo y se sometieron a choques sónicos por periodos de 20 s a 60 W con periodos de descanso de 40 s durante un tiempo efectivo de lisis de 10 min. La fracción soluble se separó mediante una fuerza centrifuga de 32,000 x g durante 45 min a 4 °C. La PF se aisló mediante CAMQ utilizando una columna Hi-Trap® previamente cargada con iones Ni<sup>2+</sup> y equilibrada con la disolución B. La PF retenida dentro de la columna se lavó con 25 mL de la disolución B, para eliminar las proteínas con poca afinidad. Finalmente, se eluyó con 30mL de la disolución C. La PF se mantuvo durante 9 días a 4 °C para promover un plegamiento lento en presencia de tiorredoxina. Una vez transcurrido este tiempo, la PF se dializó durante 2 h. (con 2 cambios de disolvente) empleando la disolución D para remover urea e imidazol.

- Reacción de proteólisis enzimática

La PF libre de imidazol se llevó a una concentración de 0.8 mg/mL con la disolución E y se le adicionó 100 µL de suspensión de agarosa en la que se encuentra fija la proteasa trombina (SIGMA®). La reacción de corte se llevó a cabo a temperatura ambiente con agitación constante durante 4h. Una vez realizado el

corte enzimático, se separó el residuo de corte y la PF sin reaccionar mediante cromatografía de afinidad a  $\text{Ni}^{2+}$ , siguiendo la misma metodología descrita anteriormente; sin embargo, esta vez la proteína de interés se eluyó de la columna con la disolución F. La PF y el residuo de corte son retenidos en la columna. Es importante recordar que después del corte enzimático los péptidos obtenidos tienen 2 aminoácidos adicionales (GM o GS) en el extremo N-terminal.

- Purificación de los GS- o GM-péptidos mediante Cromatografía líquida de fase reversa

Los péptidos de interés fueron preparados para la purificación por cromatografía de fase reversa en un sistema de alta resolución (HPLC) utilizando cromatografía en fase sólida con una columna Strata-C18 (Phenomenex) previamente hidratada y equilibrada con una disolución al 15 % de Acetonitrilo (ACN) con 0.05 % de ácido trifluoroacético (TFA). Se realizó un lavado de 6 mL con disolución al 15 % de ACN para posteriormente eluir el péptido con una disolución al 39% de ACN.

La purificación final se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de fase reversa a 30 °C empleando una columna C12 Phenomenex<sup>®</sup>, la fase móvil estuvo constituida por las disoluciones 1 ( H<sub>2</sub>O + 0.05% TFA v/v) y 2 (ACN+ 0.05% TFA v/v) empleando un gradiente lineal de 15 al 30 % de ACN en 19 minutos para el caso de la M1D1 y de 25 min para el resto de los péptidos purificados trabajando siempre a un flujo de 1mL/min. La detección se realizó a una longitud de onda de 230 nm para detectar principalmente las transiciones  $\pi-\pi^*$  del enlace peptídico.

- Caracterización mediante espectrometría de masas

Los péptidos purificados fueron caracterizados mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) utilizando un equipo MicroFlex Bruker Daltonics LT. Los ánalitos se diluyeron con una disolución saturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico en ACN acuoso al 66.0% v/v adicionado con TFA al 0.05 %. Obteniendo una concentración final de 1ng/mL. Para la calibración interna del equipo se emplearon las proteínas tamapina (3465.16 Da) y Hge36 (5298.21 Da).

- Espectroscopia de resonancia magnética nuclear

Se obtuvieron los experimentos de RMN  $^1\text{H}$ -TOCSY,  $^1\text{H}$ -DQF-COSY y  $^1\text{H}$ -NOESY utilizando la supresión de agua DPFGE en un equipo Varian Inova 500 MHz y un Bruker AVANCE 700 MHz. La muestra se preparó disolviendo el péptido puro y liofilizado en 280  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada adicionada con 5% v/v  $\text{D}_2\text{O}$ . El experimento TOCSY fue obtenido con un tiempo de mezclado de 80 ms mientras que los espectros NOESY se adquirieron usando tiempos de mezclado de 150 y 300 ms. Los datos de los experimentos fueron procesados con el programa NMRpipe [49].

La asignación de los espectros de RMN se llevó a cabo en el programa CARA1.5 con la herramienta NEASY. Los cálculos estructurales se realizaron con el programa CYANA 2.1 [47].

Finalmente, se realizaron cálculos de dinámica molecular del conjunto de estructuras obtenidas por cada péptido, utilizando para ello el programa AMBER 16 [50].

- Reacción de corte con CNBr

El residuo GM- fue separado de los péptidos de interés mediante una reacción con Bromuro de cianógeno (CNBr). El péptido se resuspendió en una mezcla de agua/TFA en proporción 1:1 para alcanzar la concentración de 10 mg/mL. La disolución se cubrió de la luz y se mantuvo en atmósfera de nitrógeno; posteriormente se adicionó un exceso de 100 equivalentes de CNBr. La reacción se dejó en agitación durante 18 h a temperatura ambiente.

- Prueba de actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana de los péptidos fue probada en células Gram-positivo (*B. subtilis* ATCC 6633 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) y Gram-negativo (*E. coli* DH5a y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883) mediante el siguiente procedimiento: En una caja de 96 pozos se añadió 195  $\mu\text{L}$  de medio LB con aproximadamente  $5 \times 10^4$  bacterias. En cada pozo, se adicionaron los péptidos a probar a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La caja se incubó durante 12 h a  $37^\circ\text{C}$

[31]. Al finalizar el tiempo de incubación se observa visualmente si existe crecimiento bacteriano.

- Prueba de actividad en canales iónicos regulados por voltaje

La capacidad bloqueadora de los péptidos purificados se probó en ovocitos de *Xenopus laevis*, tratados previamente con 10 ng de ARNc para expresar el canal Kv1.3 de humano.

Cada ovocito en el que fue probada la actividad de los péptidos de interés fue utilizado de 1-3 días posteriores al tratamiento con ARNc, se colocó en solución electrofisiológica ND96 (NaCl 96 mM, KCl 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, HEPES 5 mM, pH 7.5.) a temperatura ambiente en una cámara de registro y se fijó a un voltaje constante de -80mV con un sistema de dos electrodos (modelo OC-725 C. Warner Instruments Corp., Hamden, CT, EE. UU.).

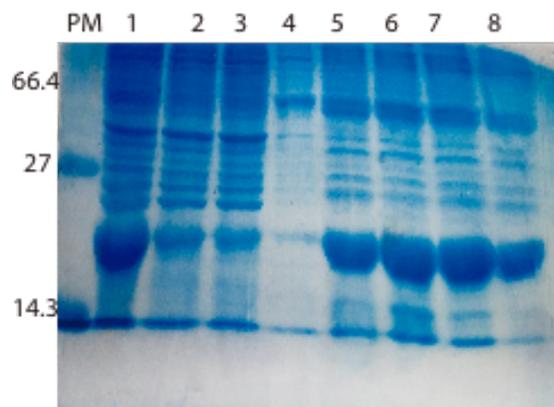
Se adicionaron los péptidos GS-Def1, GS-M1D1, GM-M1D1, M1D1, GM-M2D1, GM-M3D1 y M3D1 en las concentraciones de 50, 100 y 200 µM. Cada concentración de toxina se probó en tres ovocitos diferentes. Para observar su efecto en el canal Kv1.3. se empleó como control positivo la toxina CPY-PI1.

## Resultados y Análisis

- Expresión y purificación de las PF en una cepa de *E. coli*.

El paquete celular obtenido después del tiempo de inducción fue de aproximadamente 7 g por litro de cultivo para cada péptido expresado.

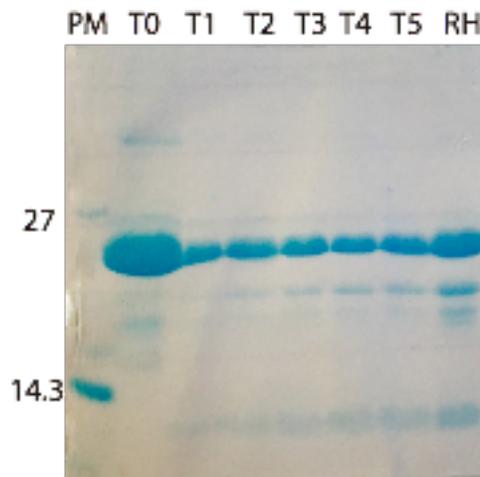
La PF de cada uno de los cinco péptidos se expresó eficientemente en la cepa seleccionada, incrementando por lo menos 6 veces el rendimiento reportado en trabajos previos para esta familia de péptidos [40], [41]. En la figura 17 se presenta como ejemplo, el seguimiento en gel desnaturalizante de poliacrilamida-SDS para la purificación mediante CAMQ de la PF-M1D1; dicho péptido tiene una masa molecular de 21kDa. En el carril 1 se observa la mezcla protéica obtenida mediante el proceso de lisis. Fue necesario pasar 4 veces esta mezcla por la columna de afinidad, ya que la cantidad de PF extraída superaba el límite de retención de la columna. En los carriles 2 y 3 se muestran las fracciones no retenidas dentro de la columna, en el carril 4 se observa la purificación de la PF empleando la disolución B, se observa una pequeña pérdida de PF al realizar estos lavados. En los carriles 5-8 se observan las diferentes eluciones de la PF correspondientes a cada una de las veces que se pasó la disolución por la columna de afinidad.



**Figura 17.** Purificación mediante cromatografía de afinidad a  $\text{Ni}^{2+}$  de la PF-M1D1. En la parte izquierda del gel se muestran los marcadores de pesos moleculares (PM) en kDa. En el carril 1 se observa la fracción soluble obtenida de la PF-M1D1 con masa molecular de 21kDa. Los carriles 2 y 3 muestran la fracción no retenida en la columna de afinidad. El carril 4 corresponde a los lavados con disolución B. En los carriles 5-8 se muestra la elución de la PF con la disolución C.

- Reacción de proteólisis enzimática

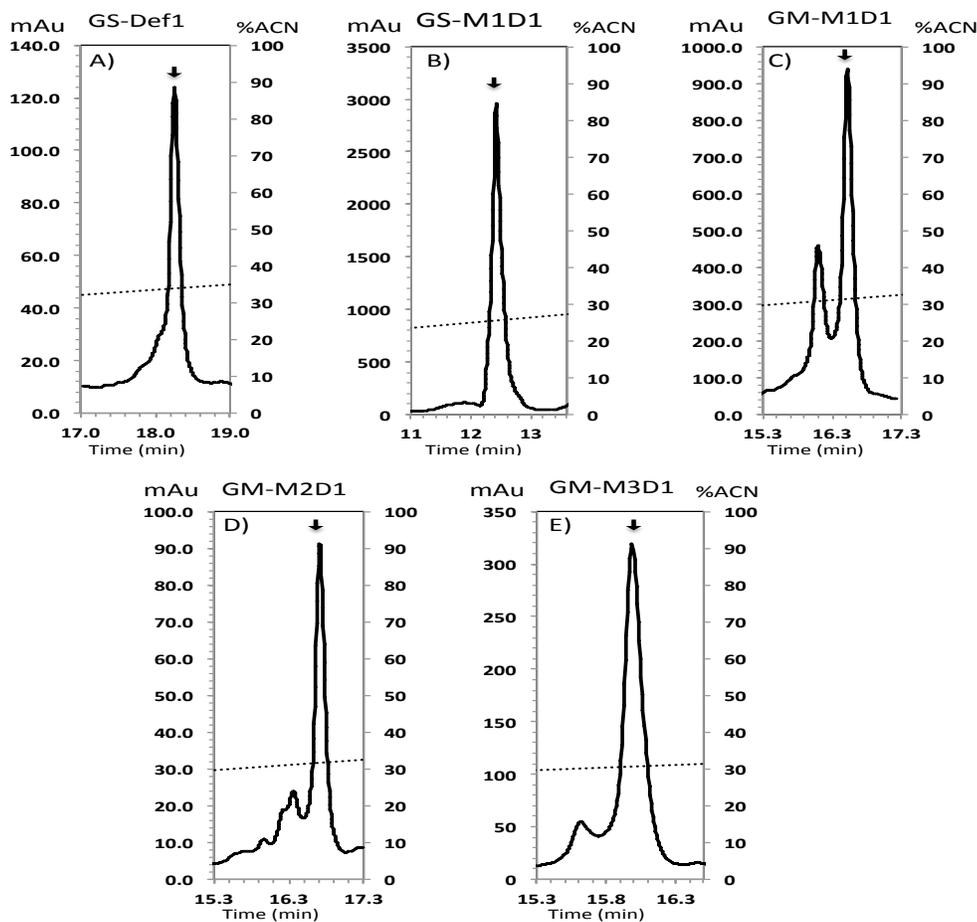
Los péptidos GS-Def1, GS-M1D1, GM-M1D1, GM-M2D1 y GM-M3D1 fueron separados de la PF mediante la reacción de proteólisis enzimática con trombina. En la figura 18 se muestra el seguimiento de esta reacción en gel de poliacrilamida-SDS. La reacción es poco eficiente; sin embargo, desde la hora 2 de reacción se observó la formación de una banda de aproximadamente 3930 Da que corresponde al péptido GS-M1D1 libre de la proteína de fusión. La reacción de corte se detuvo a las 4 horas para evitar de este modo, la generación de fragmentos de degradación, el carril RH se refiere a la fracción retenida en la columna de afinidad después del corte. La GS-M1D1 presenta afinidad a la columna a pesar de no contar con la etiqueta de histidinas, esto debido a que en su secuencia primaria existe un residuo de histidina, se decidió entonces eluir el péptido con la disolución F; la concentración de imidazol presente en ella fue suficiente para eluir la GS-M1D1 retenida sin eluir el residuo de corte ni la PF.



**Figura 18.** Reacción de corte de la PF-M1D1 con la proteasa trombina. Los carriles T0-T5 indican el tiempo en horas del transcurrir de la reacción. El carril “RH” se refiere a la fracción retenida en la columna de afinidad después del corte.

- Purificación de los GS- o GM-péptidos mediante Cromatografía líquida de fase reversa

La última purificación se realizó mediante cromatografía de fase reversa con una columna C12. En la figura 19 se muestran los cromatogramas obtenidos para los cinco péptidos purificados, en todos los casos el pico cromatográfico mayoritario corresponde a los péptidos de interés.



**Figura 19.** Purificación de los péptidos GS-Def1, GS-M1D1, GM-M1D1, GMM2D1 y GM-M3D1 mediante cromatografía de fase reversa. Se empleó una columna Proteo C12 de fase reversa. Fase móvil: ACN-H<sub>2</sub>O + 0.05% TFA: Se muestra en línea punteada el gradiente empleado durante la purificación. La detección se realizó a una longitud de onda de 230 nm.

- Caracterización mediante espectrometría de masas

Cada pico fue caracterizado mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. El análisis mediante espectrometría de masas confirma que en todos los casos fueron purificados los péptidos de interés en su forma oxidada. En la tabla 3, se muestra los resultados de la caracterización mediante espectrometría de masas de los cinco péptidos purificados. Comparando la masa obtenida experimentalmente y la teórica, podemos decir que estos picos corresponden a las péptidos esperados y que el déficit de 6 unidades respecto a la masa teórica es una prueba de la formación de los tres enlaces disulfuro esperados.

**Tabla 3.** Masa teórica y experimental, obtenida mediante espectrometría de masa MALDI-TOF de los cinco péptidos purificados y la masa de los péptidos reducidos calculada teóricamente

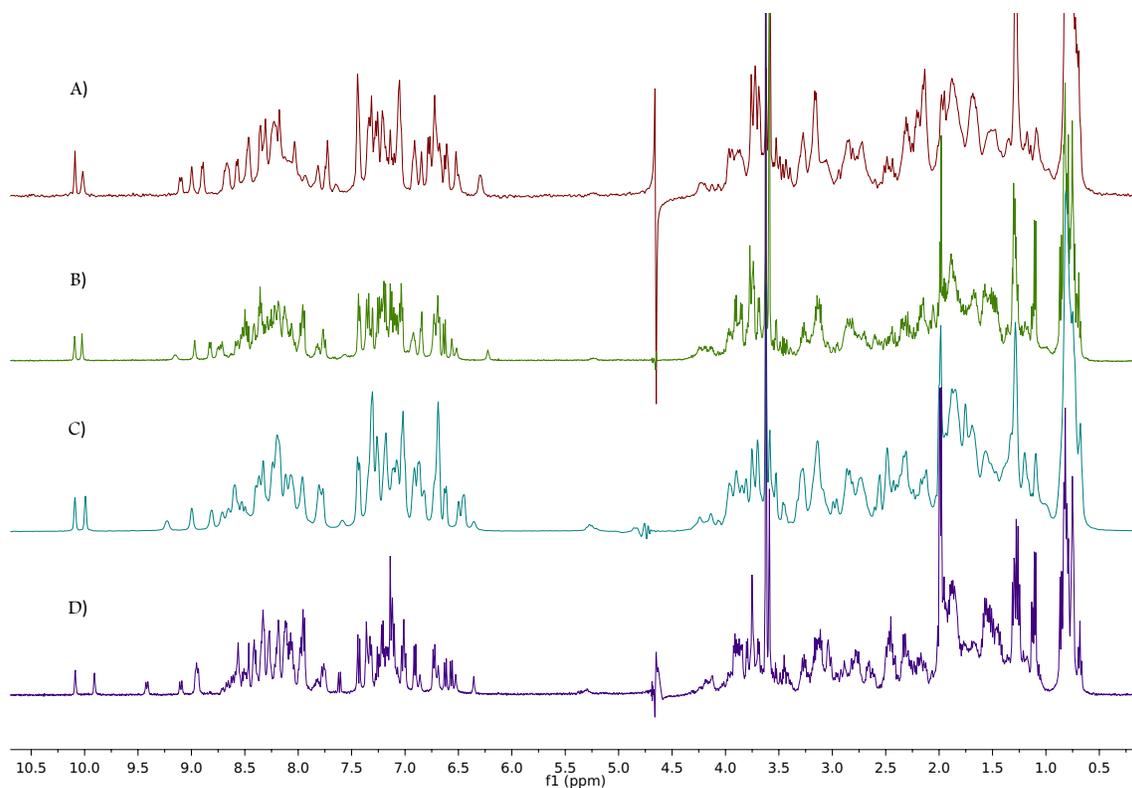
Péptido	Masa registrada (Da)	Masa teórica ( Da)
GS-Def1	3960.71	3965.46
GS-M1D1	3973.72	3980.50
GM-M1D1	3968.47	3974.57
GM-M2D1	4003.53	4009.62
GM-M3D1	3598.96	3605.15

Después de los distintos procesos de purificación los rendimientos obtenidos se incrementaron en un factor de 6 con respecto a los obtenidos en trabajos previos [36,38], siendo el menor para la GM-M2D1 de aproximadamente 600 µg/L y el más alto obtenido de 1,000 µg/L de cultivo tanto para la GS-M1D1 como para la GM-M3D1. La mejora en el rendimiento se logró debido a la modificación de dos procesos clave: 1) La adición de urea en el proceso de lisis, con lo cual se aumentó considerablemente la cantidad de proteína soluble y 2) el tiempo de espera antes de la proteólisis enzimática, ya que este tiempo en presencia de

tiorredoxina promueve tanto la formación de los enlaces disulfuro más estables como el plegamiento.

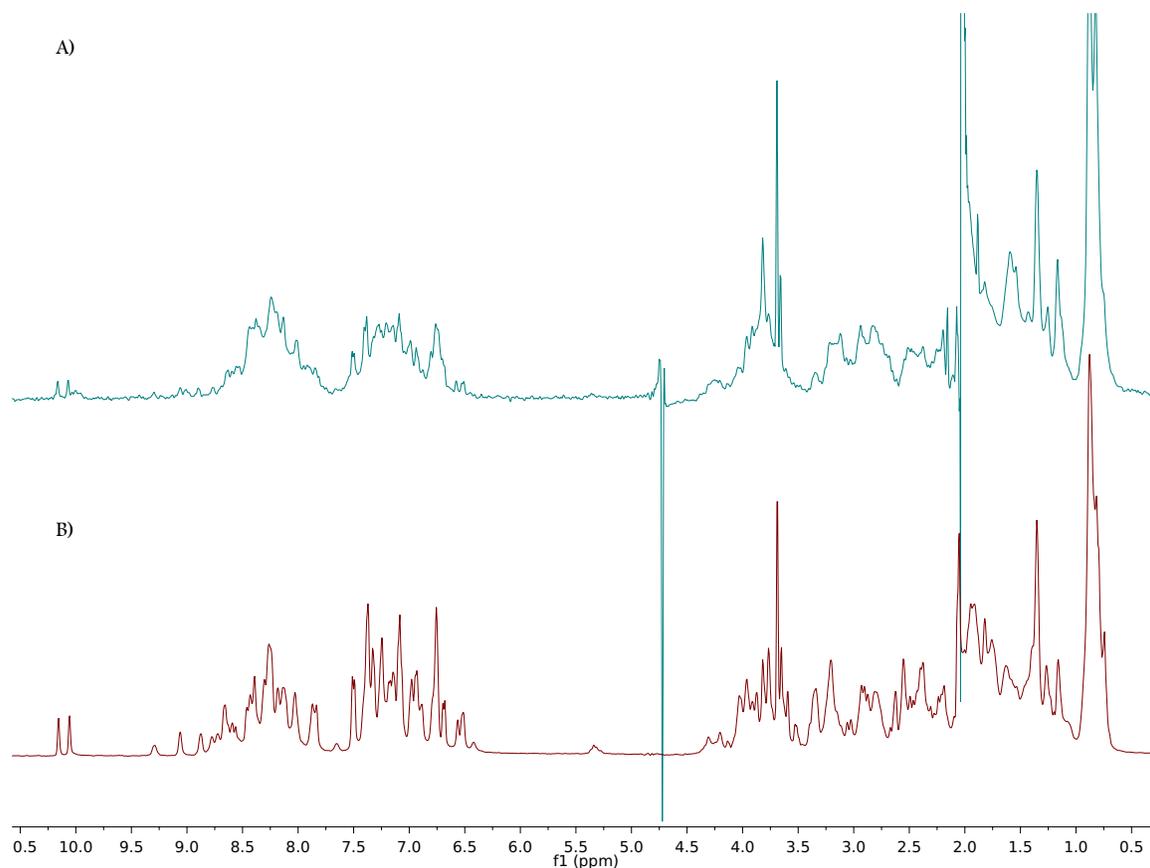
- Espectroscopia de resonancia magnética nuclear

En los experimentos unidimensionales de RMN de cada uno de los péptidos caracterizados se observa dispersión en las señales que aparecen de 6-9 ppm, las cuales corresponden a los hidrógenos de amida de la cadena principal, evidencia suficiente para corroborar que estos tienen un plegamiento definido (Figura 20). En el espectro también se observa las señales entre 6.5-8 ppm correspondientes a los hidrógenos aromáticos y en el rango de 1-4 ppm correspondientes a los hidrógenos alifáticos de las cadenas laterales. Los espectros correspondientes a la GS-M1D1 y GM-M2D1 presentan ligeramente menor resolución debido a que fueron obtenidos en el equipo de 500MHz. Los péptidos GS-Def1 y GM-M3D1 fueron obtenidos en un equipo de 700MHz. La dispersión de las señales de los HN de los aminoácidos se debe a que el ambiente químico de estos se encuentra definido gracias a la formación de los puentes de hidrógeno que se forman al generar una estructura secundaria.



**Figura 20.** Espectros unidimensional  $^1\text{H}$  RMN A) GS-Def1 a 700MHz B) GS-M1D1 a 500MHz C) GM-M2D1 a 500MHz y D) GM-M3D1 a 700MHz. En la imagen se puede apreciar en todos los casos la dispersión de las señales correspondientes a los protones de amida 6-9 ppm, lo que prueba que los 4 péptidos tienen un plegamiento definido.

Para mayor claridad, en la figura 21 se muestra la comparación del espectro de la GS-M1D1 con el de un péptido que no tiene un plegamiento definido. Si el péptido no presenta un plegamiento definido, se observa una acumulación de señales traslapadas en un rango menor de la ventana espectral. La figura 21 A) corresponde a uno de los picos minoritarios obtenidos en la purificación de la GM-M2D1 y la figura 21 B) muestra el espectro para la GS-M1D1.



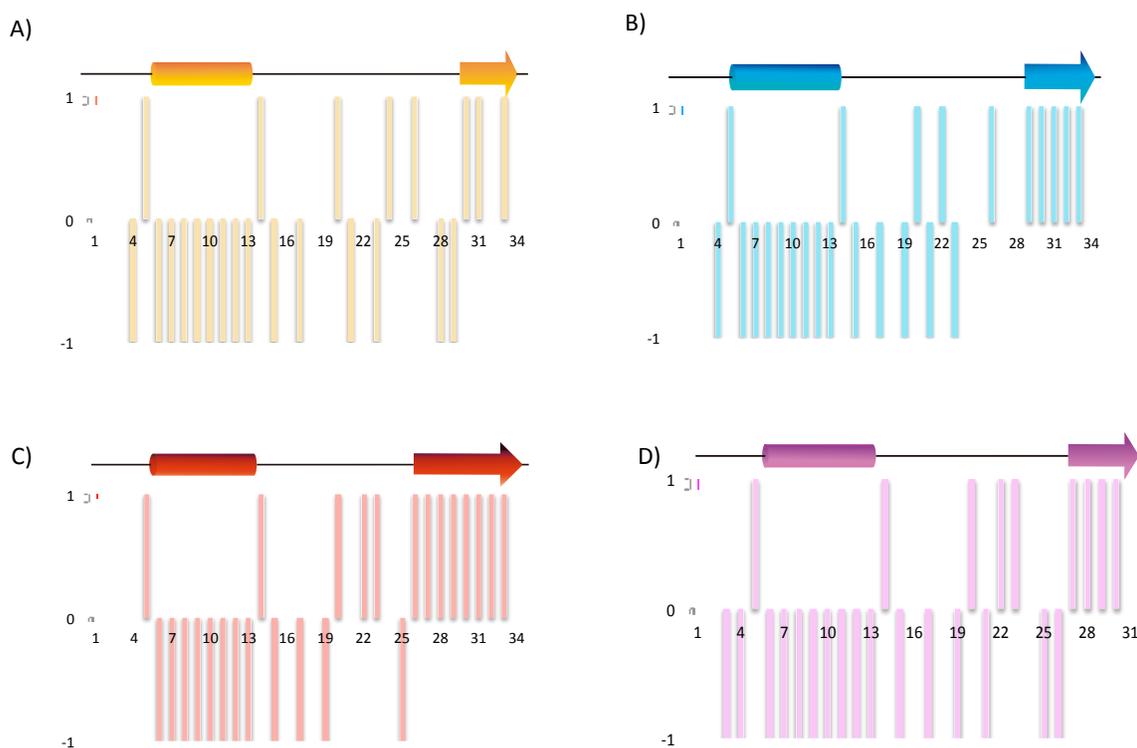
**Figura 21.** Comparación de espectros  $^1\text{H}$  RMN. A pesar de que los espectros fueron adquiridos en las mismas condiciones de pH, con el mismo número de barridos y ventana espectral en la figura A) se muestra el espectro  $^1\text{H}$  RMN de un péptido con poca dispersión de las señales de HN, lo cual sugiere fuertemente que este péptido no tiene plegamiento definido. En la figura B) se puede observar la dispersión de las señales de los protones de amida (HN) en un rango de 6.0 a 9.5 ppm de la GS-M1D1. Lo anterior corrobora que el péptido tiene un plegamiento definido.

Comparando estos espectros  $^1\text{H}$  RMN se corroboró que los péptidos purificados GS-Def1, GS-M1D1, GM-M2D1 y GM-M3D1 presentan dispersión y, por tanto, tienen un plegamiento definido.

Posteriormente, se obtuvieron y asignaron los espectros de RMN bidimensionales TOCSY, DQF-COSY y NOESY. Se interpretaron de 953, 916, 1133 y 848 señales pertenecientes a 32 de 34 sistemas de espín de los aminoácidos que conforman la estructura primaria de GS-Def1, GS-M1D1, GM-M2D1 y GM-M3D1. En la mayoría de las estructuras fue imposible asignar el aminoácido Trp24 debido a que este residuo se encuentra en una región

muy flexible de la estructura terciaria, lo que impide observar sus señales NOE.

Con los datos de la asignación de los espectros bidimensionales se realizaron las gráficas del índice de desplazamiento químico de los  $^1\text{H}_\alpha$ . Mediante las cuales se identificó la presencia de una hélice alfa próxima al extremo amino terminal y una hebra beta localizada en el extremo carboxilo terminal.



**Figura 22.** Estructuras de RMN y gráficas de índice de desplazamiento de los  $^1\text{H}_\alpha$ . En esta figura se muestra una de las 20 estructuras de menor energía para los péptidos A) GS-Def1 B) GS-M1D1 C) GM-M2D1 D) GM-M3D1.

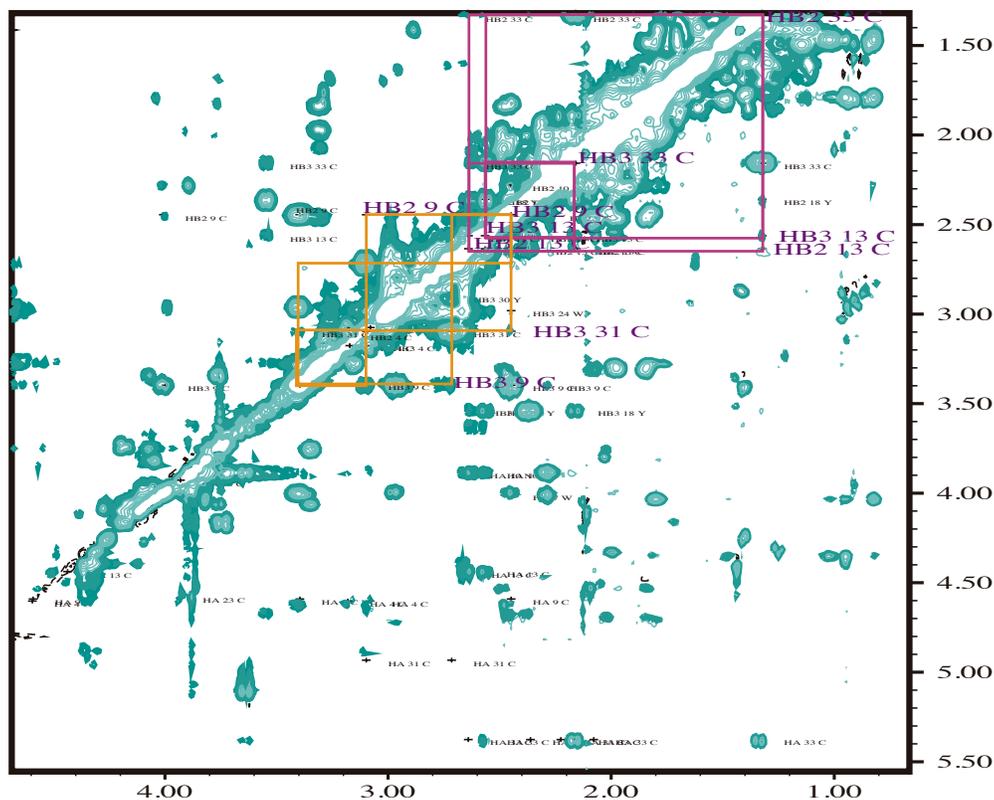
Las restricciones de distancia se obtuvieron mediante la integración de las señales NOE, pues la intensidad de la señal NOE es proporcional al inverso de la distancia entre los núcleos observados a la sexta potencia. Teniendo las restricciones de distancia a corto, mediano y largo alcance obtenidas en el espectro NOESY (tabla 4) y con la secuencia primaria de cada péptido se realizaron los cálculos de ángulos de torsión con el programa CYANA2.0 para la obtención de las estructuras de los péptidos GS-Def1, GS-M1D1, GM-M2D1

y GM-M3D1 bajo estudio.

Adicionalmente, la conectividad entre cisteínas C1–C4, C2–C5 y C3–C6 fue corroborada al identificar interacciones NOE H $\beta$ -H $\beta$  para al menos dos pares de cisteínas en cada estructura. En el caso del péptido GS-M1D1 (Figura 23) se observan las correlaciones (C2-C5 y C3-C6), lo cual en conjunto con el análisis de masas sugieren fuertemente la existencia de los tres enlaces disulfuro que estabilizan la estructura terciaria.

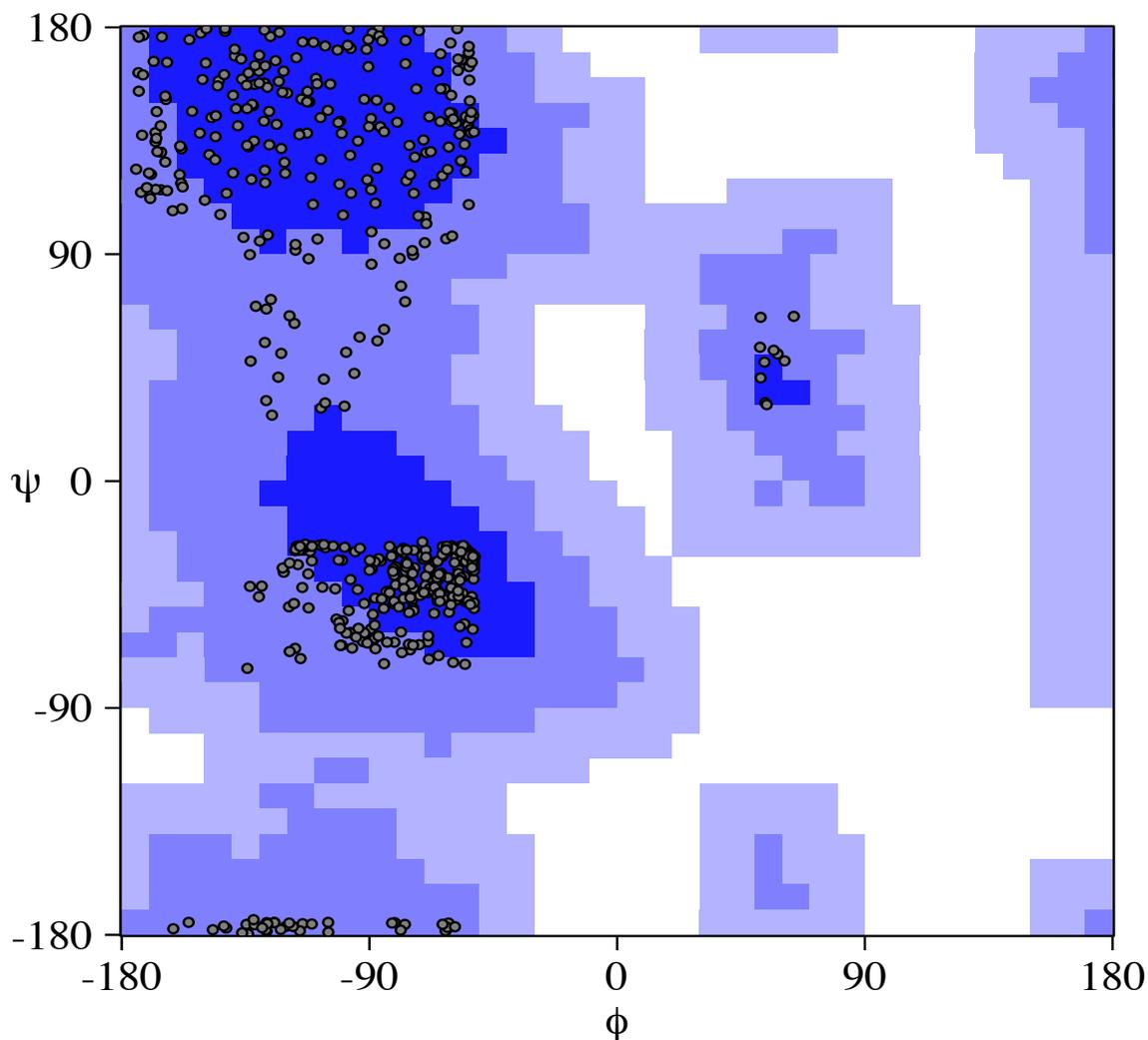
**Tabla 4.** Restricciones de distancia obtenidas en el programa CYANA 1.5. En la tabla se observan el número de restricciones de distancia obtenidas para la determinación de la estructura terciaria de cada uno de los cuatro péptidos de interés.

Restricciones de distancia	GS-Def1	GS-M1D1	GM-M2D1	GM-M3D1
Total	350	291	415	277
Vecinales $ i - j  \leq 1$	201	198	250	189
Mediana distancia $1 <  i - j  < 5$	70	54	73	51
Larga distancia $ i - j  \geq 5$	79	39	92	37
Función objetivo	0	0	0	0
RMSD	0.61	1.0	0.66	0.92



**Figura 23.** Espectro NOESY de la GS-M1D1 donde se observa la conectividad entre cisteínas mediante las interacciones  $H\beta$ - $H\beta$ . Se muestra la conectividad entre Cys9-Cys31(C2-C5) y Cys13-Cys33(C3-C6) marcados con los recuadros naranja y rosa respectivamente.

Se obtuvieron por cada uno de los péptidos estudiados un ensamble de 500 estructuras de las cuales se seleccionan 20 estructuras que cumplieran con las restricciones de distancia y de ángulos de torsión como se muestra en los gráficos de Ramachandran. En la figura 24, se muestra el gráfico de Ramachandran para las 20 estructuras obtenidas en el cálculo en CYANA de la GS-M1D1, obteniéndose que el 69.8% de los ángulos diedros se encuentran en regiones muy favorecidas (azul) y 30.2 % se encuentran en regiones permitidas (azul claro) 0% se encuentran en regiones generosamente permitidas y no permitidas.



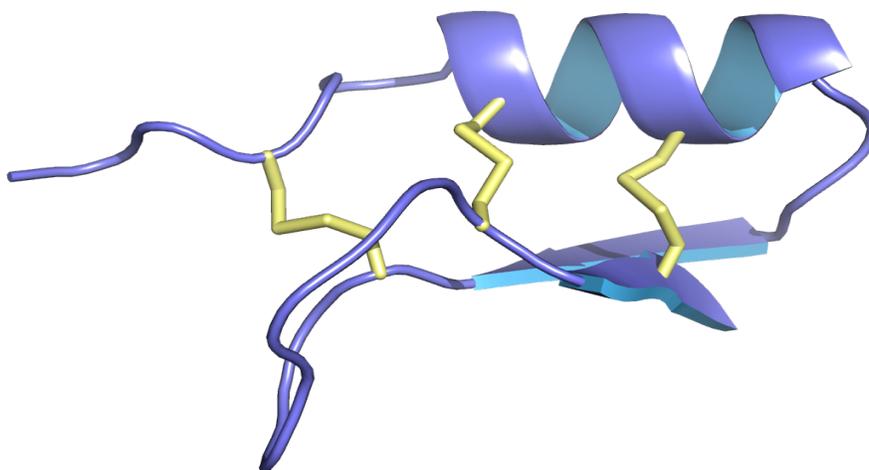
**Figura 24.** Gráfico de Ramachandran del conjunto de 20 estructuras de la GS-M1D1 calculadas en CYANA. Las zonas en blanco son no permitidas, las azul claro son generosamente permitidas, las azul medio son adicionalmente permitidas y las azul intenso son favorecidas. El 69.8% de las combinaciones de ángulos  $\psi$  y  $\phi$  están dentro de la región más favorecida.

En la tabla 5 se muestran los mismos porcentajes evidenciados en los gráficos de Ramachandran para las cuatro estructuras calculadas. En el caso de la GS-Def1 se observa que presenta 0.2% en regiones no permitidas este resultado se debe a un residuo de glicina por lo que no debe considerarse como un efecto alarmante.

**Tabla 5.** Comparación de los porcentajes de las combinaciones de ángulos  $\psi$  y  $\phi$  en cada región del gráfico de Ramachandran para las estructuras GS-Def1-GSM1D1, GM-M2D1 y GM-M3D1

	GS-Def1	GS-M1D1	GM-M2D1	GM-M3D1
% en regiones muy favorecidas	59.5%	69.8 %	67.1%	63.1%
% en regiones permitidas	40.3%	30.2%	32.9%	36.9%
% en regiones generosamente permitidas	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
% en regiones prohibidas	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%

Todas las estructuras calculadas muestran el motivo CS- $\alpha/\beta$  característico tanto para defensinas como para algunas toxinas bloqueadoras de canales de potasio. Por ejemplo, en el caso de la GS-M1D1, los cálculos computacionales muestran como se ve en la figura 25 una estructura terciaria formada por una hélice  $\alpha$  (Ser8-Arg16) conectada a una hoja beta formada por dos hebras antiparalelas (Arg19-Lys22) y (Gln30-Gln34).



**Figura 25.** Estructura obtenida mediante el programa CYANA para la GS-M1D1. En la presente se observa el motivo estructural CS- $\alpha/\beta$

En la tabla 6 se muestran los aminoácidos que conforman las estructuras secundarias de las cuatro estructuras obtenidas. Las interacciones experimentales  $d_{NN}$  ( $i,i+1$ ), ( $i,i+2$ ),  $d_{\alpha N}$  ( $i,i+3$ )( $i,i+4$ ),  $d_{\beta N}$  ( $i,i+1$ ),  $d_{\alpha\beta}$  ( $i,i+3$ ) y los resultados generados por el método del índice de desplazamiento químico confirman la formación de una hélice alfa en el extremo amino terminal y una hebra beta en el carboxilo terminal. Utilizando el método de ICS únicamente se pudo distinguir la presencia de una hebra beta, debido a que al no ser posible la identificación del 100% de los sistemas de espín no se pudo asignar el índice de desplazamiento químico correspondiente a cada aminoácido.

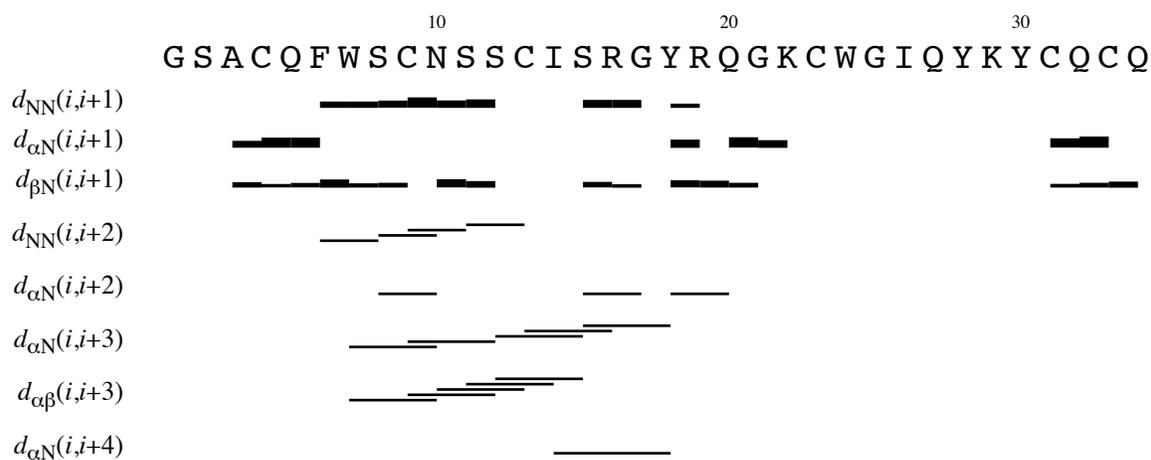
**Tabla 6.** Aminoácidos que conforman el motivo estructural  $\alpha/\beta$  en cada uno de los péptidos caracterizados

	Helice $\alpha$	Hoja $\beta$		Asa
	$\alpha$ -Helix	Hebra I.	Hebra II.	
GS-Def1	6Phe-16Arg	21Gly-23Cys	31Cys-33Cys	24Trp-30Tyr
GS-M1D1	8Ser-16Arg	19Arg-22Lys	32Gln-34Gln	23Cys-31Cys
GM-M2D1	6Phe-16Arg	19Arg-23Cys	31Cys-34Tyr	24Trp-30Tyr
GM-M3D1	6Phe-16Arg	21Gly-23Cys	28Cys-31Tyr	24Trp-27Tyr

Los valores de RMSD de las estructuras GS-Def1, GS-M1D1, GM-M1D1, GM-M2D1 y GM-M3D1 fueron calculados considerando los átomos de la cadena

principal a partir del aminoácido 4 al 33 y sus valores son 0.61, 1.0, 0.66 y 0.92 Å, respectivamente.

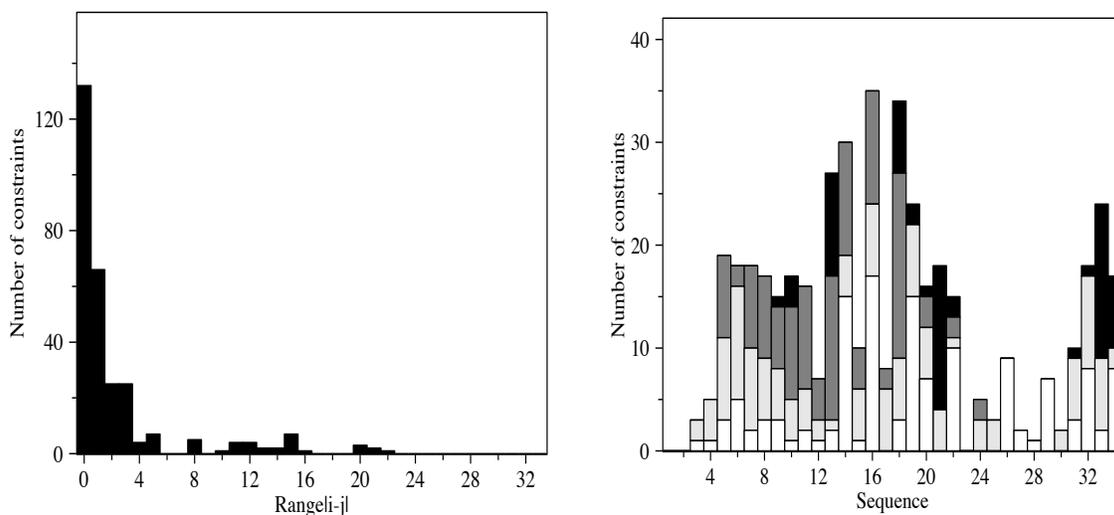
En la figura 26 se muestran las correlaciones de las señales NOE para cada aminoácido ( $i$ ) del péptido GS-M1D1 con sus aminoácidos secuenciales ( $i,i+1$ ) y los sucesivos ( $i,i+2$ ), ( $i,i+3$ ) e ( $i,i+4$ ) para los núcleos  $1H\alpha$ ,  $1H\beta$  y  $1HN$ . La intensidad de la interacción es proporcional al grosor de la línea. En este gráfico se puede corroborar las interacciones debidas a la presencia de los motivos estructurales.



**Figura 26.** Interacciones de las señales NOEs presentes en la estructura de la GS-M1D1. Con este gráfico se puede identificar con facilidad los aminoácidos que se encuentran constituyendo la hélice alfa ya que presentan interacciones ( $d_{NN} i, i + 1$ ), ( $d_{\alpha\beta} (i, i + 3)$ ), ( $d_{\alpha N} i, i + 3$ ), ( $d_{\alpha N} i, i + 4$ )

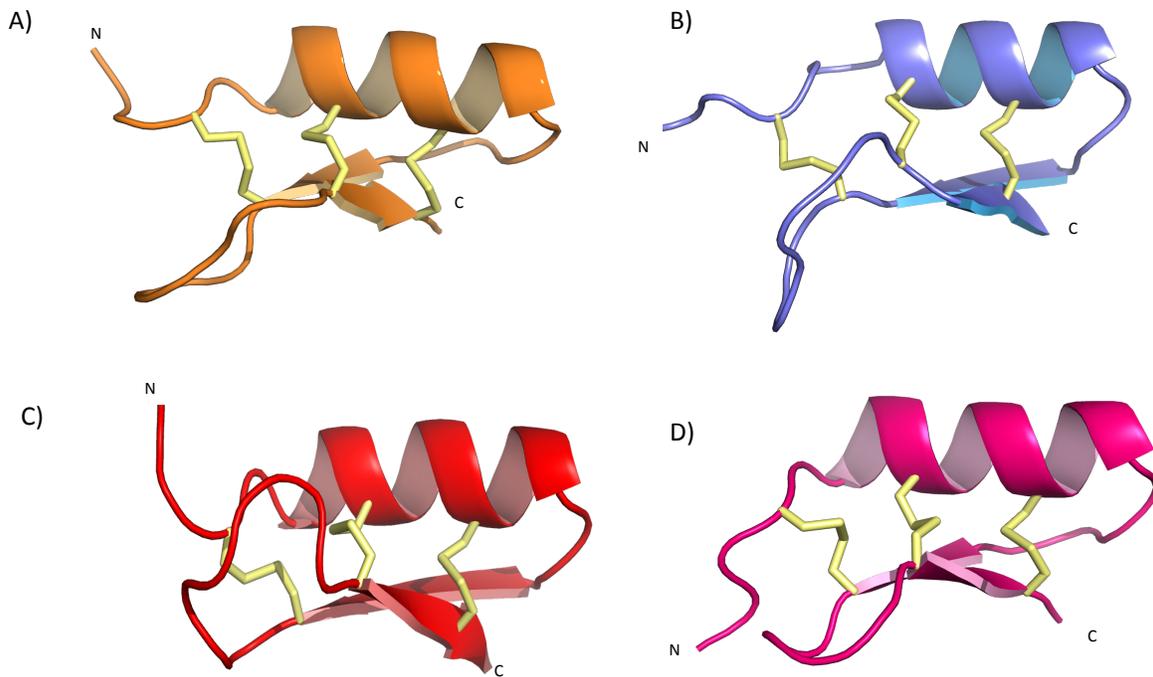
El número y tipo de restricciones de distancias empleadas en el cálculo de la estructura secundaria y terciaria para la GS-M1D1 se muestran en la figura 27 A). En ella se observa la cantidad de restricciones utilizadas para cada rango de distancias definido como el valor absoluto de la diferencia entre los índices de los aminoácidos para los cuales se establece una correlación NOE. Se puede apreciar que existe un mayor número de restricciones secuenciales que a larga distancia. En la figura 27 B) se muestra el tipo de interacciones identificadas en cada uno de los aminoácidos de la secuencia primaria el color de las barras en este gráfico representa el tipo de interacción: en color blanco se representan las restricciones NOE intra residuo ( $|i-j|=0$ ); en gris claro las

restricciones de corto alcance ( $|i-j|=1$ ); gris oscuro las correlaciones de mediano alcance ( $1 < |i-j| < 5$ ) y de color negro las correlaciones de largo alcance ( $|i-j| \geq 5$ )



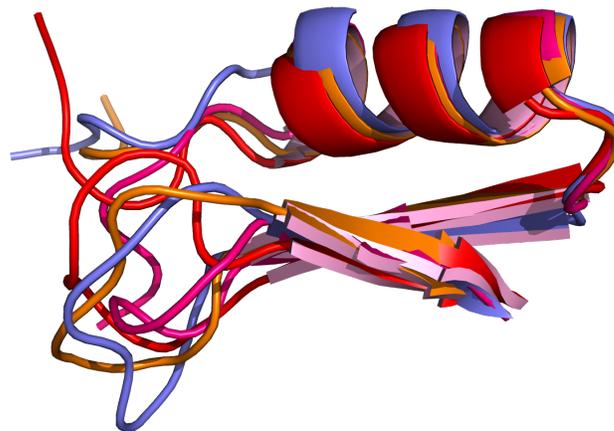
**Figura 27.** Cantidad y tipo de restricciones de distancia con las que se obtuvo el modelo estructural de la GS-M1D1. En la gráfica A) se muestra el número de restricciones contra la diferencia entre el índice de los aminoácidos. En la B) muestran los tipos de interacción de los residuos: en blanco indica interacciones NOE intrarresiduo, en gris claro las interacciones de corto alcance (entre protones de aminoácidos secuenciales), en gris oscuro de mediano alcance y el negro las de largo alcance.

Finalmente, se realizó el afinamiento por dinámica molecular con el programa AMBER 16 para cada conjunto de estructuras derivado del programa CYANA. Obteniendo de este modo las estructuras de los péptidos cuya energía sea mínima tomando en consideración las interacciones de estos con el disolvente en este caso agua. En la figura 28 se muestran las estructuras de menor energía para los cuatro péptidos (GS-Def1, GS-M1D1, GM-M2D1, GM-M3D1). Las coordenadas atómicas y las restricciones de dichas estructuras fueron depositadas en el PDB con los número de entrada son: 6B9W, 6BAM, 6BB6 y 6BI5, respectivamente



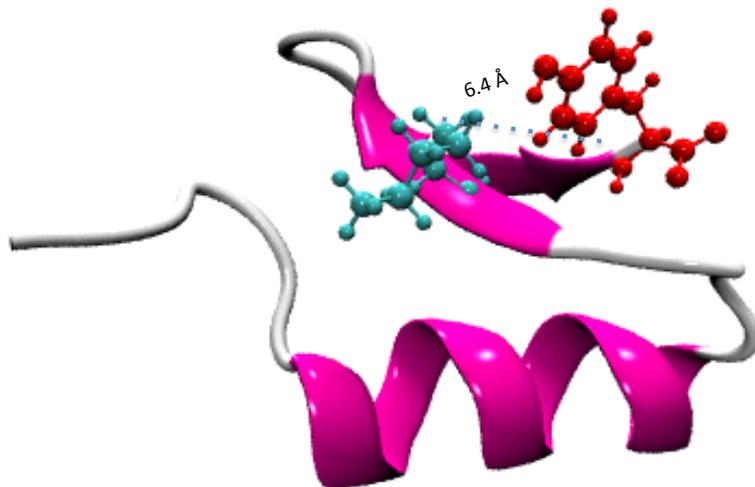
**Figura 28.** Estructuras de menor energía obtenidas después del afinamiento con AMBER. Se observa la conservación del motivo CS- $\alpha/\beta$ , en amarillo se encuentran los enlaces disulfuro que estabilizan dicho motivo estructural. Para las cuatro estructuras la conectividad entre las cistinas es: Cys1-Cys4, Cys2-Cys5 y Cys3-Cys6.

La conservación del motivo CS- $\alpha/\beta$  en todas las estructuras corrobora que las mutaciones realizadas no afectan las estructuras secundarias. (Figura 29)



**Figura 29.** Sobreposición de las estructuras secundarias de la GS-D1,GS-M1D1,GM-M2D1 y GM-M3D1.

La estructura de la M3D1 además de conservar el motivo estructural presenta los aminoácidos Y20K y Q32Y a una distancia de 6.4 Å medida entre los carbonos alfa, los cuales guiarán el cambio de actividad (Figura 30). De acuerdo con la teoría de la diada funcional este péptido podría presentar la actividad esperada.

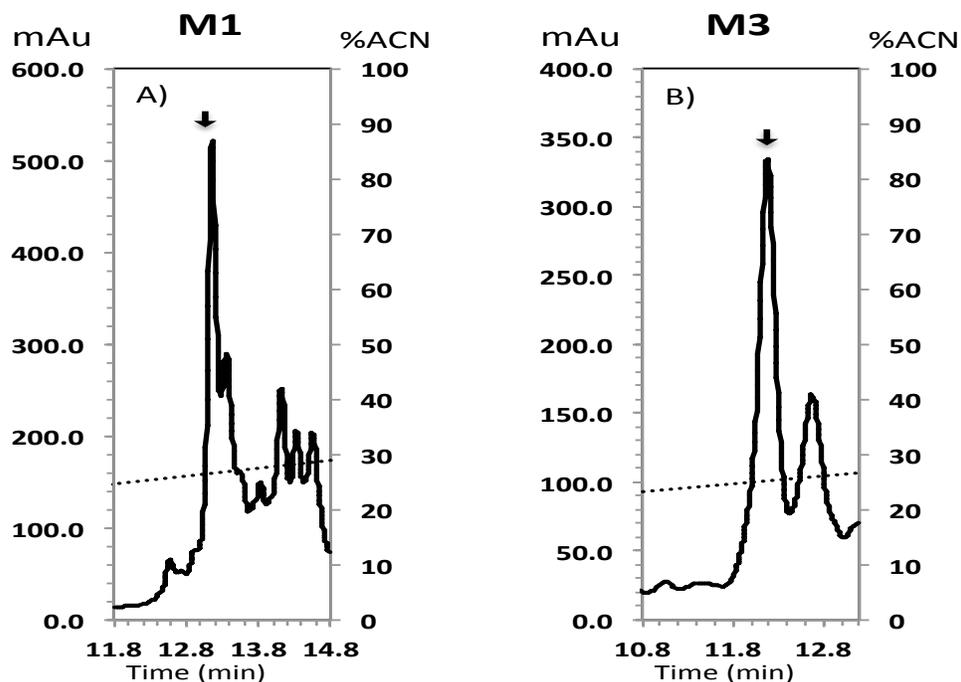


**Figura 30.** Estructura terciaria de la GM-M3D1. Se resaltan los aminoácidos que se espera participen activamente en el cambio funcional en azul el aminoácido Lys 20 y en rojo el Tyr 32, los cuales se encuentran a una distancia de 6.4 Å es decir, dentro de los límites observados en toxinas de acuerdo con la teoría de la diada funcional.

- Reacción de corte con CNBr

La reacción de corte con CNBr se llevó a cabo con los péptidos GM-M1D1, GM-M2D1 y GM-M3D1. Sin embargo, la reacción no procedió con rendimientos satisfactorios en todos los casos. Únicamente, pudieron obtenerse los péptidos M1D1 y M3D1 libres del fragmento GM- y con rendimientos inferiores al 5%, este resultado podría ser atribuido a las condiciones extremas de pH en el que se desarrolla la reacción. En el caso del péptido M2D1 no se logró llevar a cabo la reacción, probablemente debido a que la metionina se encuentre poco expuesta impidiendo la reacción de corte. En la figura 31 se muestra la purificación mediante cromatografía en fase reversa de estos dos péptidos. Los cromatogramas ilustran la obtención de varios picos cromatográficos, lo

que indica que en la reacción no se obtiene un único producto, en ambos casos el pico mayoritario corresponde al péptido de interés.



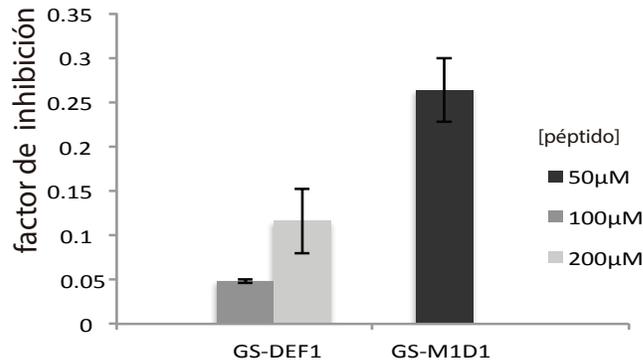
**Figura 31.** Purificación de la reacción de corte con CNBr para la obtención de los péptidos M1D1 y M3D1 libres del residuo GM-. La purificación se llevó a cabo por cromatografía de fase reversa utilizando una columna Proteo C12.

- Prueba de actividad antibacteriana y en canales iónicos regulados por voltaje

En cuanto a las pruebas de actividad antibacteriana los péptidos: GS-Def1, GS-M1D1, GM-M1D1, GM-M2D1 y GM-M3D1 no muestran ser activos contra las cepas utilizadas. Este resultado era de esperarse ya que en trabajos previos la actividad antibacteriana de la Def1 fue identificada como actividad cooperativa, al hacerse evidente en presencia de otros dos péptidos extraídos de la hemolinfa del escorpión[33].

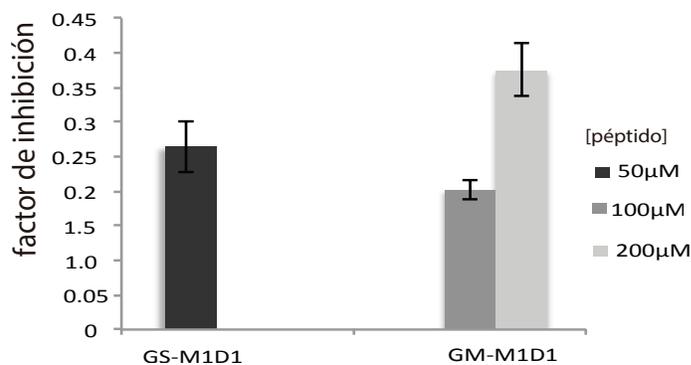
El ensayo de actividad bloqueadora sobre el canal Kv1.3 muestra que se indujo exitosamente la modificación de actividad gracias a las mutaciones realizadas. El péptido GS-Def 1 exhibe muy poca actividad (menor al 5%) medida a una concentración de 100 $\mu$ M. La primera mutación Y20K, es

decir la presencia del residuo positivo de la diada funcional, influye fuertemente en dicho cambio de actividad incrementando el bloqueo del canal hasta un 26% empleando 50  $\mu\text{M}$  de GS-Def1 (Figura 32) y 20% con 100 $\mu\text{M}$  de GM-M1D1.



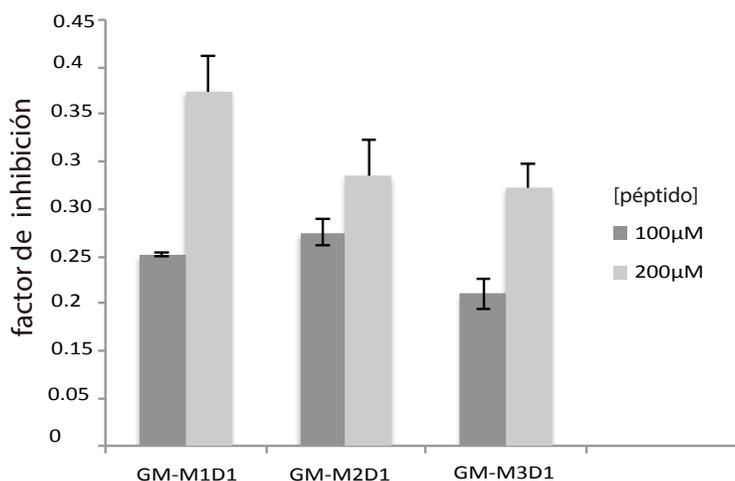
**Figura 32.** Actividad de los péptidos GS-DEF1 y GS-M1D1 frente al canal KV1.3. El cambio de actividad es atribuido exclusivamente a la mutación Y20K.

Es importante destacar que la presencia del aminoácido metionina en el N-terminal disminuye considerablemente la actividad del péptido sobre el canal como se puede observar en la figura 33. Al comparar las dos versiones de la primer mutante de la defensina 1 con GS- y GM- en su extremo N-terminal, se observa que la actividad decae de 25% a 50  $\mu\text{M}$  para la GS-M1D1 y a 20% para la GM-M1D1 cuando se ensaya al doble de esta concentración (100  $\mu\text{M}$ ) sugiriendo que el extremo N-terminal tiene un papel importante en la interacción toxina-canal.



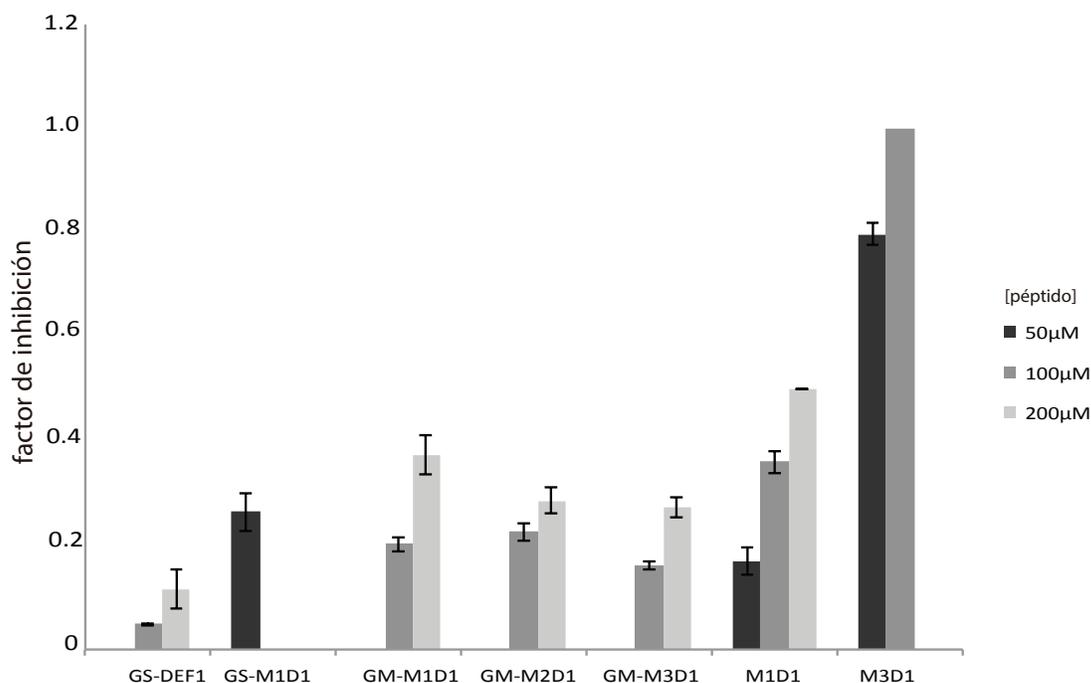
**Figura 33.** Influencia de los residuos GS- y GM- en la actividad de la M1D1. Se puede observar la influencia en la actividad del aminoácido metionina en el extremo N-terminal.

Por otro lado, al comparar la serie de los péptidos que contienen los residuos GM- se ve el efecto de las mutaciones en la actividad (Figura 34). Aparentemente la segunda mutación (Q32Y), es decir la introducción del residuo aromático de la diada funcional y la delección de los aminoácidos IQY no afecta de manera significativa la actividad cuando el péptido probado presenta los residuos GM- . Probablemente el tamaño de la metionina afecta en la correcta interacción toxina-canal.



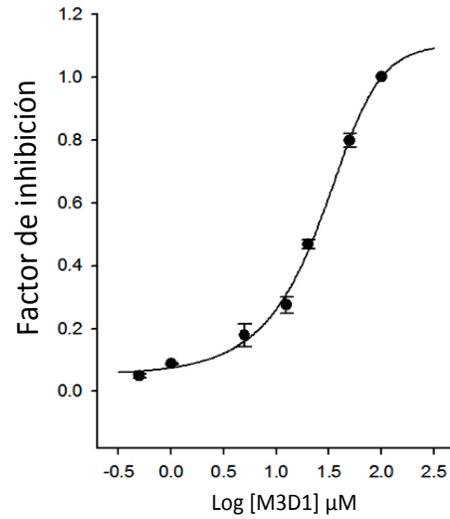
**Figura 34.** Comparación de la actividad de los péptidos GM-M1D1 GM-M2D1 y GM-M3D1. En esta figura se puede observar la comparación de la actividad de dichos péptidos a concentraciones de 100 μM (barras de color gris oscuro) y 200 μM (barras de color gris claro).

Sin embargo, cuando el amino terminal no tiene algún residuo extra se corrobora la verdadera influencia de las mutaciones sobre la actividad. El péptido M3D1, el cual tiene los dos aminoácidos que forman la diada funcional (Y20K, Q32Y) y la delección IQY que le permitirá tener el tamaño adecuado para introducirse al poro del canal, muestra tener mucha mayor actividad, llegando incluso a bloquear el 79% del canal con tan sólo 50µM del péptido libre; mostrando nuevamente que el extremo N- terminal desempeña un papel importante en la interacción con el canal iónico. En la figura 35 se presentann de manera conjunta los resultados de bloqueo obtenidos para cada péptido probado.



**Figura 35.** Gráficas de actividad frente al canal Kv1.3. En la gráfica Se presenta la actividad de los péptidos GS-DEF1, GSM1D1, GM-M1D1, GM-M2D1 y GM-M3D1 de acuerdo a la concentración probada. La gráfica muestra que al realizar las mutaciones sobre la def1 se indujo un cambio efectivo en la actividad de dicha molécula.

Finalmente, después de corroborar el cambio de actividad se obtuvo la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) para el péptido M3D1 frente al canal Kv1.3 de humano el cual es de 20µM (Figura 36)



**Figura 36.** Curva de relación dosis respuesta del péptido M3D1 sobre el canal Kv1.3.

A partir de estos resultados corroboramos que las mutaciones realizadas provocaron exitosamente el cambio de actividad deseado, promoviendo una mayor actividad tipo toxina en el nuevo péptido sintetizado a partir de la Def1, todo ello sin alterar de manera sustancial el plegamiento.

### Conclusiones

Las mutaciones realizadas no afectaron el motivo estructural característico para defensinas de insecto y toxinas bloqueadoras de los canales de potasio; ya que todos los péptidos caracterizados conservan el motivo estructural conformado por una hélice alfa y una hoja beta antiparalela, estabilizadas mediante tres enlaces disulfuro, y cuya conectividad : Cys1–Cys4, Cys2–Cys5 y Cys3–Cys6 fue corroborada mediante RMN.

El cambio de actividad en los péptidos purificados es una prueba más sobre la posible relación evolutiva entre defensinas y toxinas. Además, se corroboró que la actividad tipo toxina bloqueadora del canal Kv1.3 depende tanto del tamaño de la toxina, como de la presencia de ciertos aminoácidos clave, según lo establece la teoría de la diada funcional. Se reconoció que la presencia del aminoácido Lys en la posición 20 contribuye en mayor medida con el aumento de actividad y que ésta se ve afectada por la presencia de residuos extra en el extremo amino terminal, sugiriendo que la presencia de estos disminuye la calidad de interacción entre toxina y canal.

### Perspectivas

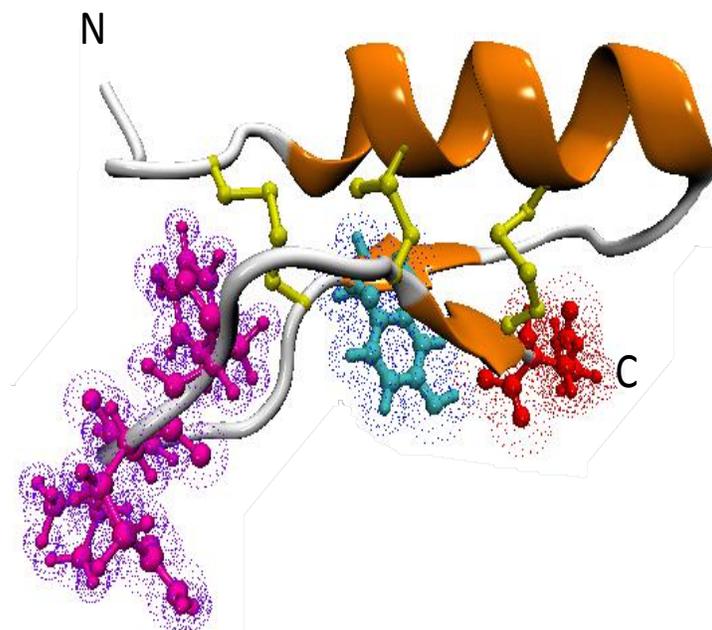
- Realizar la mutación en el gen de la GS-Def1 para poder obtener el péptido GM-Def1.
- Obtener y purificar el péptido GM-Def1 para corroborar la influencia de los residuos GM- en el N-terminal.
- Probar distintas condiciones de la reacción de corte con CNBr para lograr obtener los péptidos Def1 y M2D1 libres del fragmento GM- y mejorar los rendimientos obtenidos en la obtención de los péptidos M1D1 y M3D1.
- Realizar pruebas de actividad sobre el canal Kv1.3 con los péptidos De1 y M2D1.
- Realizar modelados de la interacción péptido canal para poder explicar los cambios de actividad observados

## Referencias

- [1] T. Creighton, *The Biophysical Chemistry of Nucleic Acids & Proteins*. 2010.
- [2] F. C. Escobedo-González, “Expresión, purificación y caracterización por Resonancia Magnética Nuclear de la doble mutante Y20K, Q32Y de la defensina 1 del alacrán *Centruroides limpidus limpidus*,” UNAM, 2015.
- [3] J. Boyle, “Lehninger principles of biochemistry (4th ed.): Nelson, D., and Cox, M.,” *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, vol. 33, no. 1, pp. 74–75, 2005.
- [4] R. Carrascoza, Francisco; Zaric, Snezana; Silaghi-Dumitrescu, “Computational study of protein secondary structure elements: Ramachandran plots revisited,” *J. Mol. Graph. Model.*, vol. 50, pp. 125–133, 2014.
- [5] L. Hernández-Aponte, C.; Silva-Sanchez, J.; Quintero-Hernández, V.; Rodríguez-Romero, A.; Balderas, C.; Possani, “Vejovine, a new antibiotic from the scorpion venom of *Vaejovis mexicanus*,” *Toxicon*, vol. 57, no. 1, pp. 84–92, 2011.
- [6] L. Luyang, Cao; Chao, Dai; Zhongjie, Li; Zheng, Fan; Yu, Song; Yingliang, Wu; Zhijian, Cao; Wenxin, “Antibacterial Activity and Mechanism of a Scorpion Venom Peptide Derivative In Vitro and In Vivo,” *PLoS One*, vol. 7, no. 7, p. e40135, 2012.
- [7] M. Zasloff, “Antimicrobial peptides of multicelular organisms,” *Nature*, vol. 415, no. January, pp. 389–395, 2002.
- [8] S. Castañeda, C.; J. Ortega-roque; Aquino A.; Serafin-lópez A.; Estrada-parra J.; Estrada, “Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones,” vol. 18, pp. 16–29, 2009.
- [9] L. E. C. Rivera, A. P. Ramos, and C. P. Desgarenes, “Artículo de revisión Péptidos antimicrobianos: antibióticos naturales de la piel,” *Dermatología Rev. Mex.*, vol. 51, pp. 57–67, 2007.
- [10] R. I. Lehrer and T. Ganz, “Defensins of vertebrate animals,” *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 14, no. 1, pp. 96–102, 2002.
- [11] P. Gutierrez and S. Orduz, “Péptidos antimicrobianos: Estructura, funcion y aplicaciones,” *Actual. Biológicas*, vol. 25, no. 78, pp. 5–15, 2003.
- [12] G. A. Téllez and J. C. Castaño, “Péptidos antimicrobianos,” *Infectio*, vol. 14, no. 1, pp. 55–67, 2010.
- [13] T. Ganz, “Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 3, no. 9, pp. 710–720, 2003.
- [14] T. Ganz and R. I. Lehrer, “Defensins,” *Pharmacol. Ther.*, vol. 66, no. 2, pp. 191–205, 1995.
- [15] A. Cederlund, G. H. Gudmundsson, and B. Agerberth, “Antimicrobial peptides important in innate immunity,” *FEBS J.*, vol. 278, no. 20, pp. 3942–3951, 2011.
- [16] E. A. D. S. F. Linqi Zhang; Wenjie Yu; Tian He; Jian Yu; Rebecca E.; Caffrey and Thang Pham; Jianfeng Mei; Jaelyn J. Ho; Wenyong Zhang; Peter Lopez; David Ho, “Contribution of Human -Defensin 1, 2, and 3 to the Anti-HIV-1 Activity of CD8 Antiviral Factor,” *Science (80- )*, vol. 298, no. 5595, pp. 995–1000, 2002.
- [17] S. H. White, W. C. Wimley, and M. E. Selsted, “Structure , function , and membrane integration of defensins,” pp. 521–527.
- [18] R. . I. Leonova, L; Kokryakov, V.; Aleshina, G.; Hong, T.; Nguyen, T.; Zhao, C.; Waring, J. Lehrer, “Circular minidefensins and posttranslational generation of molecular diversity,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 70, no. 3, pp. 461–4, 2001.
- [19] A. de O. Carvalho and V. M. Gomes, “Plant defensins-Prospects for the biological functions and biotechnological properties,” *Peptides*, vol. 30, no. 5, pp. 1007–1020, 2009.
- [20] O. L. Dias, R. De O.; Franco, “Cysteine-stabilized  $\alpha\beta$  defensins: From a common fold to antibacterial activity,” *Peptides*, vol. 72, pp. 64–72, 2015.
- [21] S. Seebah *et al.*, “Defensins knowledgebase: a manually curated database and information source focused on the defensins family of antimicrobial peptides,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. Database, pp. D265–D268, 2007.
- [22] C. . Bontems, F.; Roumestand and P. Boyot, “Three-dimensional structure of natural charybdotoxin in aqueous solution by 1H-NMR,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 28, p. 0, 1991.
- [23] V. Quintero-Hernández, J. M. Jiménez-Vargas, G. B. Gurrola, H. H. Valdivia, and L. D. Possani, “Scorpion venom components that affect ion-channels function,” *Toxicon*, vol. 76, pp. 328–342, 2013.
- [24] L. . Y. Meng, L.; Xie, Zili, Z.; Qian and Y. Y.; Fan, Ch.; Zongyun ,L.; Cao, W.; Wu, Z.; Wu, “Scorpion potassium channel-blocking defensin highlights a functional link with neurotoxin,” *J. Biol. Chem.*, vol. 291, no. 13, pp. 7097–7106, 2016.
- [25] K. . G. Tytgat, J; Chandy and L. D. L.; Garcia, Maria; Gutman, George; France, Van Der Walt; Possani, “A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: ??-KTx molecular subfamilies,” *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 20, no. 11, pp. 444–447, 1999.
- [26] W. a. Catterall, S. Cestèle, V. Yarov-Yarovoy, F. H. Yu, K. Konoki, and T. Scheuer, “Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins,” *Toxicon*, vol. 49, no. 2, pp. 124–141, 2007.
- [27] Jiménez J.; Possani L. D.; Luna K., “Arthropod toxins acting on neuronal potassium channels,” *Neuropharmacology*, vol. 127, pp. 139–160, 2017.
- [28] B. Mackinnon, R.; Guy, C. L.; Rev, A.; Hughes, M. A.; Dunn, M. A.; Cohen, S.; Kuo, A.; Lee, A.; Chait, “Structural Conservation in Prokaryotic and Eukaryotic Potassium Channels Structural Conservation in Prokaryotic and Eukaryotic Potassium Channels,” vol. 106, no. 1998, pp. 106–109, 2008.
- [29] E. Zlotkin, *Scorpion Venoms*. 2005.
- [30] W. Y. M. Chang X.; Tian L.; Lingna X.; Congya Y.; Zhijian C.; Li, “Kv1.3 potassium channel-blocking toxin Ctri9577, novel gating modifier of Kv4.3 potassium channel from the scorpion toxin family,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 444, no. 3, pp. 406–410, 2014.

- [31] B. Jouirou, S. Mouhat, N. Andreotti, M. De Waard, and J. M. Sabatier, "Toxin determinants required for interaction with voltage-gated K<sup>+</sup> channels," *Toxicol.*, vol. 43, no. 8, pp. 909–914, 2004.
- [32] E. H. A. Dauplais M.; Lecoq A.; Song J.; Cotton J.; Jamin N.; Gilquin B.; Roumestand C.; Vita C.; de Medeiros C.; Rowan and M. A., "On the Convergent Evolution of Animal Toxins," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 7, pp. 4302–4309, 1997.
- [33] R. C. Rodríguez de la Vega, B. I. García, C. D'Ambrosio, E. Diego-García, a. Scaloni, and L. D. Possani, "Antimicrobial peptide induction in the haemolymph of the Mexican scorpion *Centruroides limpidus limpidus* in response to septic injury," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 61, no. 12, pp. 1507–1519, 2004.
- [34] J. Shakkottai, V. G.; Regaya, J.; Wulff, H.; Fajloun, Z.; Tomita, S.; Fathallah, M.; Cahalan, M. D.; Gargus, "Design and Characterization of a Highly Selective Peptide Inhibitor of the Small Conductance Calcium-activated K<sup>+</sup> Channel, SkCa2," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 46, pp. 43145–43151, 2001.
- [35] W. Syed Abid A.; Alam M.; Abbasi A.; Kalbacher H.; Schaechinger J.; Zhijian, C.; Li, W.; Voelter, "Structure-activity relationship of a highly selective peptidyl inhibitor of kv1.3 voltage-gated K<sup>+</sup>-channel from scorpion (*B. sindicus*) venom," *Int. J. Pept. Res. Ther.*, vol. 20, no. 1, pp. 19–32, 2014.
- [36] M. S. J. M'Barek, S.; Mosbah, A.; Sandoz, G.; Fajloun, Z.; Olamendi-Portugal, T.; Rochat, H.; Sampieri, F.; Guijarro, J.; Mansuelle, P.; Delepierre, M.; De Waard, "Synthesis and characterization of Pi4, a scorpion toxin from *Pandinus imperator* that acts on K<sup>+</sup> channels," *Eur. J. Biochem.*, vol. 270, no. 17, pp. 3583–3592, 2003.
- [37] J.-M. Mouhat, Stéphanie; Mosbah, Amor; Visan, Violeta; Wulff, Heike; Delepierre, Muriel; Darbon, Hervé; Grissmer, Stephan; De Waard, Michel; Sabatier, "The 'functional' dyad of scorpion toxin Pi1 is not itself a prerequisite for toxin binding to the voltage-gated Kv1.2 potassium channels.," *Biochem. J.*, vol. 377, no. Pt 1, pp. 25–36, 2004.
- [38] B. Mouhat, Stéphanie; Jouirou, M. Mosabah, Amor; De Waard, and J.-M. Sabatier, "Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels," *Biochem. J.*, vol. 378, no. 3, pp. 717–726, 2004.
- [39] K. Vriens, S. Peigneur, B. De Coninck, J. Tytgat, B. P. A. Cammue, and K. Thevissen, "The antifungal plant defensin AtPDF2.3 from *Arabidopsis thaliana* blocks potassium channels," *Sci. Rep.*, vol. 6, pp. 1–13, 2016.
- [40] D. Franco-Bodek, "Diseño, expresión, purificación y repliegamiento para la caracterización por Resonancia Magnética Nuclear de la Defensina1," 2011.
- [41] L. Rodríguez-Solano, "Biosíntesis, Purificación, repliegamiento y caracterización por RMN de una mutante de Def1, con posible actividad bloqueadora de canales iónicos de potasio.," *Tesis Maest. UNAM México*.
- [42] J. Keeler, *Understanding NMR spectroscopy*. 2002.
- [43] G. A. Titaux, "Biosíntesis y caracterización estructural por resonancia magnética nuclear de la toxina Magi 3 de araña.," 2015.
- [44] J. M. Würz, S. Kazemi, E. Schmidt, A. Bagaria, and P. Güntert, "NMR-based automated protein structure determination," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 628, pp. 24–32, 2017.
- [45] P. Güntert and L. Buchner, "Combined automated NOE assignment and structure calculation with CYANA," *J. Biomol. NMR*, vol. 62, no. 4, pp. 453–471, 2015.
- [46] D. S. Wishart, B. D. Sykes, and F. M. Richards, "The Chemical Shift Index: A Fast and Simple Method for the Assignment of Protein Secondary Structure through NMR Spectroscopy," *Biochemistry*, vol. 31, no. 6, pp. 1647–1651, 1992.
- [47] P. Güntert, "Automated NMR Structure Calculation With CYANA," *Protein NMR Tech.*, vol. 278, pp. 353–378.
- [48] C. Berndt, C. H. Lillig, and A. Holmgren, "Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1783, no. 4, pp. 641–650, 2008.
- [49] F. Delaglio, S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, and A. Bax, "NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes," *J. Biomol. NMR*, vol. 6, no. 3, pp. 277–293, 1995.
- [50] C. E. Case, David; Darden, Tom; Simmerling and K. Merz, "Amber," *Amber*, pp. 1–308, 2011.

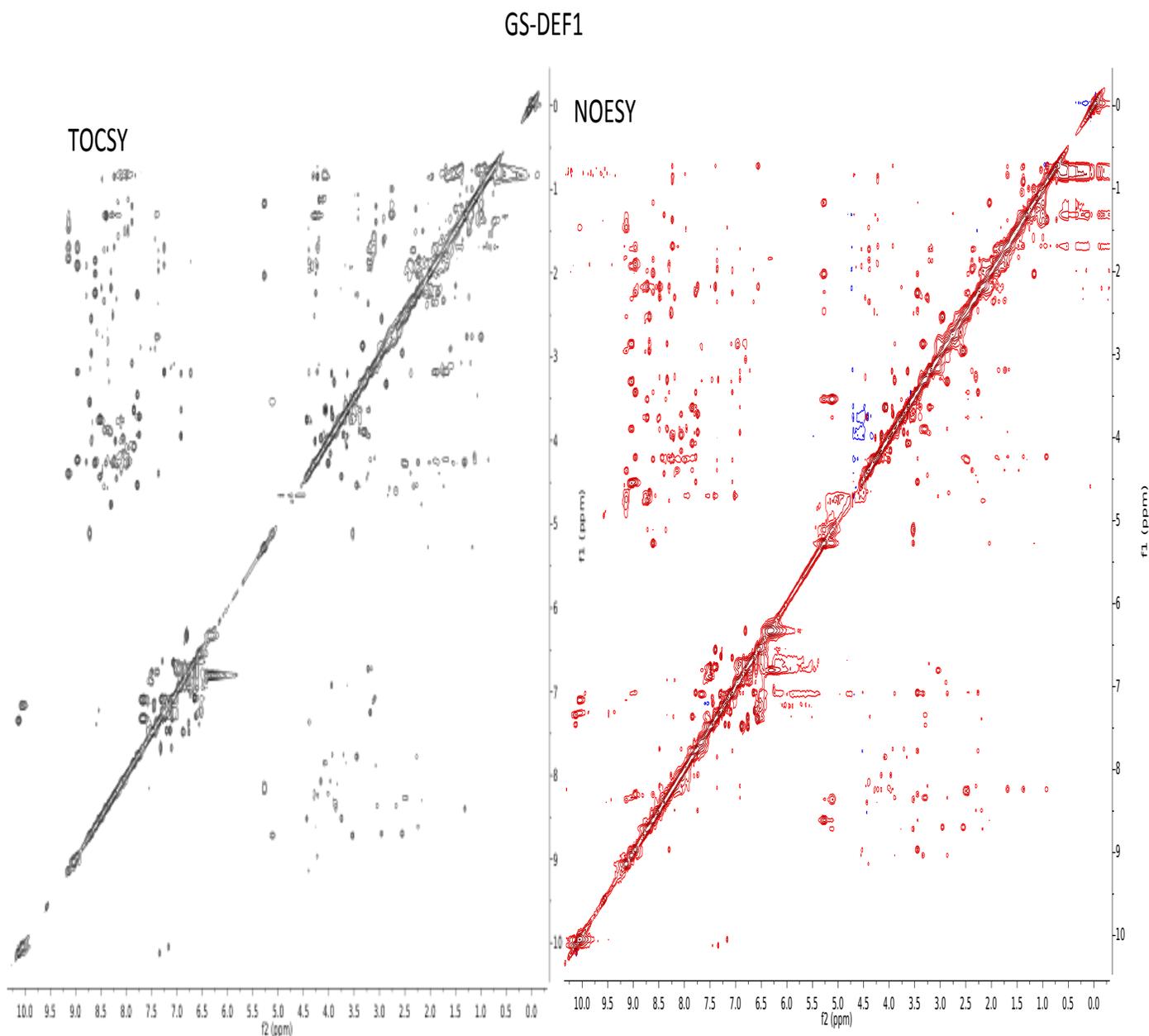
## Anexo I. Estructura terciaria de la Def1



Estructura terciaria de la Def1 obtenida en el presente trabajo. Se señala en colores los aminoácidos mutados para convertir dicha defensina en neurotoxina en azul se señala el aminoácido Y20, en rojo Q32 y en magenta los aminoácidos IQY 24-26. La mutación de dichos aminoácidos generara las moléculas a las cuales nos referimos en este trabajo como M1D1, M2D1 y M3D1 respectivamente.

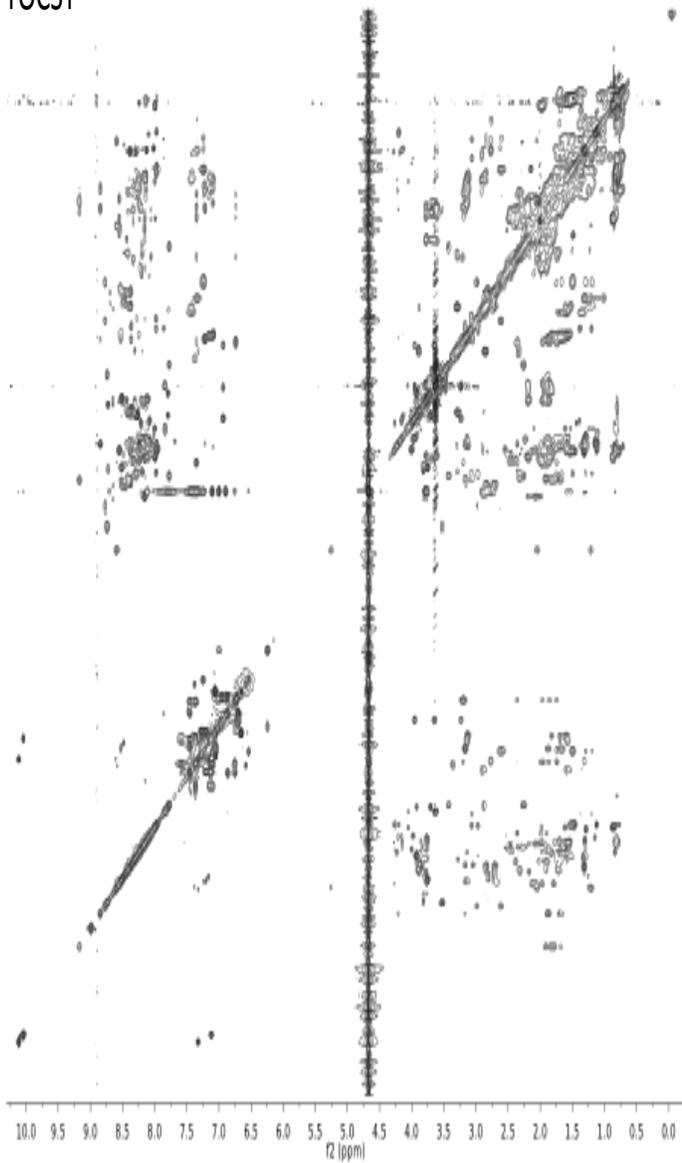
## Anexo II. Espectros TOCSY y NOESY de los péptidos caracterizados

Los espectros fueron adquiridos en un equipo Bruker AVANCE 700 MHz utilizando la supresión de agua DPGSE. Para el experimento TOCSY fue obtenido con un tiempo de mezclado de 80 ms mientras que los espectros NOESY se adquirieron usando tiempos de mezclado de 300 ms.

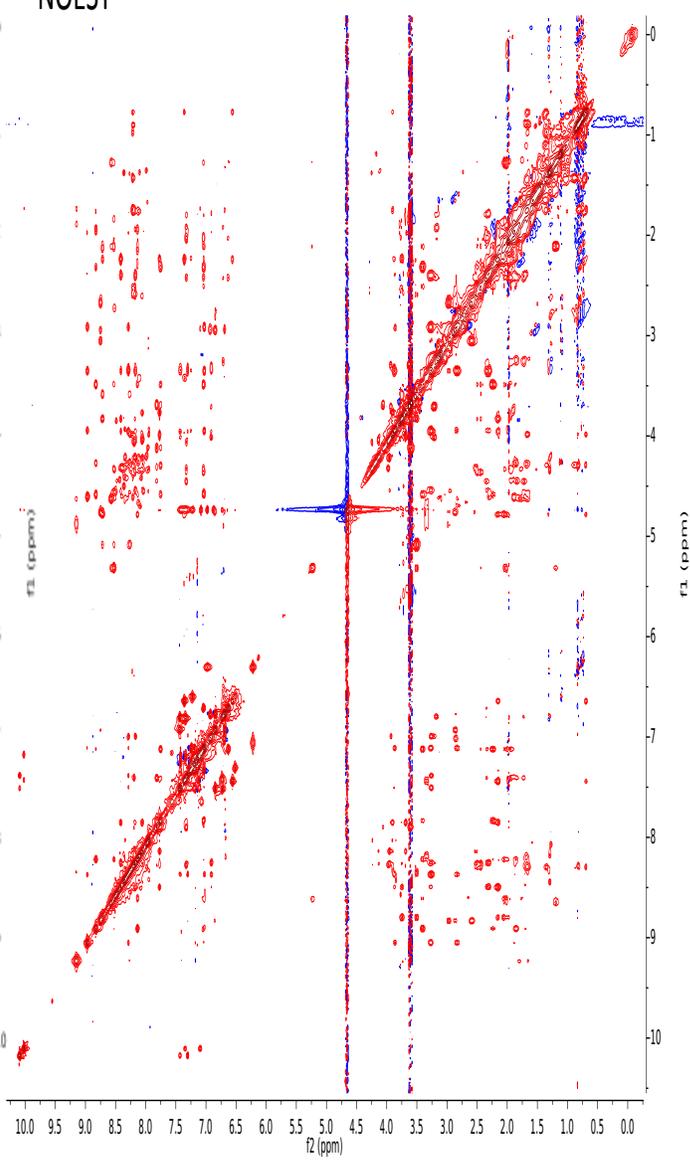


GS-M1D1

TOCSY

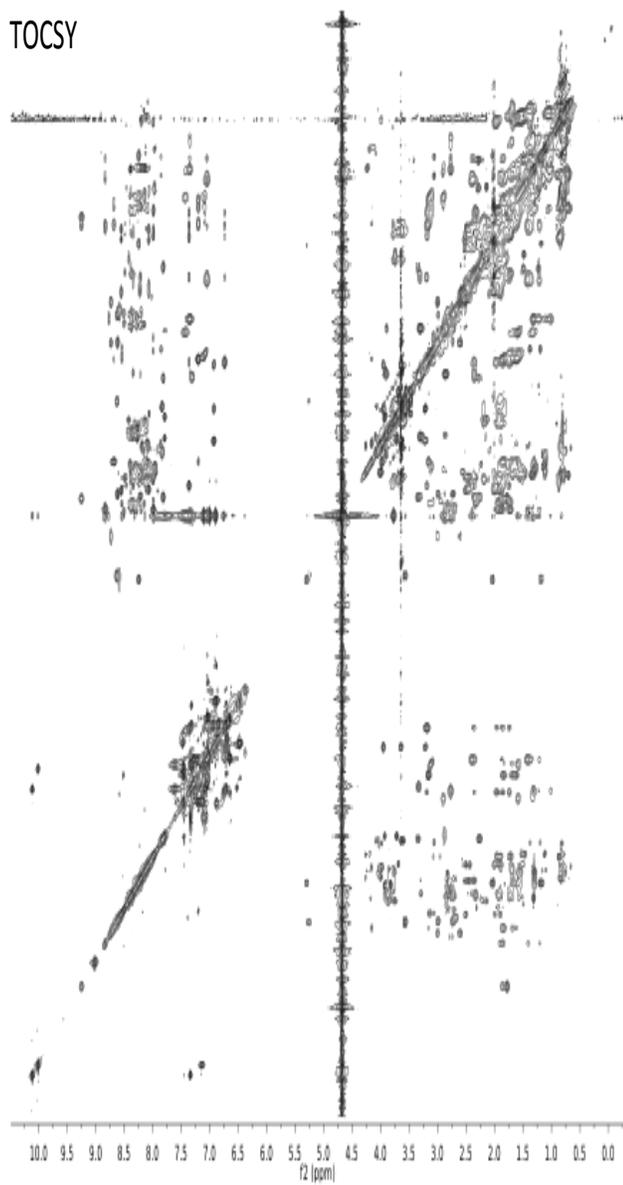


NOESY

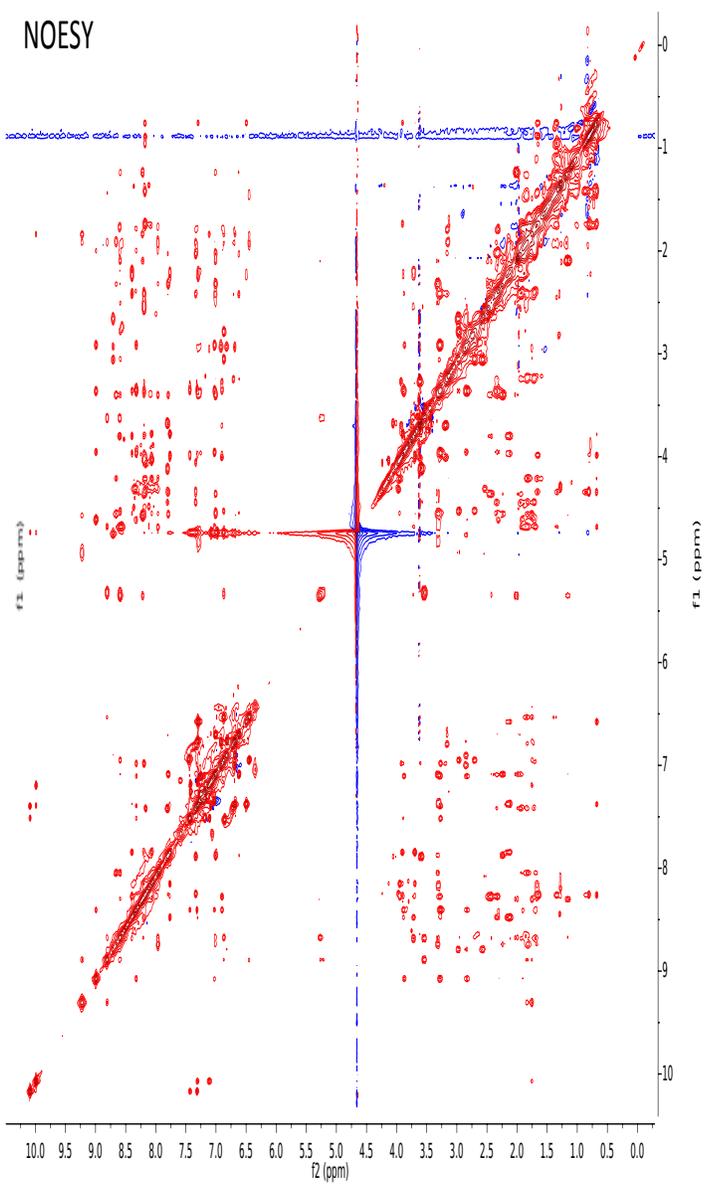


GM-M2D1

TOSY

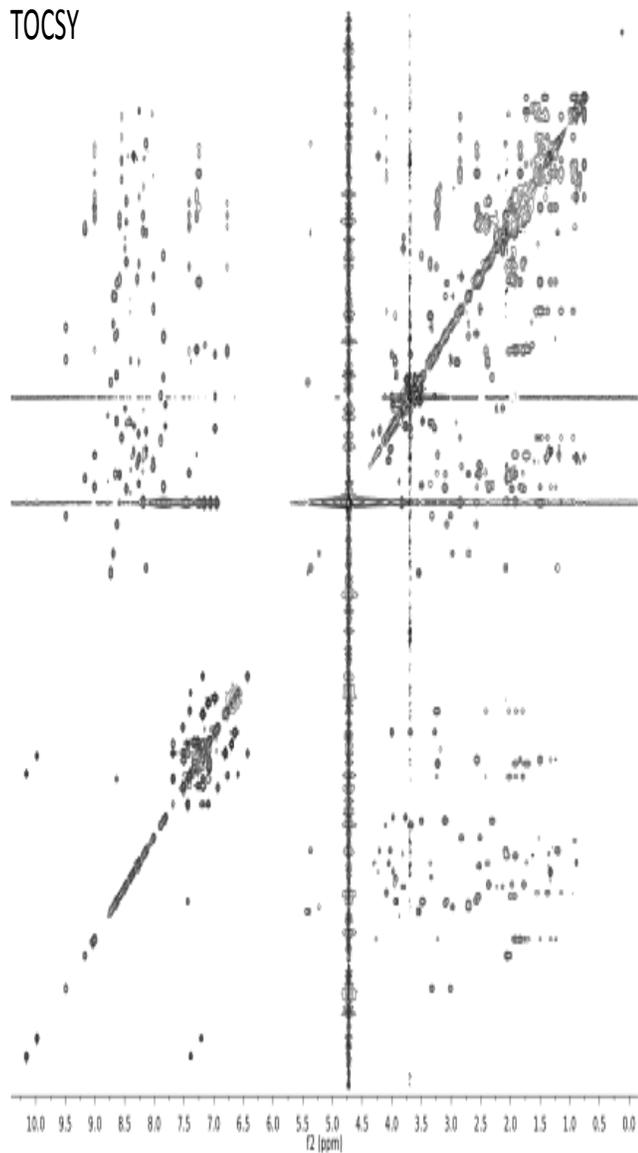


NOESY

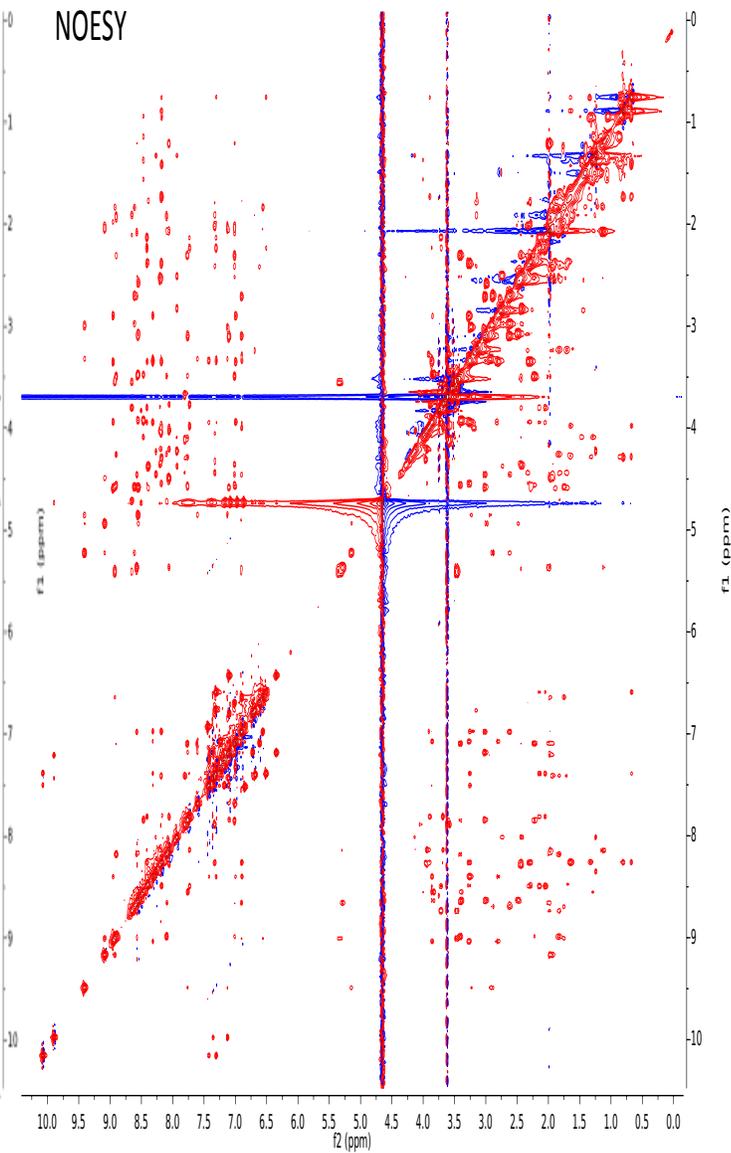


GM-M3D1

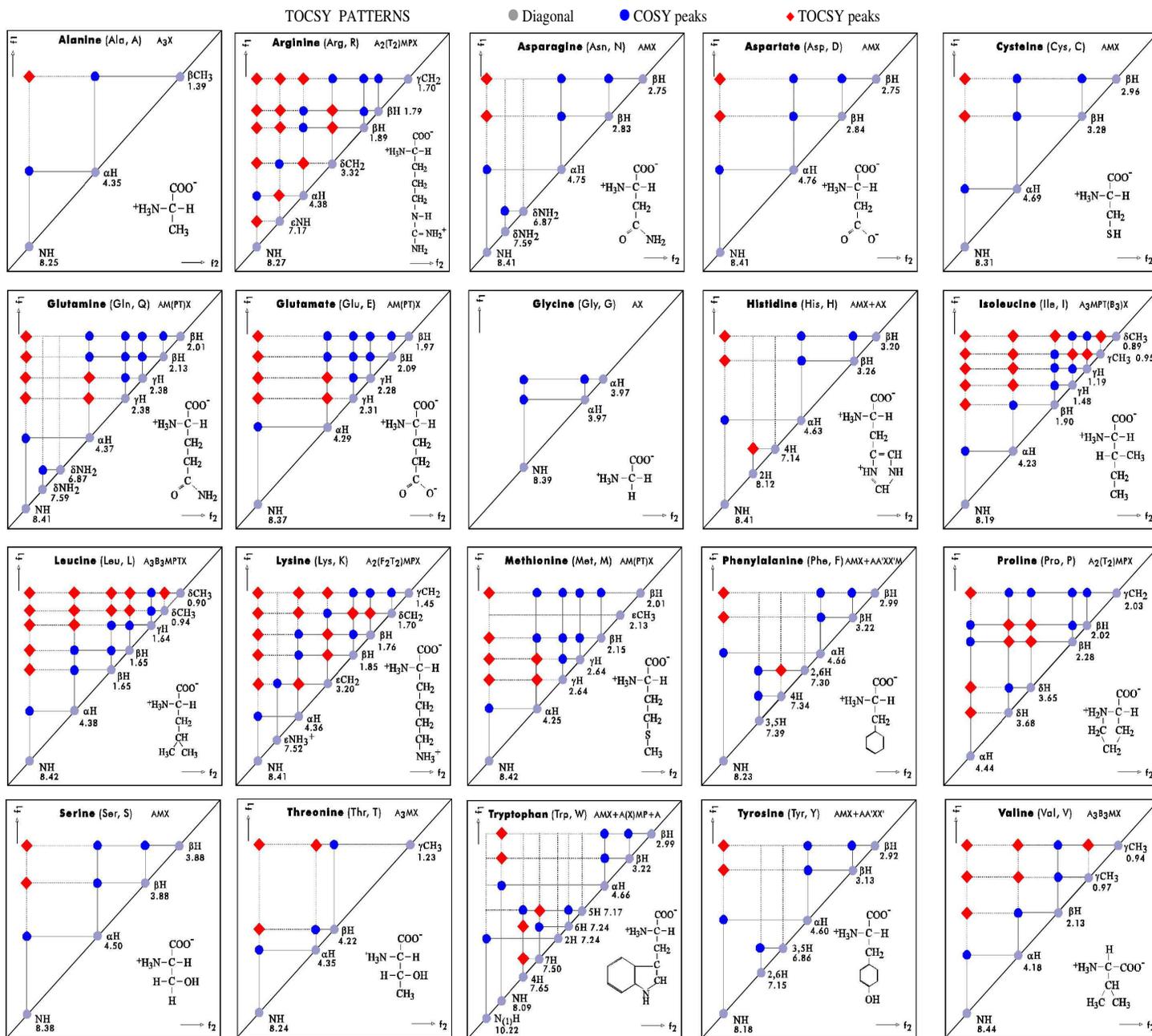
TOCSY



NOESY



Anexo III. Sistemas de espín de los aminoácidos



## Anexo IV. Valores referencia empleados en el método del índice de desplazamiento químico

Aminoácido	HA	CA	CB	CO
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

Anexo V. Gráficos de Ramachandran y de interacciones NOE

