



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**Expresión, purificación y caracterización espectroscópica de la toxina Beta-KTx 14.3
del alacrán *Lychas mucronatus***

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. Luis Enrique Carranza González

TUTOR

Dr. José Federico del Río Portilla
Instituto de Química, UNAM

Ciudad de México, Mayo 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**Expresión, purificación y caracterización espectroscópica de la toxina Beta-KTx 14.3
del alacrán *Lychas mucronatus***

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Q. LUIS ENRIQUE CARRANZA GONZÁLEZ



Ciudad de México, 2019

Jurado Asignado:

PRESIDENTE: Dra. Adela Rodríguez Romero.
VOCAL: Dr. Armando Ariza Castolo.
VOCAL: Dr. Andrés Navarrete Castro.
VOCAL: Dra. Nuria Esturau Escofet.
SECRETARIO: Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig.

Sitio donde se realizó el proyecto:

Laboratorio 1, Departamento de Química de Biomacromoléculas y Laboratorio de Biología Molecular, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

El presente trabajo fue presentado en: QuimiUNAM 2018 en la modalidad de cartel.

Q. Luis Enrique Carranza González
Sustentante

Dr. José Federico del Río Portilla
Asesor

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de crecer en lo académico y en lo personal, a la Facultad de Química por ejercer la presión adecuada para sacar lo mejor de uno mismo. Gracias por todo lo vivido dentro y fuera de las aulas, siempre lo llevare en el corazón.

Al Dr. Federico del Río, por abrirme la puerta a su grupo de trabajo, por mostrarse día a día con la gran calidad humana que lo caracteriza y por todo el apoyo recibido para la correcta realización de este trabajo, gracias Fede.

A mi papá por ser el más grande ejemplo de constancia y dedicación, por cada enseñanza, por el apoyo incondicional día a día, por ser el pilar de todo lo que he logrado hasta el momento y por la confianza que me otorgaste para realizar la maestría, estoy inmensamente agradecido y lo estaré toda la vida, gracias por tanto amor. A mi mamá, a la que le hubiera encantado ver terminado éste trabajo, gracias por todo el apoyo durante la carrera, por esas palabras de ánimo cuando todo parecía interminable, por enseñarme a valorar las cosas que tenemos y dejar de preocuparnos por las que no, gracias por enseñarme a ver las cosas con esa felicidad que a ti te encantaba en mi, que esto te haga *sentir más orgullosa*. A mi hermano, nanito, que siempre me has ayudado en todo, gracias por los regaños (merecidos), gracias por tanto cariño y por todos los cuidados que siempre has tenido conmigo. Soy el reflejo de todo el amor que han depositado en mi.

A mis amigos de la secundaria; a Carlos Macías por tantas risas, consejos y ocurrencias; a Daniel Vilorio por esos intentos de disciplina en el ejercicio, que algún día tendrán éxito, por esos momentos en “el valle” que fueron terapias para el alma, mente y corazón.

A mi primera amiga de la facultad Lupita De la Rosa, a mis amigos químicos: Enrique Robledo, Rubén Gutiérrez, Andrés Barrios, Alejandro Menchaca, Alan Barcelata; a mis “*primos*” Juan Reyna y Alan Mendieta que hicieron de la facultad un lugar más ameno. A mis 2 “*amuletos de la suerte*”, Juan y Carlos Delgado, personas con un enorme corazón. A Fernando Casas por todos esos golpes de realidad que siempre fueron y serán necesarios.

A todos mis compañeros del laboratorio de BQ1, en especial a Fátima Escobedo y Estefanía López. A Gustavo Titaux por sus aportaciones tan valiosas a este trabajo, así como por el gran amigo que encontré en él.

A cada uno de los sinodales les agradezco por el tiempo y esfuerzo invertido en la revisión de este trabajo: Dra. Adela Rodríguez Romero, Dr. Armando Ariza Castolo, Dr. Andrés Navarrete Castro, Dra. Nuria Esturau Escofet, Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig.

A la Dra. Elisa Carrillo Flores por realizar las pruebas de actividad sobre canales de potasio K^+ y al Laboratorio Universitario de RMN a cargo de la Dra. Beatriz Quiroz García por los experimentos realizados.

Agradezco al Departamento de Supercómputo de la DGTIC por los recursos computacionales ocupados en este trabajo (Proyecto LANCAD-UNAM-DGTIC-145).

Este proyecto fue posible gracias al apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de becario 629457 y parcialmente financiado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) a través del proyecto IN210319.

“Cualquiera que hayan sido nuestros logros, alguien nos ayudó siempre a alcanzarlos”
Althea Gibson

ÍNDICE

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	1
ABREVIATURAS	2
1 RESUMEN	3
2 ANTECEDENTES	4
2.1 Canales iónicos.....	4
2.1.1 Selectividad iónica de canales.....	4
2.1.2 Canales iónicos selectivos a potasio (K ⁺).....	5
2.1.3 Características estructurales de las toxinas de alacrán implicadas en el reconocimiento de canales iónicos de potasio (K ⁺).....	7
2.2 Veneno y toxinas de alacrán bloqueadoras de canales iónicos.....	8
2.3 Neurotoxina β-KTx 14.3 del alacrán <i>Lychas mucronatus</i>	10
2.4 Proteínas.....	11
2.4.1 Estructura de proteínas.....	12
2.5 Proteínas recombinantes.....	14
2.5.1 Purificación de proteínas.....	14
2.5.2 Lisis celular.....	14
2.5.3 Cromatografía de afinidad.....	15
2.5.4 Cromatografía líquida de fase reversa.....	16
2.6 Caracterización de proteínas.....	17
2.6.1 Espectrometría de masas (MALDI-TOF).....	17
2.6.2 Dicroísmo circular (DC).....	17
2.6.3 Resonancia Magnética Nuclear para determinación estructural de proteínas.....	18
3 HIPOTESIS	23
4 OBJETIVOS	23
5 DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA	24
5.1 Biosíntesis de la toxina β-KTx 14.3.....	24
5.2 Transformación.....	24
5.3 Optimización de la expresión de la toxina β-KTx 14.3.....	25
5.4 Lisis celular.....	25
5.5 Purificación.....	26
5.5.1 Purificación por cromatografía de afinidad metal-quelato (CAMQ).....	26
5.5.2 Corte con enteroquinasa.....	26
5.5.3 Cromatografía líquida en fase reversa.....	27
5.6 Caracterización.....	27
5.6.1 Espectrometría de masas (MALDI-TOF).....	27
5.6.2 Dicroísmo circular (DC).....	28
5.6.3 Caracterización estructural por Resonancia Magnética Nuclear.....	28
5.6.4 Pruebas de actividad en canales iónicos dependientes de voltaje.....	29
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	30
6.1 Optimización de la expresión de la toxina β-KTx 14.3.....	30
6.2 Purificación por cromatografía de afinidad metal-quelato (CAMQ).....	31
6.3 Corte con enteroquinasa.....	33
6.4 Cromatografía líquida en fase reversa.....	34
6.5 Caracterización por espectrometría de masas (MALDI-TOF).....	36
6.6 Caracterización estructural por dicroísmo circular (DC).....	37
6.7 Caracterización estructural por Resonancia Magnética Nuclear.....	39
6.8 Pruebas de actividad en canales iónicos dependientes de voltaje.....	48
7 CONCLUSIONES	51
8 REFERENCIAS	52
9 ANEXOS	58

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura I. Esquema de un canal de K ⁺	3
Figura II. Estructura de las diferentes clases de canales K ⁺	4
Figura III. Secuencia de aminoácidos de la toxina β-KTx 14.3.	7
Figura IV. Formación del enlace peptídico.	8
Figura V. Estructura secundaria de proteínas.	10
Figura VI.-Componentes circularmente polarizados y espectros de DC de polipéptidos y proteínas con estructuras secundarias representativas.	15
Figura VII. Diferencia de energía entre dos niveles con espín ½.	17
Figura VIII. Comparación de los espectros de ¹ H.	18
Figura IX. Esquema general de la adquisición de un espectro bidimensional.	19
Figura X. Representación de la proteína de fusión.	21
Figura XI. Cinética de expresión de la proteína de fusión en la cepa de <i>E. coli</i> , C41 TM	28
Figura XII. Purificación por cromatografía de afinidad metal-quelato.	29
Figura XIII. Cinética de la reacción de corte de la proteína de fusión utilizando enteroquinasa.	31
Figura XIV. Extracción en fase sólida Strata C18-T.	32
Figura XV. Cromatograma de la purificación de la neurotoxina β-KTx 14.3.	33
Figura XVI. Espectro de masas MALDI-TOF de la neurotoxina β-KTx 14.3.	34
Figura XVII. Espectro de dicroísmo circular de la neurotoxina β-KTx 14.3.	35
Figura XVIII. Espectro de ¹ H de la neurotoxina β-KTx 14.3.	37
Figura XIX. Interpretación de los experimentos TOCSY y NOESY.	39
Figura XX. Interacción de los protones beta de las cisteínas 26 y 42, formación del enlace C ₃ -C ₆	40
Figura XXI. Gráfico de Ramachandran para las 20 estructuras calculadas por CYANA.....	41
Figura XXII. Alineamiento de las 20 estructuras obtenidas mediante el programa CYANA para la neurotoxina β-KTx 14.3.	42
Figura XXIII. Interacciones más importantes para los elementos de estructura secundaria presentes en la toxina.	43
Figura XXIV. Estructura terciaria de la neurotoxina β-KTx 14.3.	44
Figura XXV. Estructura tridimensional de la neurotoxina β-KTx 14.3.	45
Figura XXVI. Efecto de la neurotoxina β-KTx 14.3 en 1) <i>Shaker</i> y en 2) KCNQ1/Kv7.1.	46
Figura XXVII. Alineamiento de secuencia de canales KCNQ1 y Kv1.2.	47
Figura XXVIII. Espectro de RMN TOCSY de 80 ms, de la neurotoxina.	54
Figura XXIX. Espectro de RMN NOESY de 300 ms, de la neurotoxina.....	54
Figura XXX. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de las tres clases de la familia β-KTx.	60
Tabla 1. Condiciones probadas para el corte enzimático con enteroquinasa a 37°C.	32
Tabla 2. Fracción de estructura secundaria a partir de los datos experimentales de dicroísmo circular de la neurotoxina β-KTx 14.3.	36

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
CS- α/α	Cysteine-stabilized α -helix- α -helix fold
CS- α/β	Cysteine-stabilized α -helix- β -sheet fold
CAMQ	Cromatografía de Afinidad Metal-Quelato
DC	Dicroísmo Circular
DPFGSE	Double pulsed field gradient spin echo
FID	Free Induction Decay
GFP	Green Fluorescent Protein
^1H	Hidrógeno
H_α	Hidrógeno en posición alfa
H_β	Hidrógeno en posición beta
^1HN	Hidrógeno de amida
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
^1H - ^1H TOCSY	TOTAL CORRELATED SPECTROSCOPY
^1H - ^1H COSY	CORRELATED SPECTROSCOPY
kDa	Kilo Dalton, 1Da=1g/mol
KTx	Toxina Bloqueadora de Canales de Potasio
ICK	Inhibitor cystine knot
IDA	Ácido iminodiacético
IMAC	Cromatografía de afinidad por iones metálicos
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
LB	Luria Bertani
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NOE	Efecto Nuclear Overhauser
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time-Of-Flight
MHz	MegaHertz
ppm	Partes por millón
RPC	Reversed phase chromatography
rpm	Revoluciones por minuto
RMSD	Root-mean-square deviation
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TFA	Ácido trifluoroacético

1 RESUMEN

Las toxinas de alacrán han sido de gran importancia para la investigación y la comprensión de la variedad de procesos fisiológicos de los canales iónicos. En específico, las toxinas con afinidad hacia canales de potasio (K^+) se han empleado como dianas biológicas para proporcionar información acerca de la estructura de dicho canal, las mutaciones que presenta, su regulación y las patologías asociadas a estos canales mediante el estudio de la interacción de ambos sistemas (Interacción toxina/canal de K^+). Por otro lado, las toxinas presentes en el veneno de alacranes se han empleado como una posible vía de control de enfermedades auto-inmunes⁴⁸. Un mayor entendimiento de la fisiología del canal de potasio (K^+) proporcionaría una posible herramienta farmacológica selectiva a diversas patologías humanas.

La neurotoxina β -KTx 14.3, obtenida del alacrán *Lychas mucronatus*, de la familia *Buthidae*, pertenece a la clase 2 de la subfamilia β -KTx. Hasta la realización de esta tesis, no existía información estructural de ningún péptido completo de la subfamilia mencionada. La presente determinación estructural de un miembro característico de esta subfamilia proporciona un amplio panorama acerca de la relación que existe entre la estructura tridimensional y su función fisiológica.

De manera general las toxinas que bloquean los canales de potasio (K^+) presentan de 2-4 enlaces disulfuro, los cuales estabilizan la estructura secundaria. En su mayoría, las toxinas de alacrán presentan un motivo estructural característico formado por una hélice α unida con una de las hebras β formando así una estructura α/β estabilizada por enlaces disulfuro.

El presente trabajo muestra la obtención por técnicas de biología molecular, purificación y caracterización de la primera estructura tridimensional de un péptido recombinante completo perteneciente a la subfamilia β -KTx, así como la evaluación electrofisiológica de la toxina contra algunos canales de K^+ .

2 ANTECEDENTES

2.1 Canales Iónicos

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana, implicadas en el transporte y el metabolismo celular. Están formados por regiones hidrofílicas en las cuales se permite el paso selectivo de iones a través de la membrana celular. Estas regiones conforman lo que se conoce como el poro del canal¹ (figura I).

Los canales iónicos tienen importancia fundamental en la fisiología y patología de los seres vivos³, juegan un papel indispensable en procesos de secreción de hormonas, división celular y motilidad, contracción muscular, percepción sensorial y el funcionamiento cerebral. Dichos canales forman una de las principales dianas de diversos fármacos².

La membrana celular es una barrera selectiva que separa dos medios, el extracelular y el intracelular, regulando su composición desde el interior de la célula hacia el medio exterior, y viceversa. Los iones son moléculas hidrofílicas inmiscibles en los lípidos de la membrana, los cuales para atravesarla requieren mecanismos específicos de transporte¹. El transporte celular puede ser activo o pasivo.

2.1.1 Selectividad iónica de los canales

Generalmente el poro de cada canal tiene una secuencia de aminoácidos que favorece el paso preferencial de un ión respecto a otro. Dicho paso está regulado por las cargas y la disposición espacial de los aminoácidos presentes; es decir, los canales con filtros de selectividad conformados por aminoácidos cargados positivamente serán canales aniónicos, mientras que los que se encuentren conformados por aminoácidos cargados negativamente, serán canales catiónicos (figura I sección c).

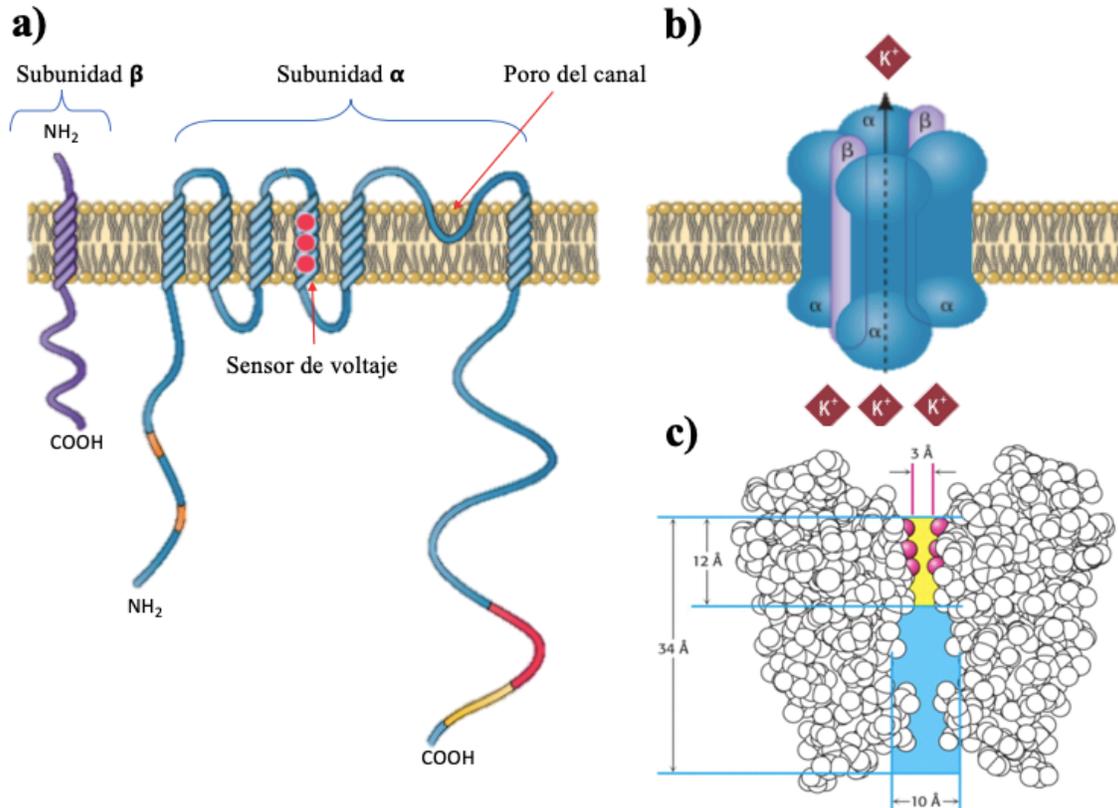


Figura I. a) Esquema de un canal de K⁺, en donde se observa las subunidades que lo conforman (α y β), el sensor de voltaje y la región del poro. b) Esquema del canal de K⁺, cuatro subunidades α forman el poro del canal. c) Esquema del filtro de selectividad³⁹ (esferas en rojo), a dos tercios del interior, el canal se estrecha, mutaciones en esta zona modifican la selectividad del canal.

2.1.2 Canales Iónicos Selectivos a Potasio (K⁺)

Entre la variedad de canales iónicos los canales de potasio (K⁺) incluyen una gran familia de proteínas de membrana que son importantes en numerosas funciones celulares, incluido el mantenimiento del potencial de membrana en reposo, el control de la excitabilidad neuronal y cardíaca, la liberación de neurotransmisores, la contracción muscular y la secreción de hormonas⁴. Entre los canales iónicos, los de potasio (K⁺) forman la superfamilia proteica más abundante y diversificada, estos canales se encuentran en todos los organismos vivos, desde las bacterias hasta los humanos⁵, están presentes tanto en células excitables como no excitables³.

La función fundamental de los canales de potasio en el cuerpo humano es establecer el potencial de reposo y dar forma al potencial de acción en nervios y músculos². Además, los canales iónicos de potasio poseen características particulares como: **i)** Tienen una vía o poro permeable al agua que permite que los iones de K^+ fluyan a través de la membrana celular; **ii)** Tienen un filtro selectivo específico para el K^+ y **iii)** Tienen un mecanismo de compuerta que sirve de interruptor para la conformación abierta y cerrada del canal^{6,7}.

Los canales de potasio K^+ se han clasificado de manera general en tres grandes familias con base en la homología de su estructura y características biofísicas (figura II).

- I. Canales con seis/siete segmentos transmembranales y un poro (6-7 STM/ 1P).
 - a. Canales de K^+ dependientes de voltaje (K_V)
 - b. Canales de K^+ activados por Ca^{2+} (K_{Ca})
- II. Canales con dos segmentos transmembranales y un poro (2 STM/ 1P)
- III. Canales con cuatro segmentos transmembranales y dos poros (4STM / 2P)

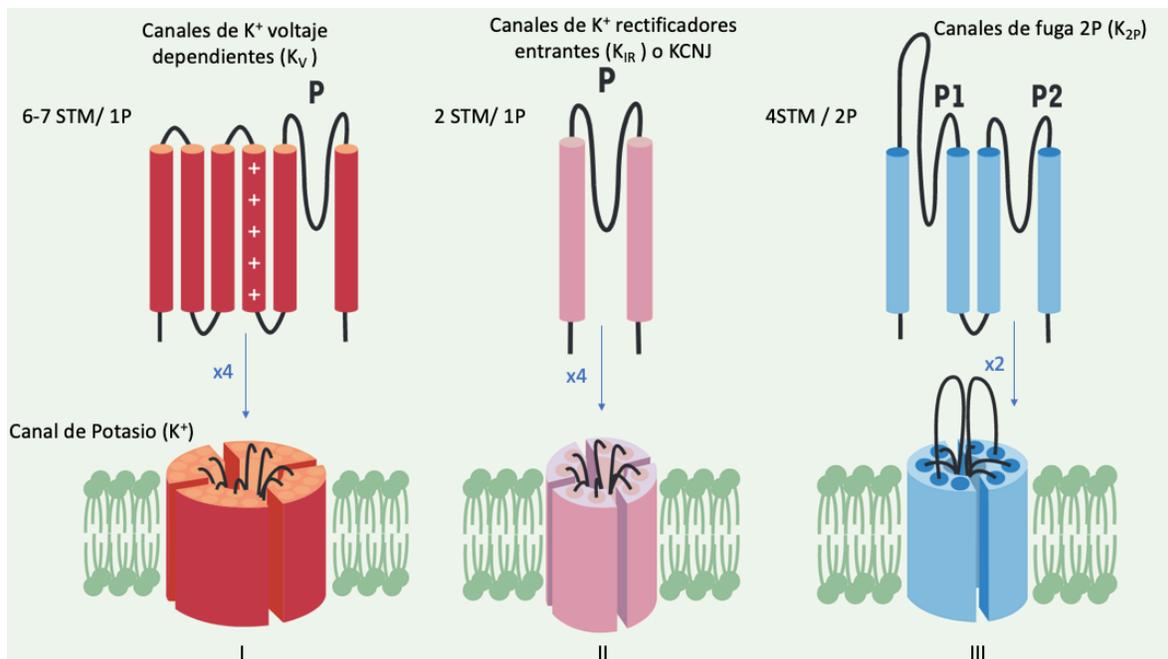


Figura II. Estructura de las diferentes clases de canales K^+ . Las diferentes subunidades se dividen en tres clases principales según el número de segmentos transmembranales y dominios P, una secuencia altamente conservada que participa en la formación del filtro de selectividad de estos canales¹⁸.

La mayoría de los canales de potasio son tetrámeros, formado por cuatro subunidades α idénticas. Las cuatro subunidades se insertan en la membrana dejando un poro en el interior, a menudo se complementan con subunidades β^8 . Los dominios P de los canales de potasio (K^+) tienen una secuencia de aminoácidos altamente conservada. De esta forma, mutaciones en la región del poro provoca la pérdida de selectividad del canal.

2.1.3 Características estructurales de las toxinas de alacrán implicadas en el reconocimiento de canales iónicos de potasio (K^+)

De manera general, las toxinas de alacrán bloquean los canales de potasio (K^+) debido a la obstrucción del poro por la toxina, esta interacción depende de varios factores como son el tamaño de la toxina y las interacciones específicas que presenta con el canal. El principal mecanismo de acción de estas toxinas es la oclusión del poro del canal mediante la interacción adecuada de la cadena lateral de los residuos localizados en la hoja β de la toxina. Una lisina (K) y un residuo aromático (F/Y) separado por 6.6 Å forman el requisito mínimo para que ocurra el bloqueo del canal (Teoría de la Diada Funcional), interacción considerada clave en el bloqueo de los canales de potasio (K^+) dependientes de voltaje.

Sin embargo, tras el descubrimiento de toxinas que no encajaban a la perfección con este modelo, algunos autores sugieren que el segmento hélice α esta implicado en el bloqueo funcional de canales de K^+ activados por Ca^{2+} , así como toxinas pertenecientes a la familia γ -KTx que eran capaces de interactuar con sus dianas moleculares de diferente manera que la teoría propuesta de la diada funcional.

Estudios estructurales de toxinas pertenecientes a la familia alfa (α -KTx 3.2, α -KTx 1.1, α -KTx 1.3, α -KTx 6.2) sugieren que residuos de aminoácidos básicos no idénticos alrededor de la diada funcional generan interacciones importantes con la región del poro (Teoría del anillo básico), lo cual sugiere que la presencia de la diada funcional en estas toxinas no es esencial para el reconocimiento y el bloqueo del canal.

De esta manera, aunque se demuestra que la estructura tridimensional es similar, el reconocimiento de su diana molecular depende de ciertos residuos de aminoácidos, ubicados en puntos específicos de la toxina. Con lo cual el mecanismo implicado en el bloqueo del canal de potasio (K^+) dependiente de voltaje para la familia β -KTx aún no está bien definido.

2.2 Veneno y toxinas de alacrán bloqueadoras de canales iónicos

Los alacranes son uno de los artrópodos más antiguos que han existido en la Tierra, conservando su morfología casi inalterada por más de 400 millones de años. Hasta la fecha existen más de 2200 especies¹⁰, las cuales están distribuidas a lo largo de todos los continentes con excepción de la Antártida. El envenenamiento debido a la picadura del alacrán es un peligro para la salud pública en regiones tropicales y subtropicales ya que cada año se reportan más de 1,200,000 casos¹¹. Sin embargo, un número creciente de investigaciones experimentales y preclínicas han demostrado que el veneno de alacrán, específicamente algunas proteínas y péptidos, puede disminuir la proliferación del cáncer inhibiendo la metástasis e inducir la apoptosis y arresto celular en un entorno *in vitro* o *in vivo*¹¹.

El veneno del alacrán es una fuente de moléculas muy compleja la cual es utilizada para inmovilizar a su presa o como defensa ante depredadores. Los principales constituyentes del veneno del alacrán son: agua, mucosa, oligopéptidos, nucleótidos, aminoácidos, iones, neurotransmisores, sales, péptidos de bajo peso molecular, metales, mucoproteínas, mucopolisacáridos, hialuronidasas, fosfolipasas, serotonina, histamina, aminas biogénicas y muchas sustancias no identificadas aún¹².

Todas las toxinas de alacrán conocidas que afectan los canales de potasio (KTx) son péptidos que actúan como bloqueadores de los poros del canal⁹. Las KTx's se utilizan para localizar canales iónicos en muestras biológicas, la exploración de la estructura y función del canal iónico representa un gran desafío para entender e investigar su farmacología².

La clasificación general de las toxinas del alacrán se basa en cuatro criterios diferentes: el canal iónico involucrado (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^-), el tamaño de la toxina, la estructura tridimensional y el tipo de respuesta inducida, formando así cuatro familias¹³.

Las toxinas que bloquean los canales de potasio, llamadas KTx, están formadas entre 20-75 residuos de aminoácidos y contienen 2-4 enlaces disulfuro, los cuales estabilizan su estructura. Estos enlaces, en su mayoría, unen el segmento de hélice α con una de las hebras β , formando así el motivo estructural característico que se encuentra en las toxinas (KTx) producidas por alacranes, formando una estructura α/β estabilizada por enlaces disulfuro.

Estas toxinas pueden presentar 5 motivos estructurales diferentes:

- i. Motivo estructural CS- α/β .- Una gran mayoría de toxinas provenientes del veneno de alacrán se ajusta a este tipo de plegamiento, así como toxinas bloqueadoras de canales de sodio y péptidos similares a la clorotoxina (*Egyptian scorpion*).
- ii. Motivo estructural CS- α/α (2 enlaces disulfuro). - Dos hélices α paralelas, conectadas con dos puentes disulfuro (κ -Hefutoxina y péptidos relacionados)⁴⁹.
- iii. Motivo estructural CS- α/α (3 enlaces disulfuro). - Formación alternativa de enlaces disulfuro, generando un plegamiento de hélice-asa-hélice.
- iv. Motivo estructural tipo Kunitz. - Proteínas inhibidoras de proteasa, la estructura tridimensional típica de estos dominios consiste en un núcleo central de dos hebras β conectadas entre sí por un giro de 180° , que forman una estructura de horquilla flanqueada por una hélice 3_{10} y una hélice α hacia los extremos amino y carboxilo, respectivamente⁴³.
- v. Motivo estructural ICK (inhibitor cystine knot). - Horquilla antiparalela estabilizada por un nudo de cisteína, común en toxinas de araña, con al menos 3 enlaces disulfuro².

En la actualidad se propone agrupar a las KTx's en 6 subfamilias, según su homología, su estructura tridimensional y la actividad que presenta. Las CS- α/β toxinas se dividen en 3 familias: α -KTx (~20-40 residuos), β -KTx (~45-75 residuos), γ -KTx (que afectan a un subconjunto de canales K_v llamados ERG), κ -KTx (Toxinas CS- α/α), δ -KTx (proteínas tipo Kunitz) y λ -KTx (Toxinas ICK)².

2.3 Neurotoxina β -KTx 14.3 del alacrán *Lychas mucronatus*

La neurotoxina β -KTx 14.3 (familia 14, tercer miembro de la subfamilia β -KTx) fue obtenida del alacrán *Lychas mucronatus*, el cual se encuentra distribuido en el sureste de Asia y el sur de China, perteneciente a la familia *Buthidae*. Su secuencia consta de 48 residuos de aminoácidos, la cual muestra los puentes disulfuro predichos por homología (figura III).



Figura III. Secuencia de aminoácidos de la toxina β -KTx 14.3, se muestra la posible conectividad de enlaces disulfuro.

Debido a la similitud en secuencia de aminoácidos, los péptidos de veneno de alacrán de cadena larga pertenecientes a la subfamilia β -KTx se dividen en tres clases diferentes: **(1)** péptidos estrechamente relacionados con TsTX-K β , AaTX-K β y BmTXK β 2 (todos de la especie *Buthidae*); **(2)** péptidos heterogéneos de las especies *M. martensii*, *H. gertschi* y *Tityus*; **(3)** péptidos relacionados con la escorpina. El análisis comparativo mostró que los tres grupos se caracterizan por una alta identidad de pares dentro de cada grupo (50-97%) y una baja identidad promedio entre los grupos (<30%). (*Anexo Familia β -KTx*)⁵⁰.

La neurotoxina β -KTx 14.3 pertenece a la clase 2, cuyos miembros representativos son BmTXK β , Hge β KTx, TcoKIK, TdiKIK y TtrKIK. La toxina BmTXK β recombinante es un bloqueador de la corriente transitoria de K⁺ (K_{to}), Hge β KTx muestra fuertes efectos citolíticos hacia bacterias, por lo que se espera la neurotoxina β -KTx 14.3 presente efectos similares para ambas actividades²⁴.

En la actualidad la mayoría de las investigaciones se concentran en sólo alguno de los géneros de la familia *Buthidae*, como: *Androctonus*, *Buthus*, *Mesobuthus*, *Parabuthus*, *Centruroides* o *Tityus*. De cierta forma otros géneros no son muy estudiados a pesar de los componentes tan atractivos de su veneno y del alto potencial que podrían tener para el desarrollo de nuevos medicamentos, como es el caso para el género *Lychas*.

La función biológica de la neurotoxina β -KTx 14.3 no es bien conocida; debido a esto es que se le considera péptido "huérfano". Sin embargo, por su secuencia de aminoácidos se cree que la proteína tendría un efecto como bloqueador de canales de potasio Kv1.1 o relacionados (Kv1.x)⁴².

2.4 Proteínas

Las proteínas son polímeros que resultan de la reacción de condensación entre aminoácidos a través de un enlace de amida llamado peptídico, los cuales tienen la misma estructura fundamental, la cual consiste en un átomo central de carbono ($C\alpha$) unido a un grupo amino (NH_2), un grupo carboxilo ($COOH$), un hidrógeno y un grupo variable (R) (figura IV).

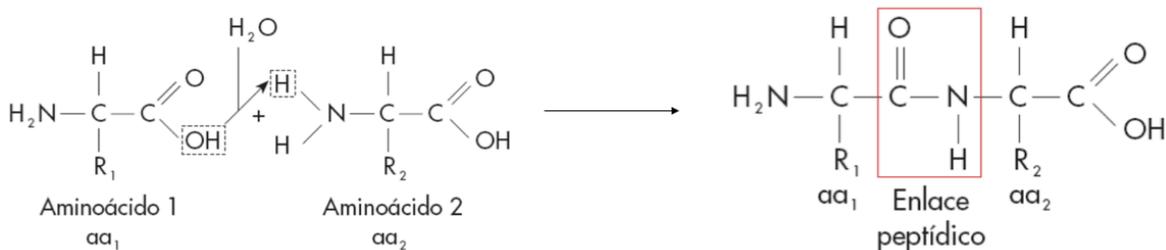


Figura IV. Formación del enlace peptídico.

El enlace peptídico impone restricciones a las posibles conformaciones, su distancia de enlace (1.32 Å) es más corta que la de un enlace sencillo C-N (1.49 Å), pero algo mayor que la de un enlace doble C=N (1.27 Å), por lo que no es posible el giro alrededor del enlace de amida C-N. A lo largo de la cadena polipeptídica existen demasiados enlaces sencillos, los cuales podrían adoptar un número elevado de conformaciones, sin embargo, los átomos unidos al enlace C-N mantienen distancias y ángulos característicos, los cuales determinan sólo una conformación tridimensional estable.

2.4.1 Estructura de proteínas

La estructura de una proteína depende de ciertas interacciones (enlaces covalentes, puentes salinos, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas), las cuales permiten que la cadena polipeptídica adopte una conformación definida, la cual recibe el nombre de **estructura** o **conformación estructural nativa**¹⁹. Dicha configuración esta determinada por cuatro niveles estructurales.

La estructura **primaria** es la secuencia de aminoácidos de la proteína, la cual nos indica los aminoácidos que componen a la cadena polipeptídica y el orden en el que se encuentran. La secuencia de aminoácidos que forma una proteína determina el tipo de interacciones que se producirán, influyendo así en su estructura tridimensional y función¹⁹.

La estructura **secundaria** se refiere a la estructura que adopta espacialmente una parte de la proteína, presenta generalmente dos disposiciones, los tipos de estructura secundaria que se observan con mayor frecuencia son la hélice α y la hebra β ²⁰.

La hélice α es una estructura rígida en forma de varilla que se origina cuando una cadena polipeptídica se enrolla en una conformación helicoidal dextrógira²⁰. Consta de 5 o más aminoácidos consecutivos de una proteína con ángulos ϕ de $\sim -57^\circ$ y ψ de $\sim -47^\circ$ ²⁰. Al adoptar estos ángulos, el grupo C=O del aminoácido i queda a la distancia y orientación adecuadas para formar un puente de hidrógeno con el N-H del aminoácido $i+4$. Se mantiene estable por medio de puentes de hidrógeno que entre los grupos N-H y C=O (figura V).

Las hojas β . se forman cuando se alinean dos o más segmentos de la cadena polipeptídica uno al lado del otro. Cada segmento individual se denomina cadena β . En lugar de estar enrollada, cada cadena β está extendida por completo. Las hojas β son estabilizadas por enlaces de hidrógeno que se forman entre los grupos N-H y carbonilo del esqueleto polipeptídico de cadenas adyacentes²⁰.

Las hojas β que interactúan pueden disponerse para formar una hoja β **paralela**, en la cual los segmentos adyacentes de la cadena polipeptídica proceden en la misma dirección, o una hoja **antiparalela**, en la cual proceden en direcciones opuestas²¹ (figura V).

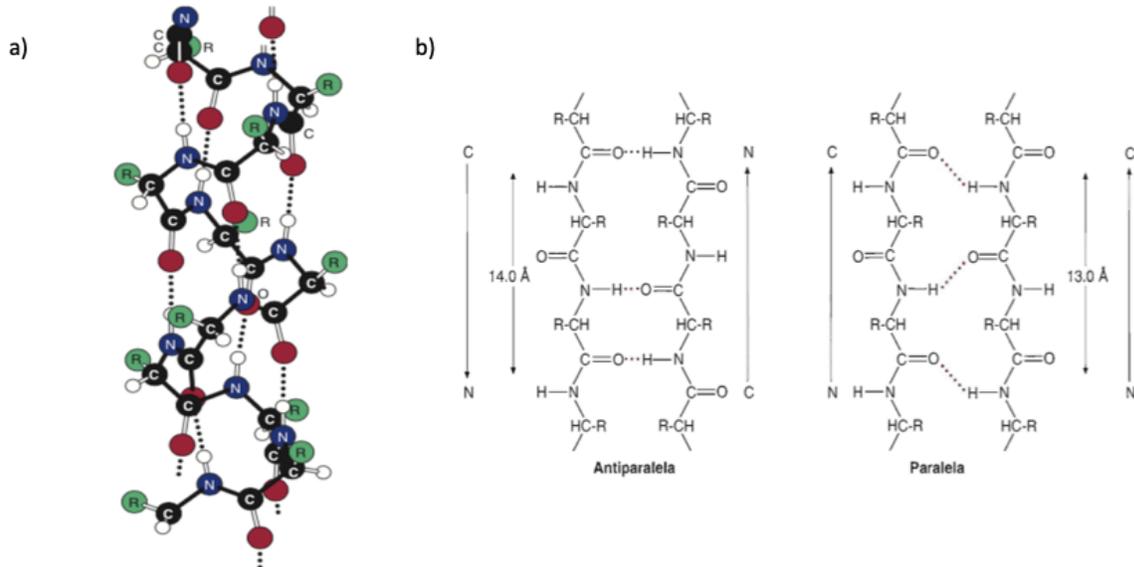


Figura V. Estructura secundaria de proteínas. a) hélice alfa, b) hebra beta antiparalela y paralela.

La estructura **terciaria**, así como la estructura secundaria, se refiere a la disposición tridimensional de todos los átomos de un polipéptido. La estructura terciaria se estabiliza por interacciones hidrofóbicas, interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno y enlaces covalentes. Es importante mencionar que la capa de hidratación dinámica que se forma alrededor de una proteína contribuye al plegamiento y estabilización de ésta. Las regiones de la proteína con una estructura secundaria definida se llaman dominios. La estructura terciaria define las interacciones entre los diferentes dominios que la forman.

La estructura **cuaternaria** se refiere a la interacción de varias cadenas polipeptídicas para formar un complejo proteico. Dicha unión se debe en general a los mismos tipos de interacciones débiles presentes en la estructura terciaria.

2.5 Proteínas Recombinantes

La obtención de proteínas recombinantes se logra mediante la inserción del gen de interés en un organismo diferente al que la genera naturalmente. La expresión de estas proteínas se ha convertido en una herramienta muy común, ya que es posible obtener altas cantidades de proteína con bajos costos de producción y altas purezas de una o varias proteínas de interés¹⁴.

Escherichia coli es ampliamente usada en la investigación como organismo huésped para la expresión de proteínas heterólogas; esto se debe a que es un sistema económico, escalable, con altos niveles de producción que está genéticamente caracterizado¹⁵ y que permite obtener proteínas recombinantes con características homólogas a las nativas mediante el uso de técnicas de biología molecular.

2.5.1 Purificación de Proteínas

La estrategia fundamental de la purificación de proteínas es simple: remover todos los contaminantes mientras se trata de retener en el mayor grado posible la proteína de interés¹⁵. Es importante señalar que antes de iniciar cualquier proceso de purificación es necesario identificar su localización a nivel celular y considerar las características químicas y físicas, como: solubilidad, carga eléctrica, polaridad, tamaño, especificidad de unión, etc., para seleccionar la técnica más apropiada para su aislamiento.

Existen muchos métodos de purificación de proteínas recombinantes; sin embargo, los métodos cromatográficos son los más usados por su facilidad en escalamiento, reproducibilidad y fácil validación¹⁴.

2.5.2 Lisis celular

En el caso de las proteínas expresadas intracelularmente es necesaria la ruptura de las células que la contienen. El método a escoger dependerá de lo frágil que sea la proteína y de que tan resistente sea la célula que se requiere romper¹⁵.

Los métodos de lisis celular se pueden clasificar en métodos mecánicos y no mecánicos. Los métodos mecánicos se dividen en métodos de corte en sólido (molino de perlas, presa X, etc.) o en suspensión (prensa francesa, molino coloidal, etc). Los métodos no mecánicos se pueden dividir en métodos físicos, métodos químicos y métodos biológicos¹⁷. Los métodos de ruptura celular que comúnmente son utilizados también incluyen el uso de enzimas, detergentes y choques osmóticos, puesto que los productos biológicos pueden ser extracelulares, intracelulares o periplásmicos.

La cavitación ultrasónica es una técnica eficaz para romper estructuras celulares utilizada ampliamente en el laboratorio debido a su economía, alta eficiencia y reproducibilidad. La vibración ultrasónica (15-20 kHz) se utiliza para la formación de pequeñas burbujas en un ciclo de baja presión que colapsan violentamente en un ciclo de alta presión, liberando así el material intracelular²².

2.5.3 Cromatografía de Afinidad

Actualmente existen diversos métodos para la purificación de una proteína, los cuales se clasifican de acuerdo con las propiedades de la proteína que se busca purificar, como lo son: superficie, tamaño, forma y carga.

La cromatografía de afinidad utiliza interacciones altamente específicas, generalmente entre un soluto y una molécula unida covalentemente a la fase estacionaria. Para el caso de purificación de proteínas recombinantes esta técnica consiste en la adición de una etiqueta de histidinas que permite la purificación de estas por medio de una cromatografía de afinidad por iones metálicos (IMAC)¹⁵.

La fuerza de unión entre una proteína y un ion metálico, en nuestro caso Ni^{2+} inmovilizado en la fase estacionaria, se ve afectada por varios factores, incluida la longitud de la etiqueta de afinidad en la proteína, el tipo de ion utilizado y el pH. Debido a que los iones metálicos están fuertemente quelados por el ligando ácido iminodiacético (IDA), la proteína unida se puede eluir ya sea con un agente quelante fuerte como el imidazol o simplemente bajando el pH.

2.5.4 Cromatografía Líquida en Fase Reversa

La cromatografía de fase reversa (Reversed Phase Chromatography, RPC) es un tipo de cromatografía en la cual se utiliza un *empaquete hidrofóbico*, usualmente un grupo funcional octadecilo u octilo como fase estacionaria y una fase móvil polar. La RPC es una técnica de purificación capaz de separar componentes con características muy similares, como proteínas que difieren en un solo aminoácido e isómeros conformacionales²⁵, esto debido a su versatilidad, detección sensible y su capacidad para trabajar en conjunto con técnicas como espectrometría de masas²³. Es importante señalar que el mecanismo de separación depende de las interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de soluto presentes en la fase móvil y el ligando hidrofóbico que se encuentra inmovilizado en la fase estacionaria.

La fase estacionaria de una columna determina la retención y la selectividad de la separación, se han demostrado que la retención de péptidos y proteínas depende en gran medida de su hidrofobicidad. En la actualidad la mayoría de las fases estacionarias utilizan polímeros sintéticos de poliestireno como matrices cromatográficas debido a la alta estabilidad química que presenta en un rango amplio de pH. La mayoría de las fases estacionarias consisten en matrices porosas e insolubles, a las cuales se unen químicamente compuestos hidrofóbicos. Los ligandos que generalmente están unidos a estos soportes son C₈ (n-octilo) o una cadena C₁₈ (n-octadecilo).

Es importante mencionar que la fase móvil que se emplea para la separación de péptidos y proteínas utiliza como disolventes agua y acetonitrilo. La retención hidrofóbica del analito en la fase estacionaria disminuye añadiendo un disolvente orgánico. Al decrementar la polaridad de la fase móvil, la retención del analito de interés se cambia hacia la fase móvil. La fase móvil contiene ácido trifluoroacético (TFA) en proporciones no mayores a 0.1%, esto con la finalidad de neutralizar las cargas en la proteína. El control de pH juega un papel muy importante ya que la retención aumenta conforme el pH maximiza la concentración de las especies ionizables; un pH bajo asegura que los ácidos débiles estén en su forma no iónica y las bases fuertes en su forma protonada, provocando así una mayor interacción con la fase estacionaria.

2.6 CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS

2.6.1 Espectrometría de Masas (MALDI-TOF)

La espectrometría de masas es una técnica analítica útil en la determinación de masas moleculares de proteínas; esto debido a su alta sensibilidad, elevado poder de resolución y exactitud. MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time-Of-Flight) es una técnica de ionización suave empleada para el análisis de péptidos y proteínas sin provocar la fragmentación de esta; la muestra es ionizadas por la incidencia de pulsos cortos de láser en alto vacío. Dicha ionización se favorece por la mezcla de la proteína con una matriz sólida, generalmente ácido α -ciano-4-hidroxicinámico, la cual se utiliza para volatilizar la muestra y transferir protones de la matriz a las moléculas de la muestra²⁶, generando así especies monocargadas que son analizadas en el detector. El analizador TOF realiza la determinación de la masa mediante la medición precisa del tiempo que tardan en llegar los iones de la muestra desde la fuente al detector.

2.6.2 Dicroísmo Circular (DC)

Esta técnica permite estimar rápidamente el contenido de estructura secundaria y las propiedades de plegamiento de una proteína²⁷. El dicroísmo circular se define como la diferencia entre la absorción de luz polarizada circularmente a la izquierda y a la derecha por compuestos ópticamente activos, es decir, que no disponen de un plano de simetría y no son superponibles con su imagen especular²⁷.

Cuando la luz polarizada pasa a través de la muestra y ésta no absorbe o absorbe en la misma medida, la combinación de los componentes regenera la radiación polarizada al plano original **(a)**; en cambio si uno de los componentes de la luz es absorbido por la muestra en mayor medida que el otro, la componente resultante trazaría una elipse, generando así una polarización elíptica **(b)**²⁸ (figura VI).

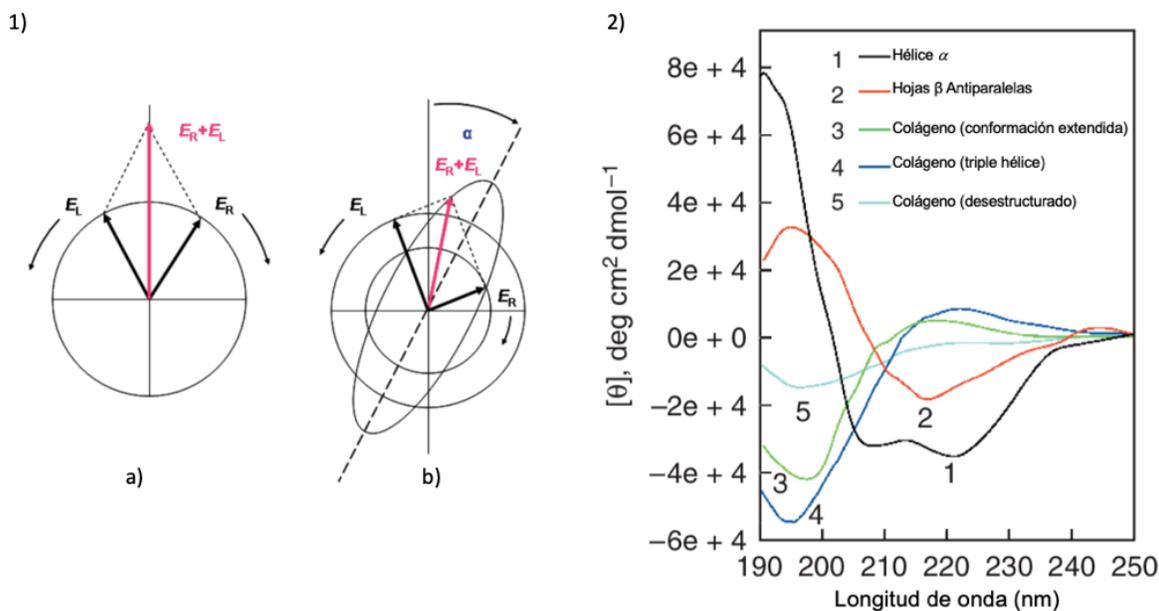


Figura VI. 1.-En a) Componentes circularmente polarizados izquierda y derecha (EL) y (ER) respectivamente, generando radiación polarizada en el mismo plano. En b) Componentes circularmente polarizados de diferente magnitud, generando una polarización elíptica. 2.-Espectros de DC de polipéptidos y proteínas con estructuras secundarias representativas.

La estructura secundaria de las proteínas se estima por espectroscopia de dicroísmo circular en la región de UV lejano (240-190 nm). En esta región la señal se origina debido a que el enlace peptídico se encuentra en un ambiente regular plegado²⁸.

Por lo tanto, la intensidad de las transiciones depende de los ángulos de torsión de φ y ψ . Las hélices α , las hojas β , y las estructuras helicoidales aleatorias dan lugar a un espectro de forma y magnitud característica, respectivamente (Figura VI).

2.6.3 Resonancia Magnética Nuclear para determinación estructural de proteínas

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una de las técnicas que permite la determinación de estructuras tridimensionales de proteínas y péptidos en disolución con resolución atómica. La espectroscopia de RMN es una manifestación del momento angular de espín nuclear, el momento angular de espín se caracteriza por el número cuántico, I^{29} .

Los núcleos más importantes en RMN aplicada al estudio de proteínas con un valor $I=1/2$ son: ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F y ^{31}P . Según la mecánica cuántica, el momento angular total, $|L|_{\text{TOT}}$, está cuantizado, con un valor $\sqrt{I \cdot (I + 1)} \cdot \hbar$, donde \hbar es la constante de Planck dividida entre 2π . Además del módulo, es importante conocer el momento angular sobre el eje z, I_z , dado por $I_z = \hbar \cdot m$, donde m es el número cuántico magnético asociado a la componente z del momento angular de espín nuclear y está restringido a valores de $m = (-l, -l + 1, \dots, l - 1, l)$. Para un núcleo determinado, por ejemplo, para ^1H , m_l tendrá dos posibles valores: $+1/2$ y $-1/2$.

En ausencia de campo externo las diferentes orientaciones del dipolo magnético serán energéticamente equivalentes y, por tanto, se tendrá un conjunto de estados degenerados. En presencia de un campo magnético externo estos diferentes estados (orientaciones) adquieren energías diferentes. Por ejemplo, para el ^1H (protón) el número cuántico de espín I vale $1/2$ por tanto m_l puede tomar los valores $+1/2$ o $-1/2$, teniéndose dos posibles orientaciones con dos energías de interacción^{30,31} (figura VII).

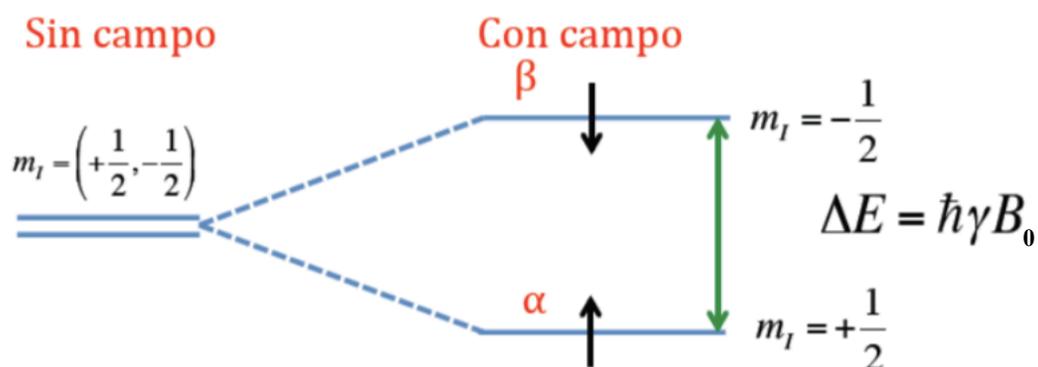


Figura VII. Diferencia de energía entre dos niveles con espín $\frac{1}{2}$ ³⁰.

Durante un experimento de RMN, la intensidad de la señal es proporcional a la diferencia poblacional entre los estados involucrados, dicha distribución puede ser calculada por la distribución de Boltzman:

$$\frac{N_{\beta}}{N_{\alpha}} = e^{-\Delta E/k_B T}$$

Sin embargo, la diferencia poblacional entre los dos niveles es muy pequeña, por lo que la señal espectroscópica será muy débil, lo que hace a la espectroscopia de RMN una técnica poco sensible.

Durante el experimento no observamos a un solo núcleo, sino un gran número de ellos, por lo que es importante señalar que siempre estaremos observando el efecto neto de la suma de todos los núcleos observados. En el equilibrio los momentos magnéticos no se alinean aleatoriamente, de tal forma que la suma de sus contribuciones genera un campo magnético neto (vector de magnetización) orientado en la dirección del campo magnético externo (B_0). Al aplicarse un pulso de radiofrecuencias, la transición entre los niveles energéticos genera que el vector de magnetización rote hacia el eje y; el cual, al regresar al equilibrio describe un movimiento de precesión, denominada precesión de Larmor.

La magnitud de la frecuencia de precesión es idéntica a la frecuencia de la radiación electromagnética requerida para excitar las transiciones entre los niveles energéticos, dando lugar al fenómeno de resonancia magnética nuclear²⁹.

En un experimento de RMN de una dimensión, lo que se detecta es la precesión del vector de magnetización que decae en función del tiempo. La transformada de Fourier se aplica en la función en el dominio del tiempo (FID, Free Induction Decay) y la transforma en una función en el dominio de las frecuencias. Las frecuencias observadas resultan de la diferencia entre una señal de referencia (TMS, tetrametilsilano) y la señal de resonancia de la muestra, la cual depende de los campos magnéticos locales generados por la densidad electrónica de cada núcleo (entorno químico). En la práctica, los cambios químicos son muy pequeños, por lo que es común multiplicar la diferencia por un factor de un millón. El desplazamiento químico (δ) se define por:

$$\delta_{muestra} = \frac{\nu_{muestra} - \nu_{referencia}}{\nu_{referencia}} * 10^6$$

Aunque un espectro de RMN de ^1H de una proteína es muy difícil de interpretar debido a la gran cantidad de señales traslapadas correspondientes a todos los protones presentes, se puede extraer información acerca del plegamiento de la misma; ya que si la proteína tiene un plegamiento definido, el espectro de ^1H tendrá una amplia dispersión de señales entre 5-9 y alrededor de 0.9 ppm, donde los protones de amida de la cadena principal se encuentran formando puentes de hidrógeno y los metilos interaccionan con los aminoácidos aromáticos respectivamente, generando así ambientes químicos diferentes para cada protón, como se muestra en la figura VIII.

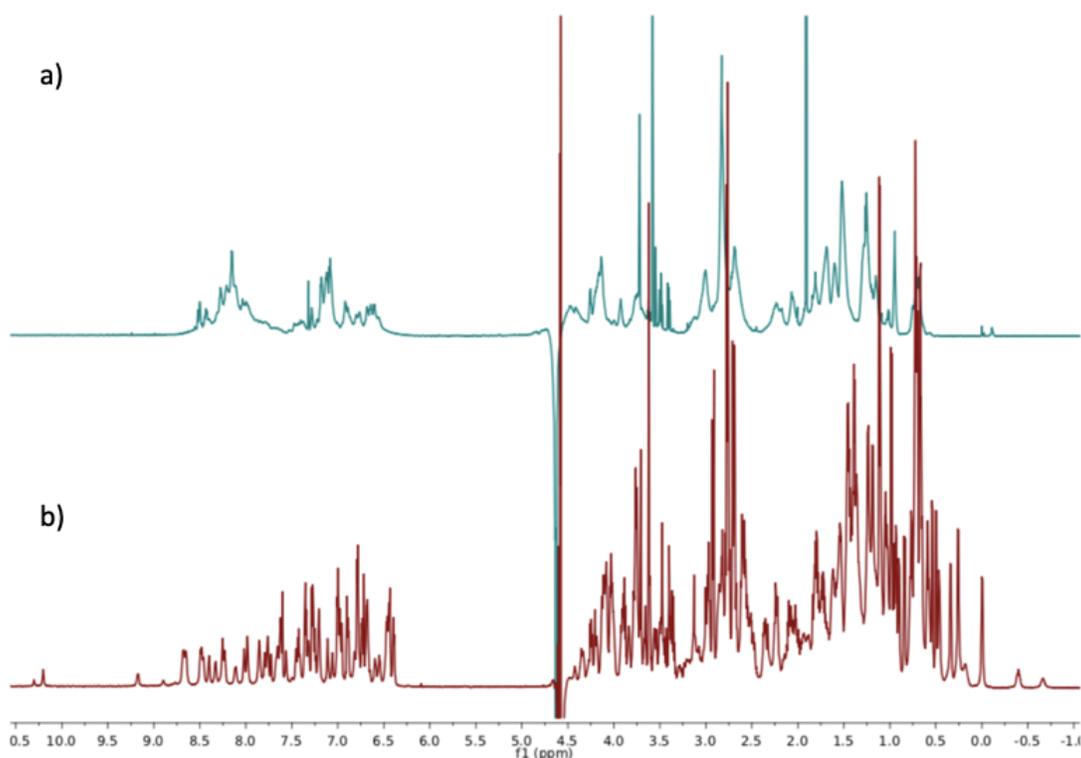


Figura VIII. Comparación de los espectros de ^1H , en a) Proteína desestructurada (TsTXK-beta/60aa) y en b) Proteína con plegamiento definido (EhMyBS23/60aa).

Debido a la sobreposición de señales es necesario obtener espectros multidimensionales para lograr elucidar la estructura tridimensional de la proteína de interés. En un espectro de dos dimensiones dos nuevos elementos, tiempo de evolución y tiempo de mezclado, son introducidos entre los periodos de preparación y detección de la señal (figura IX). El tiempo de evolución contiene un tiempo variable que se incrementa durante el transcurso del experimento desde un valor inicial hasta un valor final en “m” incrementos de t_1 . Así, la adquisición de un espectro bidimensional implica repetir una secuencia de pulsos para

aumentar los valores de t_1 y registrar un FID como una función de t_2 para cada valor de t_1 ³¹. Según sea la secuencia de pulsos utilizada, será la información que se logre obtener del sistema²⁹.



Figura IX. Esquema general de la adquisición de un espectro bidimensional.

De manera general, para proteínas menores a 7 kDa es posible determinar la estructura tridimensional con espectros bidimensionales homonucleares de ^1H , esto mediante la asignación de los sistemas de espín presentes en la proteína. Para identificar aquellas señales que corresponden a un mismo aminoácido (mismo sistema de espín) el experimento ^1H - ^1H TOCSY (*T*otal *C*orrelated *S*pectroscop*Y*) muestra la correlación que existe entre núcleos que se encuentran formando un sistema de espín. Para el caso de proteínas debemos asignar tantos sistemas de espín como aminoácidos presentes en la secuencia. El experimento ^1H - ^1H COSY (*C*orrelated *S*pectroscop*Y*), es de gran ayuda debido a que muestra las correlaciones que existen entre núcleos que se encuentran acoplados escalarmente entre ellos a dos o tres enlaces de distancia³¹. Para un sistema ABCD, el experimento COSY nos muestra la correlación que existe entre los núcleos A-B, B-C y C-D, mientras que el experimento TOCSY nos muestra la correlación que existe entre los núcleos A-B-C-D.

Por último, el experimento NOESY (*N*uclear *O*verhauser *E*ffect *S*pectroscop*Y*) muestra las correlaciones dipolares entre dos núcleos cercanos³¹, es decir, muestra la interacción presente entre núcleos que se encuentran a una distancia menor o igual a 5\AA , con lo cual es posible determinar el plegamiento que presenta la proteína.

3 HIPOTESIS

La neurotoxina β -KTx 14.3 del alacrán *Lychas mucronatus* obtenida de manera recombinante presentará un plegamiento definido característico en las toxinas de la familia β -KTx presentando dos dominios diferentes: un segmento N-terminal intrínsecamente desestructurado y un segmento C-terminal rico en cisteínas, formando así el motivo estructural característico CS- α/β .

4 OBJETIVOS

- ✓ Obtener por medio de técnicas de Biología Molecular la toxina β -KTx 14.3 del alacrán *Lychas mucronatus*.
- ✓ Purificar la toxina del alacrán por medio de técnicas cromatográficas (CAMQ y RCP).
- ✓ Caracterizar la toxina del alacrán mediante técnicas espectroscópicas
 - Espectrometría de Masas (MALDI-TOF).
 - Resonancia Magnética Nuclear (RMN).
 - Dicroísmo Circular (DC).
- ✓ Determinar la estructura tridimensional de la toxina β -KTx 14.3 por RMN.
- ✓ Evaluar la capacidad de bloqueo de la neurotoxina β -KTx 14.3 en canales de K⁺ (*Shaker* y KCNQ1)

5 DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA

5.1 Biosíntesis de la toxina β -KTx 14.3

Se utilizó el plásmido **pET-32a(+)** modificado donde se optimizaron las condiciones de expresión de la toxina de interés (tiempo de inducción, temperatura, concentración de IPTG y cepa a utilizar) para su posterior purificación y caracterización.

5.2 Transformación

El plásmido de trabajo **pET-32a(+)/ β -KTx 14.3** contiene la secuencia que codifica para la proteína de fusión, la cual consta de cuatro regiones como se puede observar en la figura X.



Figura X. Representación de la proteína de fusión, con las cuatro regiones presentes en ésta. La tiorredoxina es una proteína chaperona que favorece el plegamiento de la β -KTx 14.3, seis histidinas útiles en la purificación y el sitio de corte enzimático.

El plásmido pET-32a(+)/ β -KTx 14.3 se insertó en células competentes de *E. coli* (*RosettaTM*, *BL21 (DE3)TM*, *C41 (DE3)TM*) por medio de un choque térmico, mediante el siguiente protocolo:

- i. Añadir 3 μ L del plásmido a células competentes de *E. coli*, y mantener en un baño de hielo por 30 min.
- ii. Realizar choque térmico a 45°C por 45 segundos.
- iii. Añadir 200 μ L de medio LB estéril e incubar las células a 37°C por 1 hora.
- iv. Sembrar las células en una caja con medio LB sólido, con los antibióticos apropiados.
- v. Incubar la caja a 37°C por 12-16 horas.

5.3 Optimización de la expresión de la toxina β -KTx 14.3

✓ Temperatura

Una vez obtenidas las células transformadas se realizó una cinética de crecimiento con la finalidad de evaluar el tiempo y la temperatura óptima en la cual se produce una mayor cantidad de proteína de fusión de manera soluble a dos temperaturas diferentes (18°C y 30°C), utilizando la cepa de *E. coli RosettaTM*.

✓ Elección de Cepa

Una vez seleccionada la temperatura y el tiempo de expresión, se realiza la comparación con las diversas cepas de *E. coli*, comparando las cepas *RosettaTM*, *BL21 (DE3)TM* y *C41 (DE3)TM*.

✓ Concentración de IPTG

Así mismo se buscó evaluar la influencia de la concentración de IPTG en la expresión de la proteína de fusión, para lo cual se utilizaron las siguientes concentraciones de IPTG: 0.125mM, 0.25mM, 0.5mM y sin IPTG.

5.4 Lisis celular

Determinadas las condiciones de expresión (30°C a 200 RPM por 8 horas, cepa: *C41 (DE3)TM*, IPTG: 0.125mM), se llevó a acabo una expresión de mayor volumen, utilizando 1.5 L de medio LB. Las células se dejan crecer en medio LB (50 mL aproximadamente) en agitación constante a 37°C por 12-16 horas (preinóculo) para después crecerlas en un último cultivo (1.5 L), en el cual se verifica el crecimiento bacteriano hasta una densidad óptica de 0.6-0.7 a 600 nm, momento en el cual se ha alcanzado la fase logarítmica de crecimiento.

Trascurrido el tiempo de expresión, se centrifugó el medio a 6500 RPM, 4°C por 15 minutos y se generó un paquete celular el cual fue resuspendido en 60 mL de solución amortiguadora de lisis, *ver Anexo Disoluciones*. La lisis celular se realizó por medio de choques sónicos a 55 W durante 10 minutos, en intervalos de 30 s en “on” y 30 s en “off”, en un baño de hielo. Este lisado se centrifugó a 16500 RPM, 4°C por 45 minutos para separar la fracción soluble de la no soluble y fragmentos celulares. Las muestras fueron cargadas en un gel desnaturizante de poliacrilamida SDS-PAGE 15%.

5.5 PURIFICACIÓN

5.5.1 Purificación por Cromatografía de Afinidad Metal-Quelato (CAMQ)

La fracción soluble se pasó por una membrana de 0.45 µm. Posteriormente se hizo pasar por una columna de afinidad metal-quelato HiTrap® cargada con Ni²⁺ en donde gracias a la etiqueta de seis histidinas, se retienen y separan las proteínas propias de la bacteria. Para eluir la proteína de interés se llevaron a cabo diferentes lavados de solución amortiguadora de elución, *ver Anexo Disoluciones*, con diferentes concentraciones de imidazol (25, 50, 75, 100, 300 y 500 mM).

5.5.2 Corte con Enteroquinasa

Una vez purificada la proteína de fusión, el siguiente paso fue realizar el corte enzimático por lo cual es necesario dializar la fracción que la contiene. Esto se llevó a cabo utilizando una membrana de diálisis Biotech de 8-10 kDa, la cual elimina el exceso de imidazol presente, ya que éste interfiere en la reacción de corte. La fracción que contiene la proteína de fusión fue dializada contra una disolución amortiguadora de corte, *ver Anexo Disoluciones*. Se cambió la disolución amortiguadora de corte cada dos horas hasta completar 6 horas. El paso anterior se supervisa midiendo la absorbancia de la disolución hasta alcanzar el equilibrio.

La reacción de corte se realizó utilizando la proteasa enteroquinasa evaluando diferentes condiciones con la finalidad de optimizar la eficiencia del corte (24 horas, 37°C y 0.5 U/mg proteína). Una vez realizado el corte enzimático se realiza una segunda cromatografía de afinidad metal-quelato, donde en esta ocasión, la fracción que no tendrá afinidad es nuestra proteína de interés. Como la etiqueta de histidinas se queda en la proteína de fusión, ya que la enteroquinasa realiza el corte enzimático en el enlace peptídico formado entre el aminoácido lisina (K) y nuestra proteína de interés, es posible efectuar este procedimiento.

5.5.3 Cromatografía Líquida en Fase Reversa

Con la finalidad de concentrar la fracción en donde se encuentra la proteína de interés libre de la etiqueta de histidinas, se realizó una purificación en fase sólida Strata C18-T y se eluyó con soluciones de diferentes concentraciones de acetonitrilo/agua (10-100% ACN). Estas fracciones se liofilizaron y se inyectaron en una columna de fase reversa Jupiter 4 μ Proteo 90 Å C-12 de 250 mm de largo y 4.6 mm de diámetro interno acoplada a un sistema HPLC equilibrada con H₂O y acetonitrilo, ambos con 0.05% de TFA, en un equipo Varian Pro-Star donde se colectaron los picos mayoritarios y se analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF .

Todo este proceso se sigue con ayuda de geles de poliacrilamida, con los cuales se pudo observar la expresión de la proteína y se determinó en que fracción se encontraba (30% ACN).

5.6 CARACTERIZACIÓN

5.6.1 Caracterización por Espectrometría de Masas (MALDI-TOF)

Se realizó un análisis por Espectrometría de Masas MALDI-TOF en un equipo Bruker Daltonics MicroFlex en el laboratorio de servicios analíticos del Instituto de Química de la UNAM, para determinar el peso molecular de la toxina. La matriz utilizada fue ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (disolución sobresaturada 1:1 H₂O/acetonitrilo al 0.05% TFA). El modo de adquisición fue lineal, en polaridad positiva utilizando 100 pulsos con una intensidad de 30%. La ventana espectral fue de 3000 a 11000 Da. Para la calibración del

equipo se utilizaron las proteínas Tt28 (3455 Da), HgeD (4797.57 Da) y Citocromo C (6181.05Da).

5.6.2 Caracterización estructural por Dicroísmo Circular (DC)

Los espectros de DC de la neurotoxina β -KTx 14.3 se registraron en un espectropolarímetro marca Jasco J-1500 a una concentración de proteína de 0.3 mg/mL en agua milli Q. Los espectros se midieron a 20°C en el UV lejano (240-190 nm) utilizando una celda de cuarzo (de paso óptico) de 0.1 cm de espesor. Los datos se registraron en intervalos de 1 nm con una velocidad de barrido de 20 nm/min, con un número de acumulaciones igual a 3.

La elipticidad molar por residuo $[\theta]_{MRW}$ se calculó según la siguiente ecuación²⁸:

$$[\theta]_{MRW} = \frac{MRW \cdot S}{10 \cdot C \cdot L} = [deg \cdot cm^2 \cdot dmol^{-1}]$$

Donde MRW es la masa media del residuo, que es el cociente entre el peso molecular y el número de aminoácidos menos uno ($MRW = PM/(N - 1)$), S es la señal del dicroísmo en grados, C es la concentración de la proteína en g/mL y L es la longitud de la celda en cm.

5.6.2 Caracterización Estructural por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los espectros de ¹H-RMN de la neurotoxina β -KTx 14.3 se obtuvieron en un equipo Bruker de 700 MHz a 25°C, equipado con una criosonda de resonancia triple ¹H/¹³C/¹⁵N utilizando 300 μ L de una disolución 1-3 mM de la toxina pura, disuelta en una mezcla de H₂O/D₂O 95/5%. El experimento TOCSY fue obtenido con un tiempo de mezclado de 80 ms mientras que los experimentos NOESY se adquirieron con tiempos de mezclado de 150 y 300 ms. La señal del agua fue eliminada mediante la secuencia de pulsos DPFGE (double pulsed field gradient spin echo)⁴⁶.

Los datos se obtenidos de los experimentos bidimensionales se procesaron en el programa nmrPipe³³ y la interfaz nmrDraw. La asignación de los sistemas de espín se realizó con el programa CARRA 1.5, utilizando la herramienta XEASY³⁵. La asignación secuencial completa se logró mediante la estrategia general descrita por Wüthrich³⁶. Una vez obtenidas las restricciones de distancia a partir del espectro NOESY se realizan los cálculos estructurales en CYANA 2.1³⁷. A partir de las 20 mejores estructuras generadas por el programa CYANA, se procede a realizar un afinamiento de la estructura tridimensional mediante AMBER 16³⁸ en vacío y en disolvente explícito.

5.6.4 Pruebas de actividad en canales iónicos dependientes de voltaje

Se transfectaron células HEK 293T a 40–50% de confluencia usando Lipofectamine 2000 Invitrogen con plásmidos que expresan los canales de K⁺ KCNQ1 y *Shaker*, se cotransfectaron con GFP en una proporción de de 1: 0.2 microgramos en placas de plástico para cultivo de tejido de 35 mm. Las mediciones se realizaron mediante la técnica de Patch Clamp 24-48 h después de la transfección, utilizando pipetas de vidrio de borosilicato pulidas al fuego (instrumentos Sutter) con resistencia de 3 a 5 mΩ, rellenas con solución interna: 150 mM KCl, 5 mM EGTA, 1 mM CaCl₂ y 10 mM HEPES, pH 7.4 con KOH. Las soluciones externas contenían: 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂ y 10 mM HEPES (ajustado a pH 7.4 con NaOH). Las mediciones se realizaron utilizando un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices) a un potencial de retención de -80 mV y aplicando pulsos de -80 mV a -60 mV, adquiridos a 10 kHz con el software pCLAMP10 (Molecular Devices) y filtrados en línea a 5 kHz.

6 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

6.1 Optimización de la expresión de la neurotoxina β -KTx 14.3

El plásmido pET-32a(+)/ β -KTx 14.3 se introdujo en tres cepas diferentes de *E. coli*, *Rosetta*TM, *BL21 (DE3)*TM y *C41(DE3)*TM, con la finalidad de evaluar cual de ellas tenía una mayor expresión de la proteína de fusión en medio soluble. Para ello se realizaron cinéticas de expresión a diferentes condiciones, en las cuales se evaluaron 3 parámetros: temperatura de expresión (18°C y 30°C), cepa (*Rosetta*TM, *BL21 (DE3)*TM y *C41(DE3)*TM) y concentración de IPTG (0.125 mM, 0.25 mM y 0.5 mM).

La temperatura a la cual la producción de la proteína de fusión es mayor se fijó en 30°C. Se determinó que el tiempo óptimo de crecimiento se encuentra a las ocho horas, ya que después de ese tiempo la banda correspondiente a la proteína de fusión comienza a desaparecer, producto de la degradación de ésta por la bacteria o a la formación de agregados proteicos, (figura XI). La cepa *C41(DE3)*TM mostró una mayor producción de la proteína de fusión debido a que dicha cepa contiene al menos una mutación genética que previene la muerte celular asociada con la expresión de proteínas tóxicas recombinantes. La cepa de elección para la expresión de la neurotoxina β -KTx 14.3 fue *C41(DE3)*TM. Por otro lado, no se observó que existiera influencia en la producción de la proteína de fusión debido a la concentración de IPTG, por lo cual se decide utilizar la concentración menor (0.125mM).

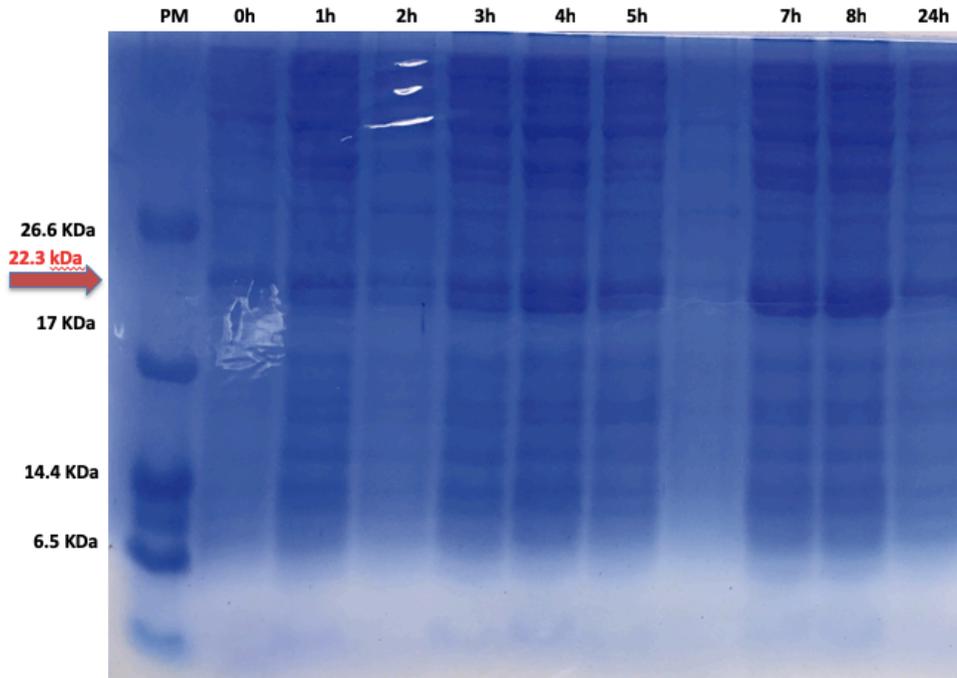


Figura XI. Cinética de expresión de la proteína de fusión soluble en la cepa de *E. coli*, *C41(DE3)TM*. La flecha roja indica el peso de la proteína de fusión de 22.3 kDa. (Gel desnaturalizante SDS-PAGE 15%)

Determinadas las condiciones óptimas para la expresión (30°C a 200 RPM por 8 horas, cepa: *C41(DE3)TM*, IPTG: 0.125mM) se realiza una expresión de mayor volumen (1.5L). El paquete celular obtenido (2.33 mg/L de cultivo) es lisado (55 W durante 10 minutos, en intervalos de 30 s en “on” y 30 s en “off”) y centrifugado (16500 RPM, 4°C por 45 minutos) para separar la fracción soluble de la no soluble y fragmentos celulares para continuar la purificación.

6.2 Purificación por Cromatografía de Afinidad Metal-Quelato (CAMQ)

El sobrenadante obtenido se pasó por una columna HiTrap® cargada con Ni²⁺, durante este proceso la proteína de fusión fue retenida en la columna HiTrap® gracias a la etiqueta de histidinas presente. Para eluir la proteína de interés se realizan lavados de diferentes concentraciones de imidazol (figura XII).

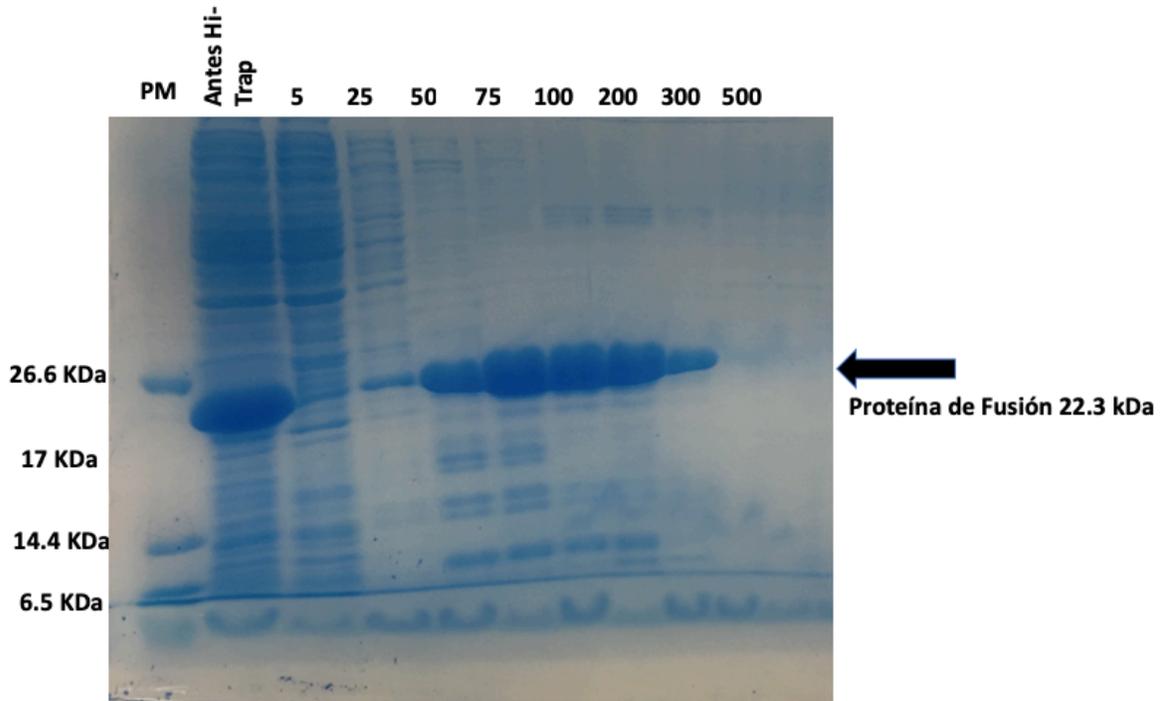


Figura XII. Purificación por cromatografía de afinidad metal-quelato. En el primer carril (PM) se muestran los marcadores de pesos moleculares en kDa. En el siguiente carril (Antes Hi-Trap) se muestra el lisado antes de pasar por la columna y en los siguientes carriles (5-300 mM) se muestran las diferentes concentraciones de imidazol con las cuales se eluye la proteína de fusión. (Gel desnaturalizante SDS-PAGE 15%)

Como se observa en la figura XII, en las primeras fracciones correspondientes a 5 y 25 mM de imidazol se eliminan de la columna las proteínas con afinidad baja y en las fracciones correspondientes de 50 mM hasta 300 mM de imidazol se encuentra la proteína de fusión, por lo cual se decide utilizar las primeras dos fracciones de imidazol como un lavado previo de las proteínas con poca afinidad y realizar una elución total con la fracción de 300 mM de imidazol con la finalidad de tener toda la proteína de fusión en una sola fracción, facilitando así su posterior purificación.

El paso siguiente es el corte enzimático, por lo cual es necesario dializar la proteína de fusión contra una disolución amortiguadora de corte, *ver Anexo Disoluciones*. Una vez eliminado el imidazol, la proteína de fusión se cuantifica utilizando el coeficiente de extinción molar calculado mediante el servidor ExPASy ProtParam, el cual permite el cálculo de parámetros físicos y químicos para una proteína o secuencia de aminoácidos determinada.

6.3 Corte con Enteroquinasa

Conociendo la concentración final de la proteína de fusión se buscan las condiciones óptimas donde el corte enzimático es más eficiente, por lo cual se evaluaron las siguientes condiciones. (tabla 1).

Tabla 1. Condiciones probadas para el corte enzimático con enteroquinasa a 37°C.

	<i>Concentración de proteína de fusión [mg/mL]</i>	<i>Enteroquinasa [unidades/mg]</i>	<i>Agente Desnaturalizante</i>
<i>1</i>	1	1	Ninguno
<i>2</i>	1	1	0.1% Tritón
<i>3</i>	1	0.5	Ninguno
<i>4</i>	1	0.25	0.1% Tritón
<i>5</i>	1	0.1	0.1% Tritón

El corte enzimático más eficiente ocurre en la condición número 3 de la tabla, sin la utilización de agente desnaturalizante ya que no se observa una influencia favorable durante la reacción de corte por la adición de este. Esta reacción se verifica mediante electroforesis en gel como se muestra en la figura XIII.

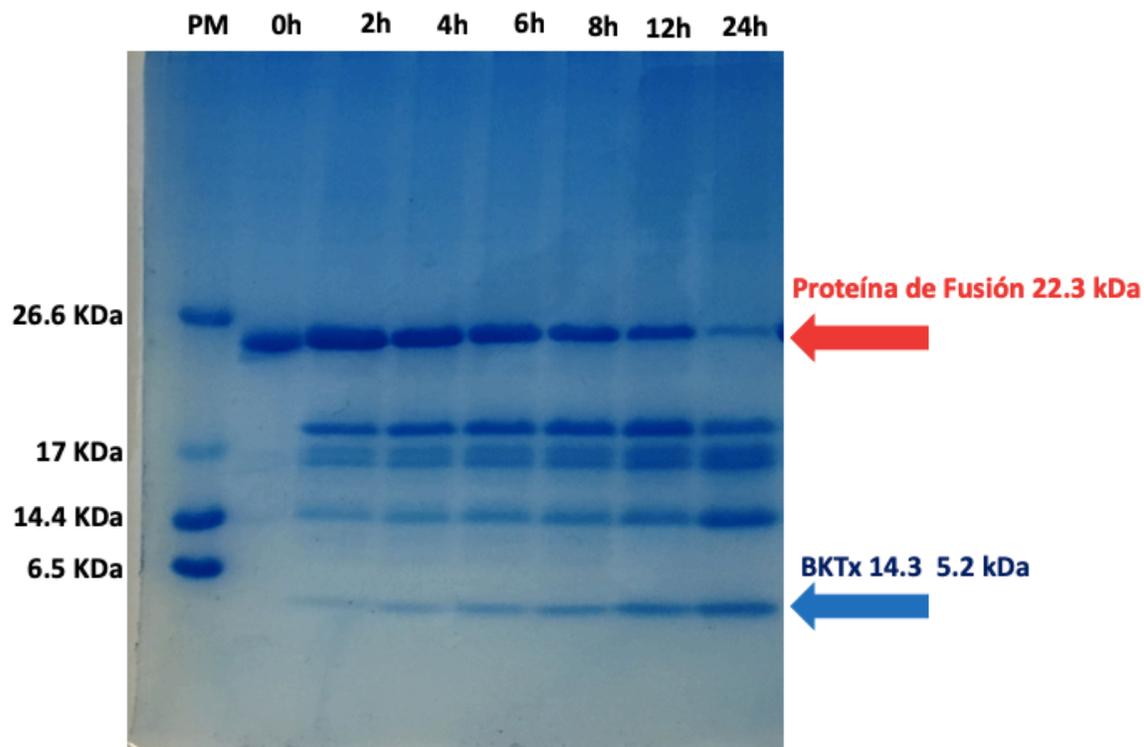


Figura XIII. Cinética de la reacción de corte de la proteína de fusión utilizando enteroquinasa. En el primer carril (PM) se muestran los marcadores de pesos moleculares en kDa. En el recuadro rojo se observa la desaparición de la banda correspondiente a la proteína de fusión. Se observa, en el recuadro azul, la banda de intensidad creciente correspondiente a la neurotoxina β -KTx 14.3. (Gel desnaturalizante SDS-PAGE 15%)

En la figura XIII se observa que el tiempo necesario para una mayor eficiencia en el corte enzimático ocurre a las 24 horas. Es importante señalar que además de la banda característica correspondiente a la proteína de interés, se puede observar la presencia de bandas de diferentes pesos moleculares las cuales corresponden al residuo de corte, así como a cortes inespecíficos realizados por la enzima. Se realiza una segunda cromatografía de afinidad metal-quelato, donde la fracción que no presenta afinidad a la columna será la neurotoxina β -KTx 14.3.

6.4 Cromatografía Líquida en Fase Reversa

Con la finalidad de concentrar la muestra, la fracción anterior se pasó por una columna en fase sólida Strata C18-T. La elución se realizó con un gradiente de acetonitrilo/agua (10-100% ACN). Se realizó el seguimiento mediante electroforesis en gel desnaturalizante (figura XIV).

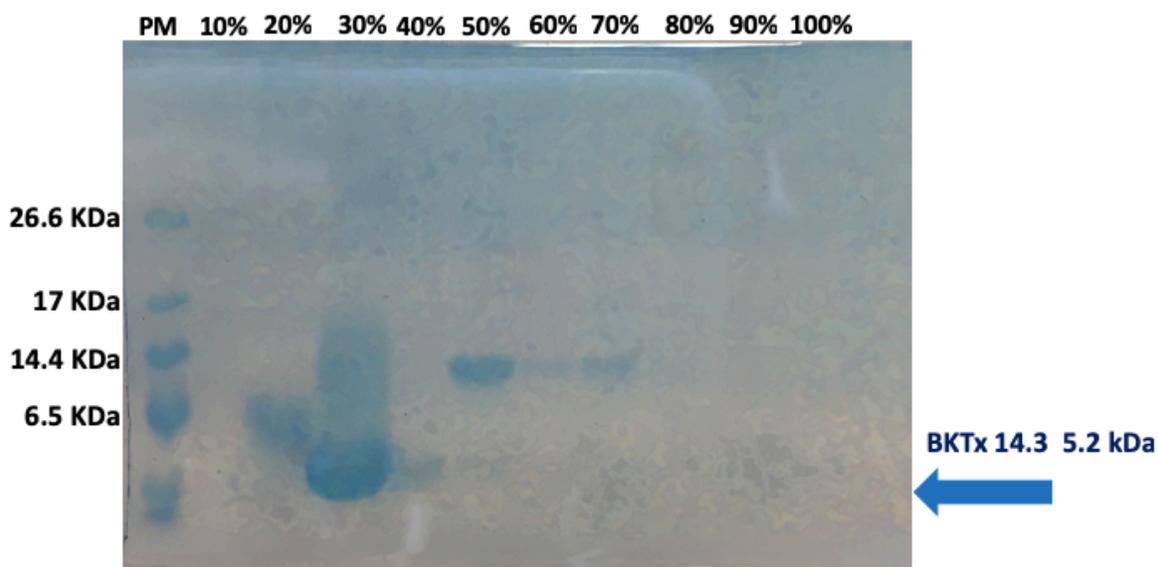


Figura XIV. Extracción en fase sólida, gel desnaturante de poliacrilamida al 15%. En el primer carril (PM) se muestran los marcadores de pesos moleculares en kDa. En el recuadro rojo se observa la banda correspondiente a la neurotoxina β -KTx 14.3.

En la figura XIV, se observa que en la fracción de 30% de ACN existe una banda la cual podría corresponder a la neurotoxina β -KTx 14.3. Esta fracción se liofiliza y se purifica utilizando una columna de fase reversa C-12 acoplada a un sistema HPLC, donde se observa un solo pico que eluye en un tiempo de 14 minutos (figura XV).

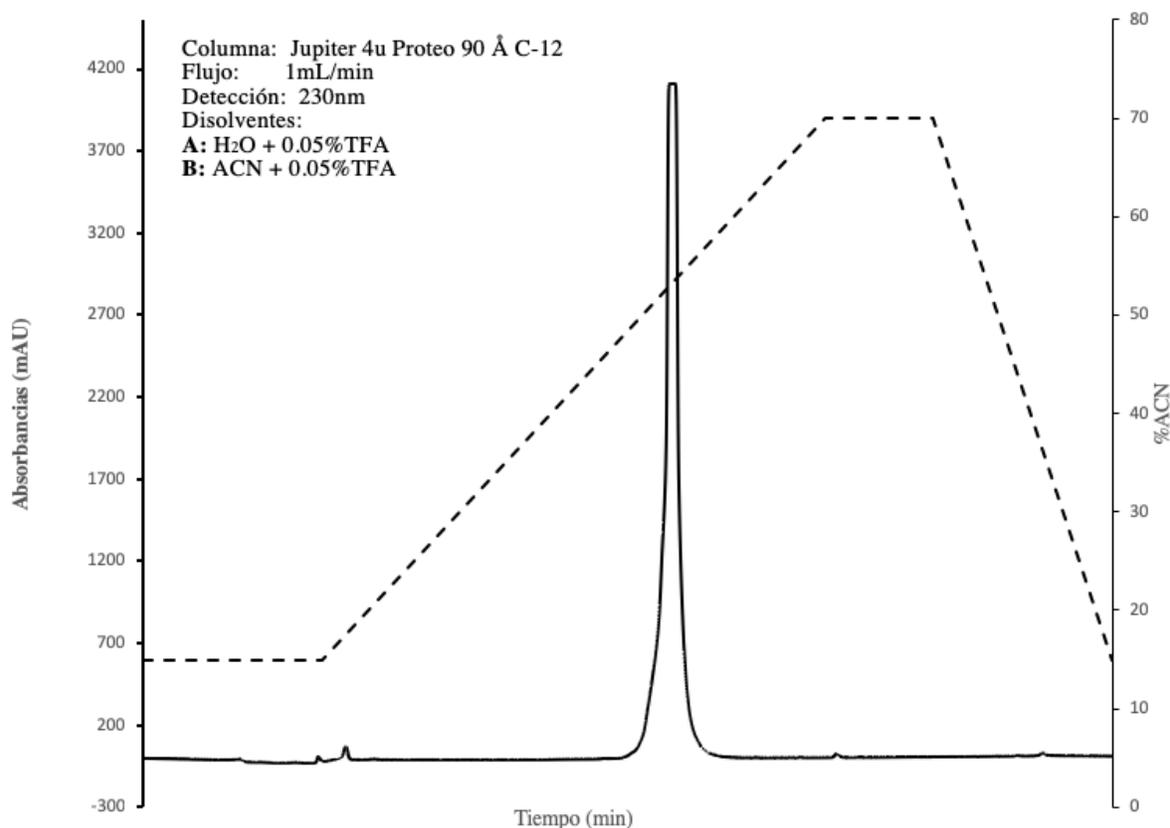


Figura XV. Cromatograma de la purificación de la neurotoxina β -KTx 14.3. En línea punteada se muestra el gradiente empleado durante la purificación. La detección se realizó a una longitud de 230 nm.

El único pico que eluye es colectado y liofilizado. Posteriormente, se cuantifica, obteniéndose un rendimiento de 2.33 mg de toxina por litro de cultivo.

6.5 Caracterización por Espectrometría de Masas (MALDI-TOF)

El análisis confirma la obtención de la neurotoxina β -KTx 14.3 con una masa experimental de 5260.24 Da, comparada con la masa teórica obtenida por el servidor ExPASy ProtParam de 5265.04 Da. La diferencia de masas nos permite asumir que la toxina obtenida se encuentra en su forma oxidada, debido a que por cada enlace disulfuro formado debe existir una diferencia de dos unidades de m/z. Si la toxina presenta tres enlaces disulfuro la masa teórica de la neurotoxina β -KTx 14.3 es 5259.04 Da. En la figura XVI, podemos observar el pico para el **ion molecular** $[M+H]^+$ con una relación m/z de 5260.24 Da, con lo cual se confirma la obtención de la proteína recombinante, la cual se encuentra formando tres enlaces disulfuro.

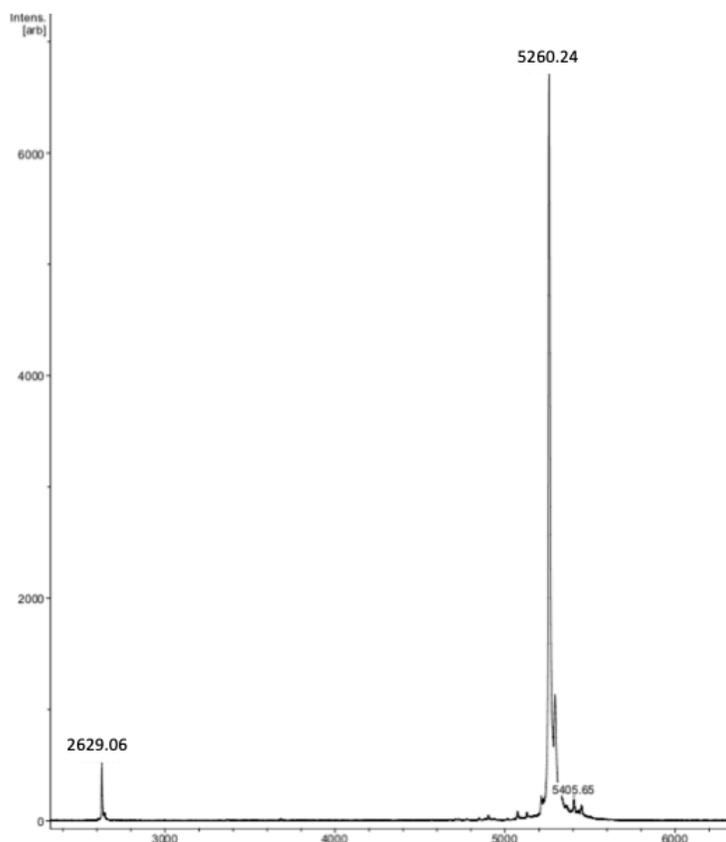


Figura XVI. Espectro de masas MALDI-TOF de la neurotoxina β -KTx 14.3. Es posible observar un pico en una relación m/z de 2629.06 Da, el cual corresponde a la proteína doblemente cargada.

6.6 Caracterización estructural por Dicroísmo Circular (DC)

En la figura XVII, se observa el espectro de dicroísmo circular de la neurotoxina β -KTx 14.3, el cual presenta la forma y magnitud características para una proteína con estructura secundaria definida del tipo α/β , las cuales casi siempre tienen espectros dominados por hélices α , por lo tanto, muestra bandas a 222, 208, y 190-195 nm. En ocasiones puede haber un solo espectro ancho entre 210 y 220 nm debido a la suma de las contribuciones de las hélices α y hojas β .

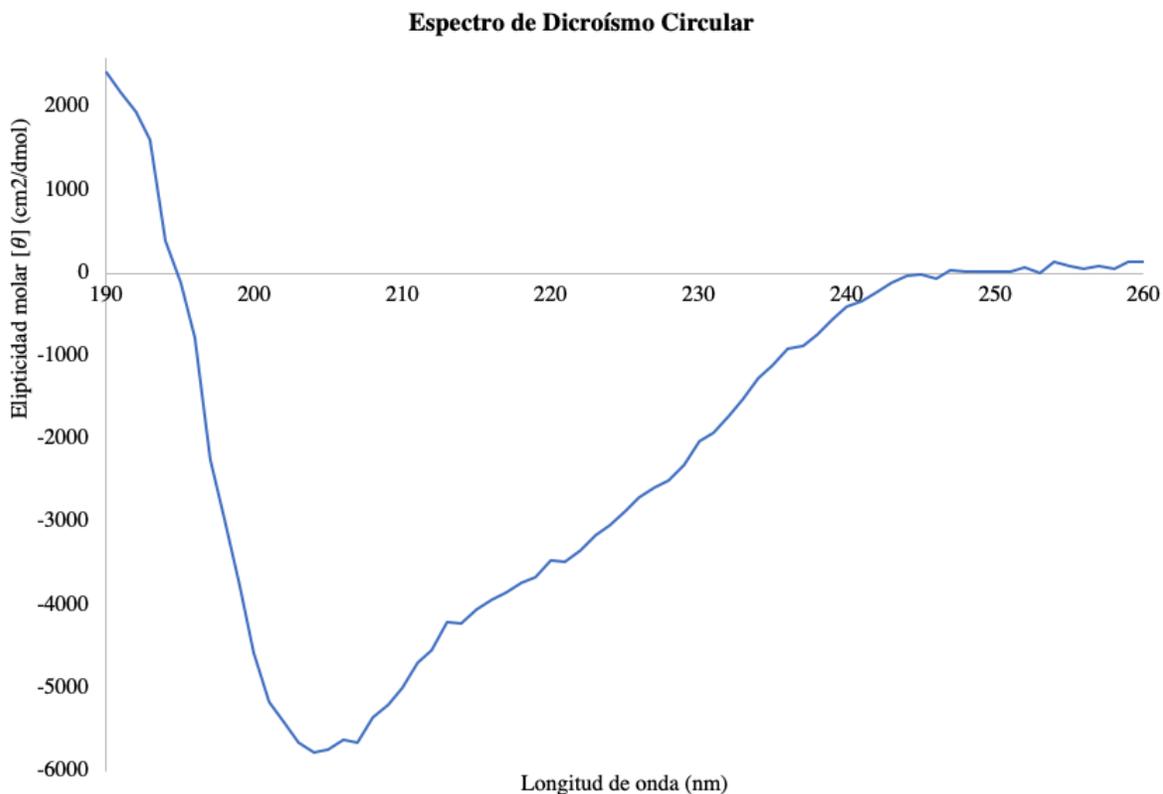


Figura XVII. Espectro de dicroísmo circular de la neurotoxina β -KTx 14.3 a una concentración de 0.3mg/mL disuelta en agua milli Q.

El espectro de dicroísmo muestra la contribución de una proteína desestructurada en donde frecuentemente se observa un mínimo intenso a 200 nm y puede haber algunos máximos o mínimos débiles por encima de 210 nm debido a las partes de la proteína plegadas al azar.

Dado que el espectro de DC representa la suma de las contribuciones de estructura secundaria presente en una proteína, se han desarrollado varios métodos para el análisis del contenido de estructura secundaria en una proteína a partir de su espectro de DC. Dado lo anterior, se utilizó el método SELCON3 en el servidor en línea Dichroweb^{40,41}.

Result	Helix1	Helix2	Strand1	Strand2	Turns	Unordered	Total
Guess	0.000	0.018	0.248	0.119	0.298	0.316	0.999
SVD	0.047	0.053	0.039	0.029	0.086	0.129	0.383
Convergent	0.044	0.099	0.261	0.133	0.167	0.234	0.938
Stage2	0.044	0.099	0.261	0.133	0.167	0.234	0.937
final	0.044	0.099	0.261	0.133	0.167	0.234	0.937

Tabla 2. Fracción de estructura secundaria a partir de los datos experimentales de dicroísmo circular de la neurotoxina β -KTx 14.3, obtenidos del servidor en línea Dichroweb.

En la tabla 2, se muestra que la toxina recombinante contiene 4.4% de hélice α regular, 9.9% de hélice α distorsionada (señal de dicroísmo diferente a hélice α regular), 26.1% de hoja β regular, 13.3% de hoja β distorsionada (señal de dicroísmo diferente a hoja β regular), 16.7% de giros, y 23.4% de estructura desordenada.

6.7 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

El espectro de ^1H de la neurotoxina β -KTx 14.3 muestra una amplia dispersión de señales entre 5-9 ppm correspondientes a los protones de amida de la cadena principal que se encuentran en ambientes químicos diferentes; así como la dispersión característica alrededor de 0.9 ppm correspondiente a la protección de los metilos de las cadenas laterales (figura XVIII). Esto confirma que la toxina recombinante presenta un plegamiento definido. De la misma forma se puede observar una señal correspondiente a un protón aromático del triptófano (>10 ppm) lo cual concuerda con el único triptófano presente en la secuencia de aminoácidos.

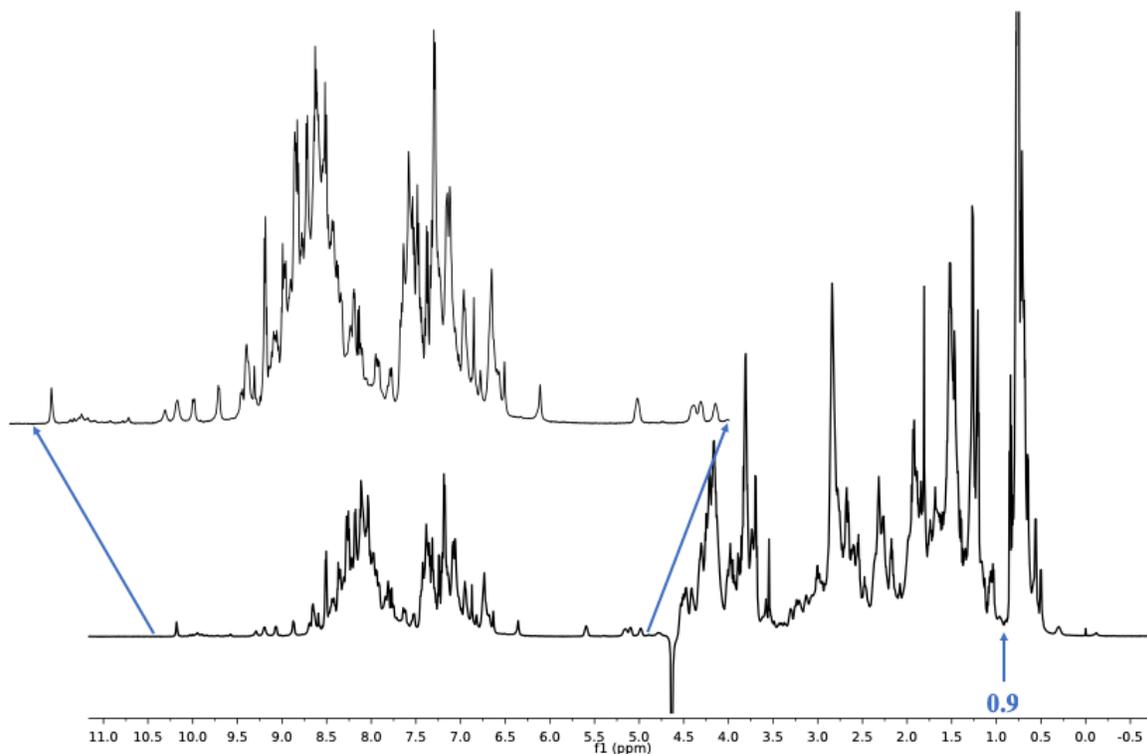


Figura XVIII. Espectro de ^1H de la neurotoxina $\beta\text{-KTx 14.3}$, obtenido a 25°C en un equipo Bruker AVANCE III de 700 MHz donde se encuentra ampliada la región de 5-9 ppm correspondiente a los protones de amida.

Aunque el espectro unidimensional de RMN de ^1H nos proporciona información del plegamiento de la toxina, es incapaz de brindarnos información acerca de la estructura tridimensional que presenta la misma, por lo que es necesario realizar experimentos bidimensionales como COSY, TOCSY y NOESY.

Se realizó la asignación de 1591 señales nOe correspondientes a 46 de 48 sistemas de espín traslapando el experimento TOCSY y el experimento NOESY de 300ms. Por ejemplo, para encontrar el primer sistema de espín el primer paso consiste localizar una señal TOCSY dispersa la zona de los protones del carbono α (H_α Cys 42, figura XIX) e identificar el sistema de espín al que corresponde la señal TOCSY seleccionada. Un sistema de espín es un patrón característico para cada aminoácido, ver *Anexo Patrones TOCSY*, por lo que con ayuda de la estructura primaria de la proteína es posible determinar de qué aminoácido se trata. Una vez identificado el sistema de espín se procede a realizar la asignación secuencial; ésta consiste en buscar señales NOE en el mismo desplazamiento químico de las señales TOCSY de la cadena lateral para el aminoácido i , una vez encontradas las señales que se reflejan estaremos en el desplazamiento químico del NH para el aminoácido $i+1$ (NH Val 43), desplazamiento en el cual debemos encontrar una señal TOCSY y asignar un sistema de espín para $i+1$. Finalmente, las señales NOE restantes corresponden a la interacción de núcleos alejados en la secuencia; pero espacialmente próximos entre ellos, lo que impone restricciones de distancia necesarias para el cálculo de la estructura tridimensional de la proteína (figura XIX).

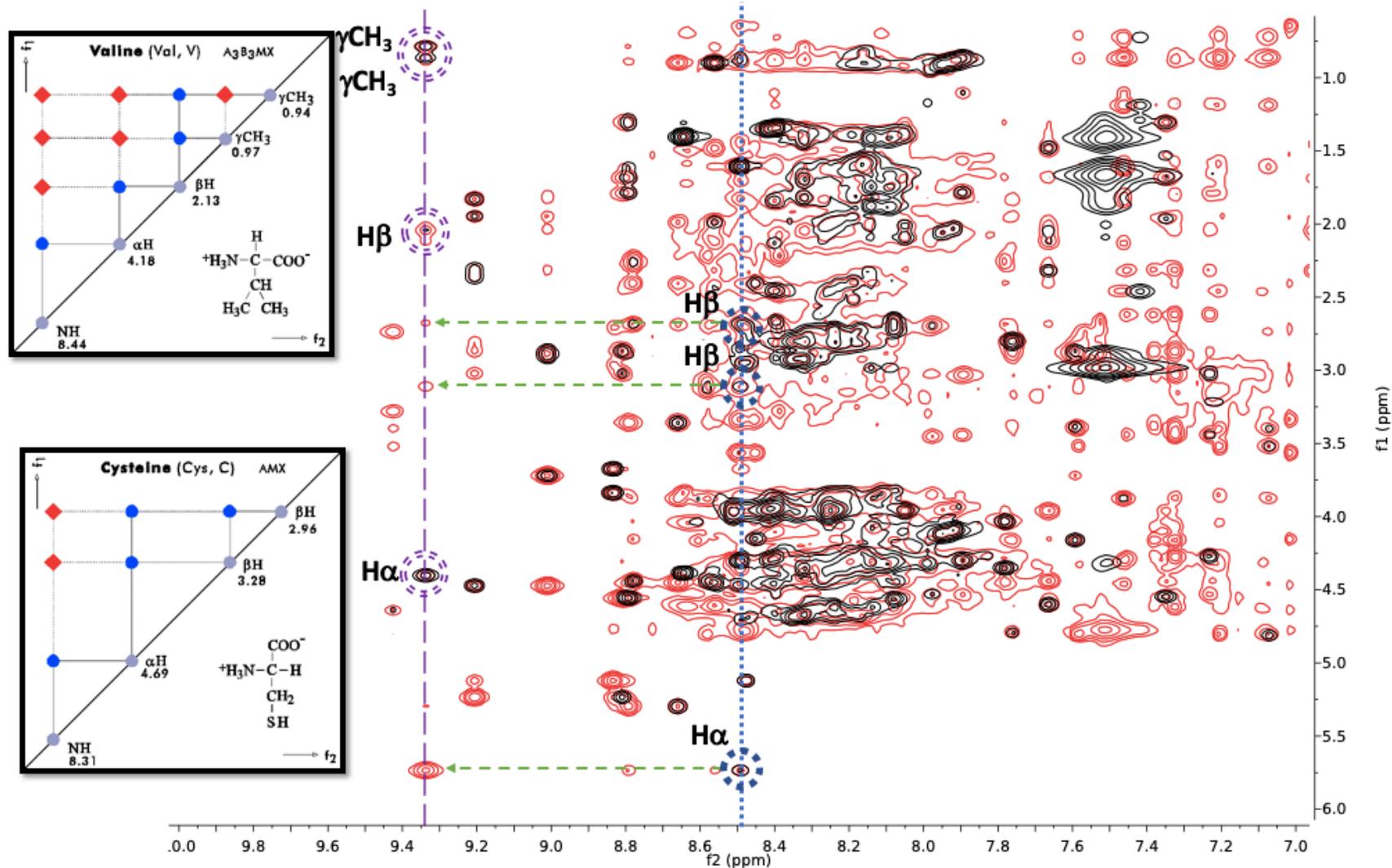


Figura XIX. Interpretación de los experimentos TOCSY (contornos en negro) y NOESY (contornos en rojo). Asignación secuencial entre C42 y V43.

Con ayuda del espectro ^1H - ^1H NOESY es posible determinar la conectividad de las cisteínas que se encuentran formando un enlace disulfuro, ya que se observa una correlación entre los protones beta (H_β) de las cisteínas que se encuentran formando dicho enlace. Con ello se pudo determinar la conectividad (C_1 - C_4), (C_2 - C_5) y (C_3 - C_6). A manera de ejemplo, en la figura XX, se muestra las señales que dan lugar a la formación del enlace disulfuro entre la cisteína 26 (C_3) y la cisteína 42 (C_6).

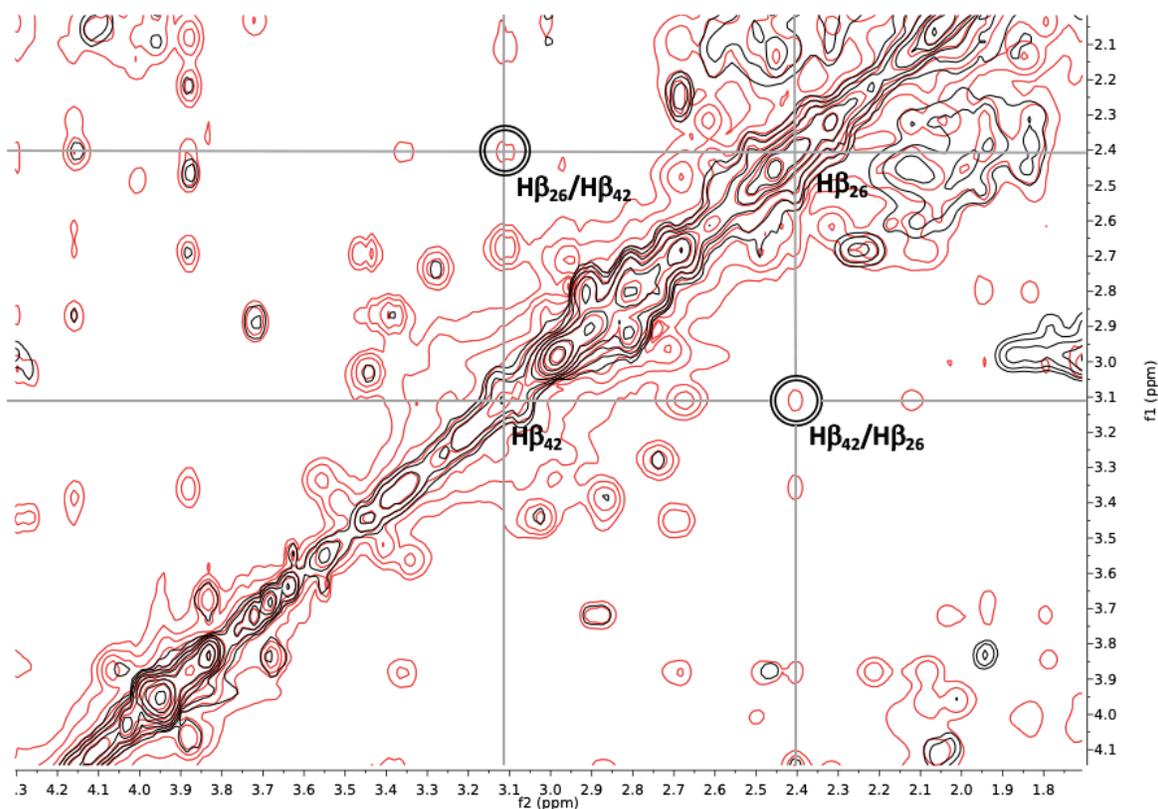


Figura XX. Interacción de los protones beta de las cisteínas 26 y 42, formación del enlace C_3 - C_6 . Experimento TOCSY (contornos en negro), experimento NOESY (contornos en rojo).

Una vez asignados la mayoría de los sistemas de espín de la proteína y empleando las señales en el experimento NOESY de 150 ms, la estructura tridimensional se calculó utilizando el programa CYANA. Se calcularon 400 estructuras, de las cuales son elegidas las 20 estructuras que mejor satisfacen las restricciones experimentales. En la figura XXI, se muestran las restricciones angulares y de distancia a corto, mediano y largo alcance obtenidas por el programa CYANA utilizadas para la obtención de la estructura tridimensional.

Dichas restricciones se obtienen en el gráfico de Ramachandran, donde se muestra la distribución de los ángulos diedros ψ y ϕ de la proteína en los 20 modelos estructurales calculados por CYANA (figura XXI). Se obtuvo un 57.6% de los ángulos diedros en regiones muy favorecidas, 42.1% en regiones adicionalmente permitidas, 0.2% en regiones generosamente permitidas y 0.0% en regiones no permitidas. Las estructuras se obtuvieron con un RMSD de 1.54Å del aminoácido 2 al 47.

Restricciones de distancia	Neurotoxina β -KTx 14.3
Total	579
Corta distancia $ i-j < 1$	384
Mediana distancia $1 < i-j < 5$	157
Larga distancia $ i-j \geq 5$	38
RMSD	1.54

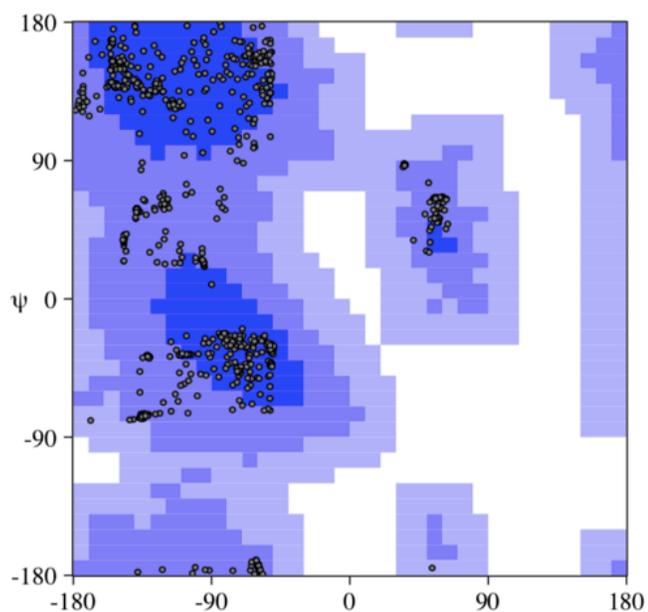


Figura XXI. Gráfico de Ramachandran para las 20 estructuras calculadas por CYANA. Las zonas en azul marino son favorecidas, las zonas en morado son adicionalmente permitidas, las zonas en morado claro son generosamente permitidas y las zonas en blanco son no permitidas.

La estructura obtenida exhibe el motivo estructural CS- α/β formada por una hélice α (Cys22-Lys29) unida a una hoja β antiparalela formada por dos hebras (Gly33-Glu36) y (Asp39-Cys42), estabilizada por 3 enlaces disulfuro (figura XXII).

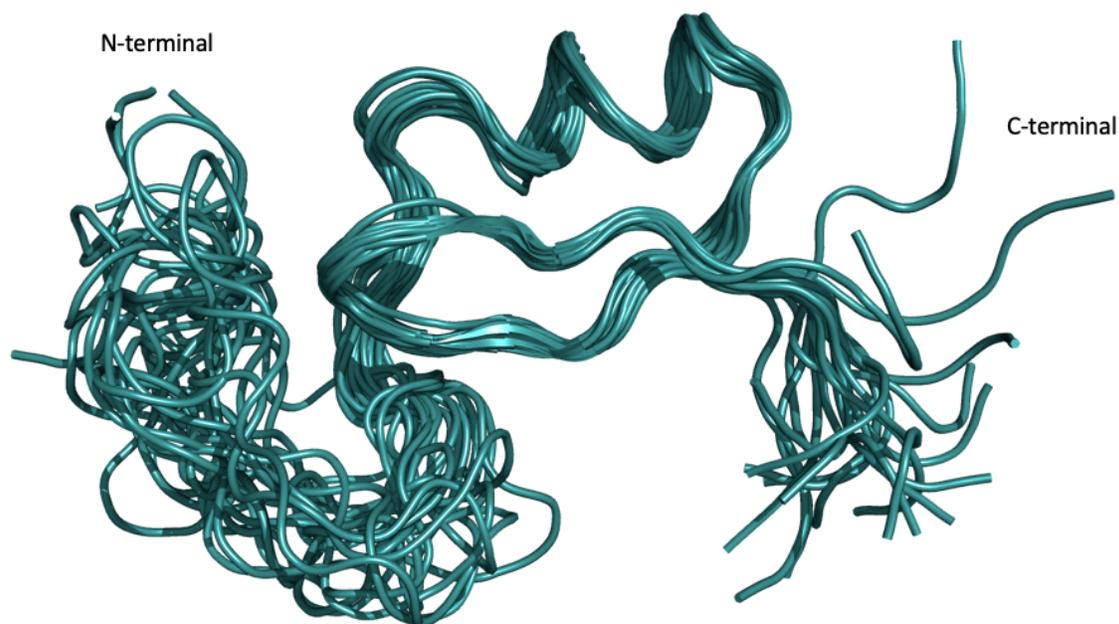


Figura XXII. Alineamiento de las 20 estructuras obtenidas mediante el programa CYANA para la neurotoxina β -KTx 14.3.

Es importante señalar todas las interacciones que dan pie a la formación de los elementos de estructura secundaria presentes en la toxina. En la figura XXIII, se esquematizan todas las interacciones observadas para la formación de hélice α , HN-HN($i, i+2$) en **amarillo**, H_{α} -HN($i, i+2$) en **rojo**, H_{α} -HN($i, i+3$) en **rosa**, H_{α} - H_{β} ($i, i+3$) en **anaranjado** y H_{α} -HN($i, i+4$) en **azul**; así como los puentes de hidrógeno que estabilizan la formación de hebras β dentro de la proteína en **verde**. Es posible observar que la hélice α que se forma corresponde a una hélice 3.6₁₃, en decir, existen 3.6 residuos por vuelta y 13 átomos involucrados.

Por último, se realizó el afinamiento por dinámica molecular para el conjunto de estructuras calculadas por CYANA. Mediante el programa AMBER 16, se simula un calentamiento a todo el sistema (10000 K), tal que, la proteína adquiera la suficiente energía para explorar una amplia gama de configuraciones. A medida que el sistema se enfría los cambios estructurales avanzan hacia el mínimo de energía global. De esta manera el programa utiliza las restricciones de distancia del espectro NOESY de 150 ms y nos permite obtener una estructura más realista que toma en consideración las interacciones con el disolvente (agua).

La estructura de mínima energía obtenida mediante el programa AMBER 16 se muestra en la figura XXIV, con lo cual se confirma la presencia del motivo estructural característico CS- α/β .

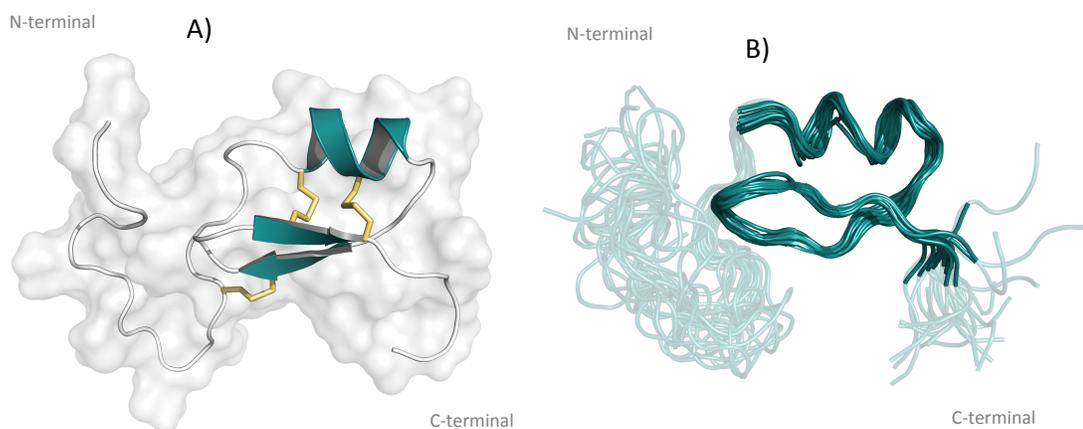


Figura XXIV. Estructura terciaria de la neurotoxina En A) se muestra la estructura terciaria de la neurotoxina β -KTx14.3 donde también es posible observar en la superficie de potencial electrostático de la toxina, en B) se muestra el alineamiento de las 20 estructuras de menor energía haciendo énfasis en el motivo estructural.

Aunque el RMSD global de la toxina es 1.54 Å, el motivo CS- α/β se encuentra en un valor más adecuado con un RMSD de 0.23 Å.

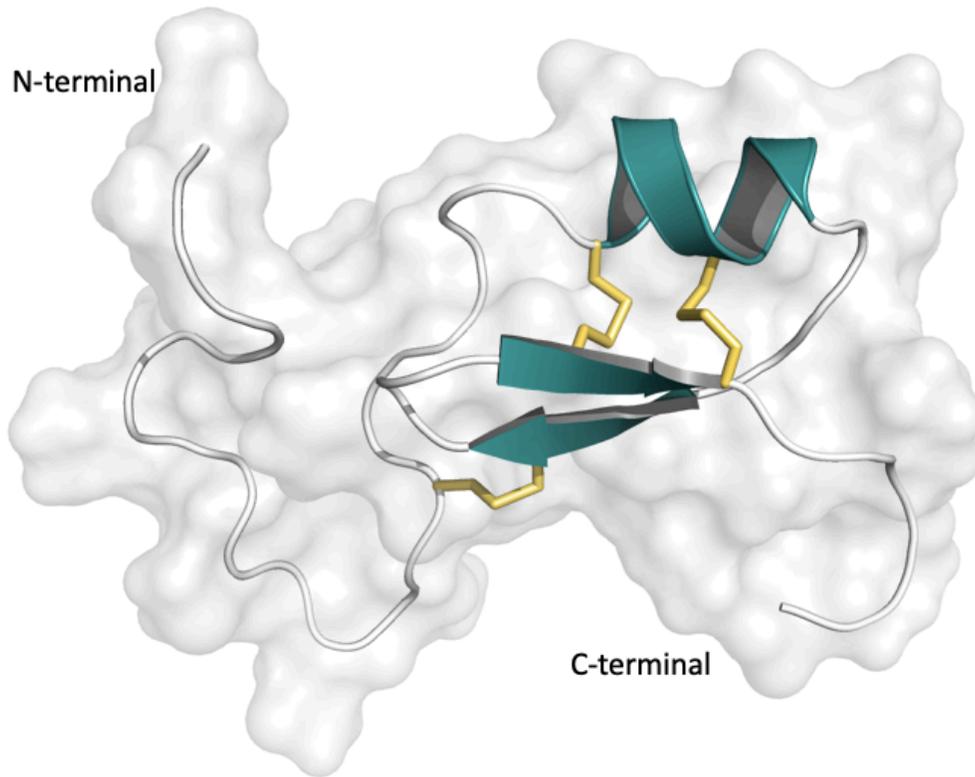


Figura XXV. Estructura tridimensional de la neurotoxina β -KTx 14.3, en amarillo se observan los enlaces disulfuro. La toxina exhibe el motivo estructural característico.

En la figura XXV, se muestra la estructura tridimensional de la neurotoxina β -KTx 14.3 recombinante con lo cual se confirma los diferentes elementos de estructura secundaria presentes. Es posible observar la conectividad de enlaces disulfuro determinada mediante el análisis de los espectros bidimensionales de RMN. La proteína presenta un segmento N-terminal desestructurado, el cual se cree confiere actividad citolítica a la toxina, así como un segmento C-terminal con el motivo característico CS- α/β responsable de la capacidad de bloqueo del canal de potasio (K^+).

Pruebas de actividad en canales iónicos dependientes de voltaje

La capacidad bloqueadora de la toxina se evaluó en células HEK 293T para la expresión de un solo tipo de canal de K^+ dependiente de voltaje (*Shaker/Kv1.2* y *KCNQ1/Kv7.1*). El estudio electrofisiológico de la neurotoxina β -KTx 14.3 redujo la corriente en un 9% a través del canal *Shaker/Kv1.2* y 48% a través de *Kv7.1* a una concentración de $22\mu\text{M}$ (figura XXVI).

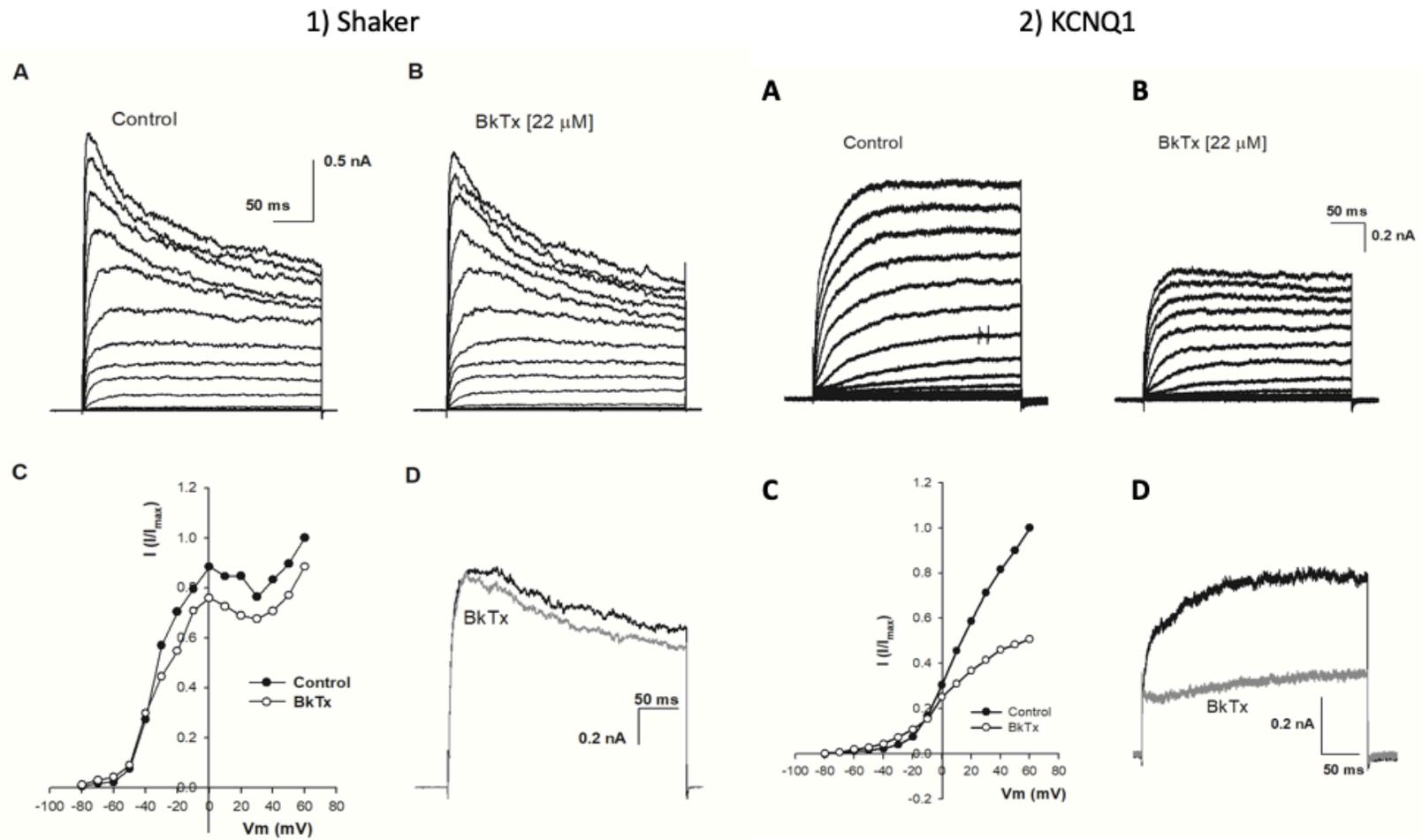


Figura XXVI. Efecto de la neurotoxina β -KTx 14.3 en 1) *Shaker/Kv1.2* y en 2) *KCNQ1/Kv7.1*. En A son corrientes voltaje contra corriente Control, B en presencia de la toxina [22 μ M], en C son los puntos graficados de A y B. En D, es un trazo control a 20 mV (negro) y en presencia de la toxina (gris).

Se observó el bloqueo selectivo al canal *Shaker/Kv1.2* de la neurotoxina β -KTx 14.3 con una capacidad de bloqueo de la corriente eléctrica de 9%. Aunque el bloqueo del canal *Shaker/Kv1.2* no es eficiente, corresponde con lo hasta ahora reportado⁴².

Estudios previos indican que este tipo de toxinas presentan un bloqueo selectivo a canales de potasio (Kv1.x) con bajas afinidades⁴. La toxina α -KTx 8.6 (MeuTXK α 1), perteneciente a la familia α -KTx, es una excepción a la regla⁴, la cual es un inhibidor altamente selectivo (μ M) a canales de potasio (K⁺) que también es selectivo al canal KCNQ1. Debido a la similitud de actividades se decidió probar la neurotoxina β -KTx 14.3 en este canal, aunque solo presentan un 17.6% de identidad.

	S5	Región del Poro	S6		
P51787	KCNQ1_HUMAN	280	VYLAEKDAVNESGRVEFGSYADALWWGVVTVTTIGYGD	KVPQTWVGK	325
P16389	KCNA1.2_HUMAN	346	VYFAEAEDE-----RESQFPSIPDAFWWAVVSM	TVGYGDMVPTTIGGK	388

Figura XXVII. Alieamiento de secuencias de canales KCNQ1 y Kv1.2.

En la figura XXVII, se muestra que el canal KCNQ1 tiene una Lys318 justo después del motivo “GYGD” conservado⁴⁷ en la región de poro. Dado que esta diferencia se encuentra en la región del filtro de selectividad del canal, la presencia de un aminoácido con carga positiva podría ser responsable del aumento de la capacidad bloqueadora de la toxina observado experimentalmente en el canal KCNQ1.

La neurotoxina β -KTx14.3 presenta un punto isoelectrónico (pI) igual a 5.13, calculado por el servidor ExPASy ProtParam. Si la interacción ocurre a un pH fisiológico (7.4), los grupos ionizables de la toxina cargados negativamente podrían interactuar con la Lys318 en la región del poro, explicando así los resultados obtenidos. La vía de reconocimiento del canal probablemente implique la interacción de residuos básicos (Lys) bloqueando el poro del canal; mientras que los residuos ácidos (Asp y Glu), podrían interactuar con la Lys318 cerca del filtro de selectividad⁴.

Se requieren mayores estudios para poder definir mejor la forma de interacción de esta toxina con el canal.

7 CONCLUSIONES

Se obtuvo la neurotoxina β -KTx 14.3 recombinante a partir de un sistema heterólogo.

Fue posible determinar la primera estructura tridimensional de un péptido completo de la clase 2, de la subfamilia β -KTx a pesar del gran traslape encontrado en los espectros de RMN bidimensionales. Con lo anterior se inicia un mayor entendimiento de la relación que existe entre la función y estructura de estas toxinas.

La proteína presenta un segmento N-terminal desestructurado (Ile1-Trp21), así como un segmento C-terminal conformado por una hélice α (Cys22-Lys29) y una hoja β antiparalela formada por dos hebras (Gly33-Glu36) y (Asp39-Cys42), estabilizada por mediante tres enlaces disulfuro.

La conectividad de los enlaces disulfuro (**C₁-C₄**), (**C₂-C₅**) y (**C₃-C₆**) se determinó con la interpretación de los espectros de RMN. Lo cual corresponde a la conectividad de la subfamilia β -KTx a la cual pertenece.

Se observó el bloqueo selectivo al canal *Shaker*/Kv1.2 y KCNQ1/Kv7.1 con una capacidad de bloqueo de la corriente eléctrica de 9% y 48%, respectivamente, a una concentración de 22 μ M.

8 REFERENCIAS

1. Tamargo, M. J. (2004). Los poros y los canales iónicos regulan la actividad celular. *An. R. Acad. Nac. Farm.*, 2004, 70: 9-31.
2. Kuzmenkov, A. I., Krylov, N. A., Chugunov, A. O., Grishin, E. V., & Vassilevski, A. A. (2016). Kalium: a database of potassium channel toxins from scorpion venom. *Database*, 2016, baw056. doi:10.1093/database/baw056.
3. Solis, H., López-Hernandez, E., Cortés-Gasca, D. (2008). La excitabilidad neuronal y los canales de potasio. Artículo de revisión. *Arch Neurocién (Mex)* Vol. 13, No. 3: 195-201.
4. Chen Z-Y, Zeng D-Y, Hu Y-T, He Y-W, Pan N, et al. (2012). Structural and Functional Diversity of Acidic Scorpion Potassium Channel Toxins. *PLoS ONE* 7(4): e35154. doi: 10.1371/journal.pone.0035154.
5. González, C., Baez-Nieto, D., Valencia, I. et al. (2012). K(+) channels: functional-structural overview. *Compr. Physiol.*, 2, 2087–2149
6. Shien CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M. (2000). Potassium Channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev*; 52:557-93.
7. Hille B. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. 2a ed. USA, Sinauer Associates INC, 1992.
8. Doyle, D. A. (1998). The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K⁺ Conduction and Selectivity. *Science*, 280(5360), 69–77.
9. Quintero-Hernández, V., Jiménez-Vargas, J. M., Gurrola, G. B., Valdivia, H. H., & Possani, L. D. (2013). Scorpion venom components that affect ion-channels function. *Toxicon*, 76, 328–342.
10. Wilson R. Lourenço. (2018). The evolution and distribution of noxious species of scorpions (Arachnida: Scorpiones). *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 24:1, 12. 2018, De BioMed Central Base de datos.
11. Ding, J., Chua, P.-J., Bay, B.-H., & Gopalakrishnakone, P. (2014). Scorpion venoms as a potential source of novel cancer therapeutic compounds. *Experimental Biology and Medicine*, 239(4), 387–393.

12. Al-Asmari, A.K., Kunnathodi, F., Al Saadon, K., M Idris, M. (2016). Elemental analysis of scorpion venoms. *Journal of Venom Research Open Access*, 7: 16-20.
13. Tytgat, J., Chandy, K. G., Garcia, M. L., Gutman, G. A., Martin-Eauclaire, M.-F., van der Walt, J. J., & Possani, L. D. (1999). A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: α -KTx molecular subfamilies. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20(11), 444–447.
14. Gamboa R. A., & Trujillo-Roldán, M. A. (2009, septiembre 5). Un acercamiento a la producción de proteínas recombinantes terapéuticas de uso humano. *El Residente*, Vol. IV Número 3-2009, 87-91. 2018, De Medigraphic Base de datos.
15. García, J., Santana, Z., Zumalacárregui, L., Quintana, M., González, D., Furrázola, G. & Cruz, O. . (2013). Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Vaccimonitor*, 22, 30-39. 2018, De Finlay Ediciones Base de datos.
16. Wingfield, P. T. (2015). Overview of the Purification of Recombinant Proteins. *Current Protocols in Protein Science*, 6.1.1–6.1.35. doi:10.1002/0471140864.ps0601s80
17. Harrison, S. T. . (1991). Bacterial cell disruption: A key unit operation in the recovery of intracellular products. *Biotechnology Advances*, 9(2), 217–240. doi:10.1016/0734-9750(91)90005-g.
18. Girard, C., & Lesage, F. (2004). Canaux K2 Pneuronaux : aspects moléculaires et fonctionnels. *Médecine/sciences*, 20(5), 544–549. doi:10.1051/medsci/2004205544
19. Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2000). *Lehninger principles of biochemistry*. New York: Worth Publishers.
20. McKee, T., & McKee, J. R. (2012). *Biochemistry: The molecular basis of life*. Oxford: Oxford University Press.
21. Murray, R. K. (2003). *Harper's illustrated biochemistry*. New York: McGraw-Hill.
22. Shehadul Islam, M., Aryasomayajula, A., & Selvaganapathy, P. (2017). A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. *Micromachines*, 8(3), 83. doi:10.3390/mi8030083

23. De Collongue-Poyet, B., Vidal-Madjar, C., Sebille, B., & Unger, K. K. (1995). Study of conformational effects of recombinant interferon γ adsorbed on a non-porous reversed-phase silica support. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 664(1), 155–161. doi:10.1016/0378-4347(94)00401p.
24. Zhu, S., Gao, B., Aumelas, A., del Carmen Rodríguez, M., Lanz-Mendoza, H., Peigneur, S., Possani, L. D. (2010). MeuTXK β 1, a scorpion venom-derived two-domain potassium channel toxin-like peptide with cytolytic activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804(4), 872–883.
25. Mayolo-Deloisa, K., Martínez, L.M., Rito-Palomares, M. (2012). Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y replegamiento de proteínas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química [en línea]*: [Fecha de consulta: 20 de diciembre de 2018] Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62026894006>> ISSN 1665-2738.
26. Counterman, A. E., Thompson, M. S., & Clemmer, D. E. (2003). Identifying a Protein by MALDI-TOF Mass Spectrometry: An Experiment for the Undergraduate Laboratory. *Journal of Chemical Education*, 80(2), 177. doi:10.1021/ed080p177
27. Greenfield, N. J. (2007). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*, 1(6), 2876–2890. doi:10.1038/nprot.2006.202
28. Kelly, S. M., & Price, N. C. (1997). The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1338(2), 161–185. doi:10.1016/s0167-4838(96)00190-2.
29. Cavanagh J, Fairbrother WJ, Palmer AG III and Skelton NJ (1996) *Protein NMR Spectroscopy, Principles and Practice*. New York:Academic Press.
30. Departamento de Química Física. (2012). RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR. 16 de enero de 2019, de Universidad de Valencia. Sitio web: https://www.uv.es/tunon/QFIII/tema_1.pdf
31. Keeler, J., *Understanding NMR Spectroscopy*. 2002

32. Rehm, T., Huber, R., Holak, T. A. (2002). Application of NMR in Structural Proteomics: Screening for Proteins Amenable to Structural Analysis. *Structure*, Vol. 10, 1613–1618.
33. Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G., Zhu, G., Pfeifer, J., & Bax, A. (1995). *NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. Journal of Biomolecular NMR*, 6(3). doi:10.1007/bf00197809
34. Güntert, P. (2014). Automated NMR Structure Calculation With CYANA. *Protein NMR Techniques*, 353–378. doi:10.1385/1-59259-809-9:353
35. Bartels, C., Xia, T., Billeter, M., Güntert, P., & Wüthrich, K. (1995). *The program XEASY for computer-supported NMR spectral analysis of biological macromolecules. Journal of Biomolecular NMR*, 6(1), 1–10. doi:10.1007/bf00417486.
36. Wüthrich, K., *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley and Sons, New York, 1986.
37. Würz, J. M., Kazemi, S., Schmidt, E., Bagaria, A., & Güntert, P. (2017). *NMR-based automated protein structure determination. Archives of Biochemistry and Biophysics*, 628, 24–32. doi: 10.1016/j.abb.2017.02.011
38. D.A. Case, R.M. Betz, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, T.A. Darden, R.E. Duke, T.J. Giese, H. Gohlke, A.W. Goetz, N. Homeyer, S. Izadi, P. Janowski, J. Kaus, A. Kovalenko, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, D. Mermelstein, K.M. Merz, G. Monard, H. Nguyen, H.T. Nguyen, I. Omelyan, A. Onufriev, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, C.L. Simmerling, W.M. Botello-Smith, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, R.M. Wolf, X. Wu, L. Xiao and P.A. Kollman (2016), *AMBER 2016*, University of California, San Francisco.
39. Milagros Medina. (2007). Canales Iónicos. 01 de febrero de 2018, de Universidad de Zaragoza Sitio web: http://www.unizar.es/departamentos/bioquimica_biolgia/docencia/ELFISICAB IOL/Canales/CanIonFB.htm
40. Whitmore, L. and Wallace, B.A. (2004) DICHROWEB: an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Research* 32:W668-673. doi: 10.1093/nar/gkh371.
41. <http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>

42. Ruiming, Z., Yibao, M., Yawen, H., Zhiyong, D., Yingliang, W., Zhijian, C., & Wenxin, L. (2010). *Comparative venom gland transcriptome analysis of the scorpion *Lychas mucronatus* reveals intraspecific toxic gene diversity and new venomous components*. *BMC Genomics*, *11*(1), 452. doi:10.1186/1471-2164-11-452.
43. Huber, R., D. Kukla, W. Bode, P. Schwager et al. (1974) Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor. Crystallographic refinement at 1.9Å resolution. *J. Mol. Biol.* 89:73-101.
44. Bergeron, Z., & Bingham, J.-P. (2012). Scorpion Toxins Specific for Potassium (K⁺) Channels: A Historical Overview of Peptide Bioengineering. *Toxins*, *4*(11), 1082–1119.
45. Zhu, S., Peigneur, S., Gao, B., Luo, L., Jin, D., Zhao, Y., & Tytgat, J. (2011). Molecular Diversity and Functional Evolution of Scorpion Potassium Channel Toxins. *Mol. Cell. Proteomics* 10(2):M110.002832. doi:10.1074/mcp.m110.002832.
46. Hwang, T. L., & Shaka, A. J. (1995). Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients. *Journal of Magnetic Resonance, Series A*, *112*(2), 275–279. doi:10.1006/jmra.1995.1047
47. Jespersen, T., Grunnet, M., & Olesen, S.-P. (2005). The KCNQ1 Potassium Channel: From Gene to Physiological Function. *Physiology*, *20*(6), 408–416. doi:10.1152/physiol.00031.2005.
48. Shen, B., Cao, Z., Li, W., Sabatier, J.-M., & Wu, Y. (2017). Treating autoimmune disorders with venom-derived peptides. *Expert Opinion on Biological Therapy*, *17*(9), 1065–1075. doi:10.1080/14712598.2017.1346606.
49. Srinivasan, K. N., Sivaraja, V., Huys, I., Sasaki, T., Cheng, B., Kumar, T. K. S., ... Gopalakrishnakone, P. (2002). κ -Hefutoxin1, a Novel Toxin from the Scorpion *Heterometrus fulvipes* with Unique Structure and Function. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(33), 30040–30047. doi:10.1074/jbc.m111258200.
50. Diego-García, E., Schwartz, E. F., D'Suze, G., González, S. A. R., Batista, C. V. F., García, B. I., ... Possani, L. D. (2007). Wide phylogenetic distribution of Scorpine and long-chain β -KTx-like peptides in scorpion venoms: Identification

of “orphan” components. *Peptides*, 28(1), 31–37.
doi:10.1016/j.peptides.2006.06.012.

Espectros Bidimensionales

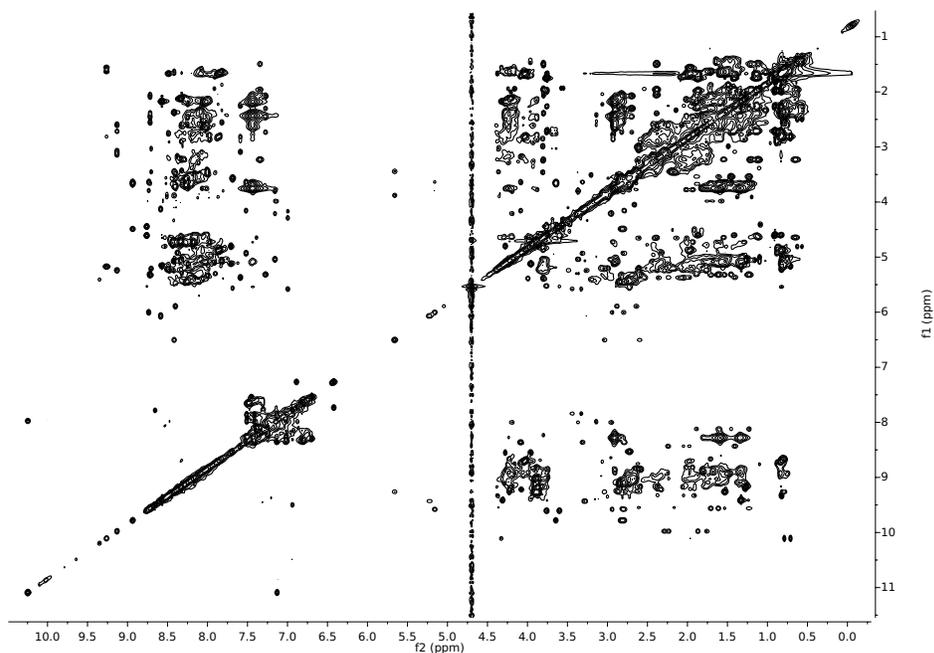


Figura XXVIII. Espectro de RMN TOCSY de 80ms, de la neurotoxina β -KTx 14.3 obtenido a 25° C en un equipo Bruker AVANCE III de 700MHz disuelta en una mezcla de $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 95/5%.

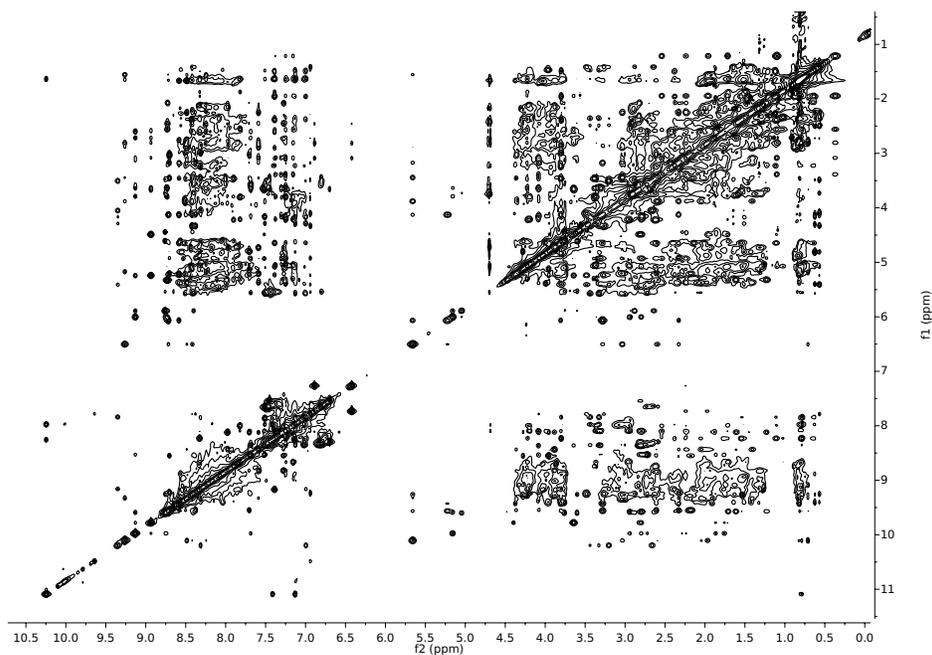


Figura XXIX. Espectro de RMN NOESY de 300ms, de la neurotoxina β -KTx 14.3 obtenido a 25° C en un equipo Bruker AVANCE III de 700MHz disuelta en una mezcla de $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 95/5%.

Disoluciones

Medio LB (Luria Bertani)
Tripsina 10 g/L
Extracto de Levadura 5g/L
Cloruro de Sodio 10g/L

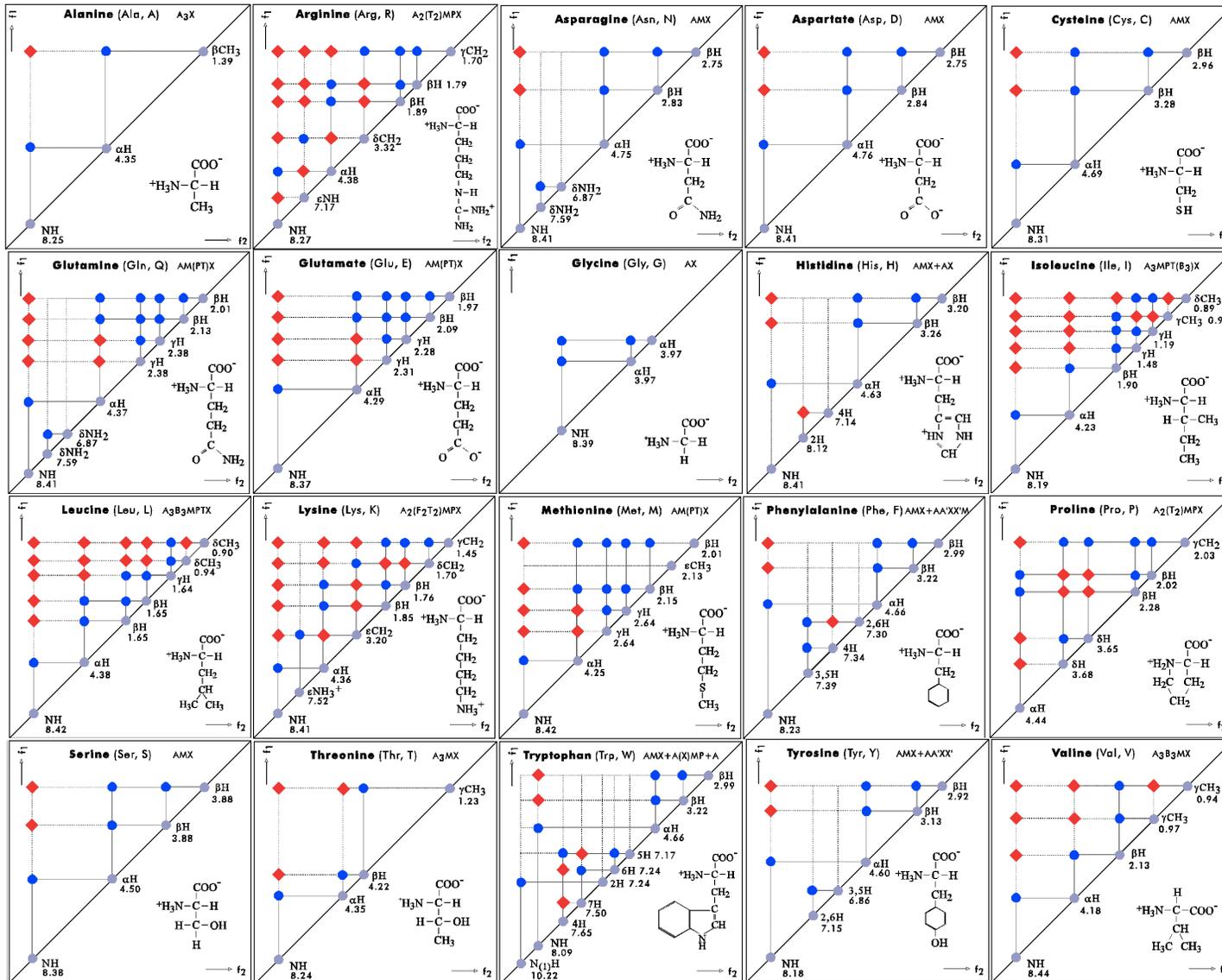
Medio LB Sólido
Tripsina 10 g/L
Extracto de Levadura 5g/L
Cloruro de Sodio 10g/L
Agar 10g/L

Solución Amortiguadora de Lisis
Tris 50 mM
NaCl 300 mM
Imidazol 20 mM
pH= 8

Solución Amortiguadora de Elución
Tris 50 mM
NaCl 300 mM
Imidazol (25, 50, 75, 100, 300 y 500) mM
pH= 8

Solución Amortiguadora de Corte
Tris 50 mM
1mM CaCl ₂
pH= 8

Patrones TOCSY



Familia β -KTx

Clase 1

```

P69939|KBX1_ANDAU 1 ---MQRNLVLLFLGMVALSSCGLREKHVQKLVKYAVPVGTLRTILQTVVHKVGTQFGCPAYQGYCDDHCQDIKKEEGFCHGFKCKCGIPMGF--- 91
B8XH40|KBX1_BUTOS 1 ---MQRNLVLLLLGMVALSSCGLREKHVQKLVKYAVPESTLRTILQTVVHKVGTQFGCPAYQGYCDDHCQDIKKEEGFCHGMCKCKCGIPMGF--- 91
Q9N661|KBX1_MESMA 1 ---MQRNLVLLFLGMVALSSCGLREKHVQKLVKYAVPEGLRTIIQTVVHKVGTQFGCPAYQGYCDDHCQDIKKEEGFCHGFKCKCGIPMGF--- 91
Q5G8A6|KBX1_TITCO 1 ---MERKLALLLFLGMVTLASCGLREKHVQKLVVAL-IPNDQLRSILKAVVHKVAKTQFGCPAYEGYCNHCQDIERKDGECHGFKCKCAKD----- 87
Q0GY44|KBX1_TITDI 1 ---MERKLALLLLGMITLASSGLREKHVQKLVTL-IPNDTLRSIMKTIIVHKLAKTQFGCPAYEGYCNHCQDIERHDGSCHGFKCKCEKS----- 87
P69940|KBX1_TITSE 1 ---MERKLALLLLGMVTLASCGLREKHVQKLVVAL-IPNDQLRSILKAVVHKVAKTQFGCPAYEGYCNHCQDIERKDGECHGFKCKCAKD----- 87
P0C2F3|KBX1_TITST 1 -----KLVVAL-IPNDQLRSILKAVVHKVAKTQFGCPAYEGYCNHCQDIERKDGECHGFKCKCAKD----- 60
Q0GY46|KBX1_TITTR 1 ---MERKALLLFLGMVTLVSCGLREKHVQKLVVAL-IPNDTVRSILKAVVHKAATQFGCPAYEGYCNHCQDIKRKDGECHGFKCKCAKD----- 87
P0CI49|KBX11_LYCMC 1 MQAKRTILLLLLLGMVALSSCGLREKHVQGLVKNKFPAGIVKNLLQAGIHVKVAKMQYGCPIIKDYCSFHCNDLEKHEGYCHGFKCKCNI PNQYELF 96
A9XE60|KBX11_MESEU 1 --MQRNLVLLFLGMVALSSCGFREKHFQRFVYAVPESTLRTVLQTVVHKVGTQFGCPAYQGYCDDHCQDIKKEEGFCHGFKCKCGIPMGF--- 91
A9XE59|KBX12_MESEU 1 --MQRNLVLLFLGMVALSSCGFREKHFQRFVYAVPESTLRTVLQTVVHKVGTQFGCSAYQGYCDDHCQDIKKEEGFCHGFKCKCGIPMGF--- 91
D9U2A7|KBX17_LYCMC 1 MQAKRTILLLLLLGMVALSSCGLREKHVQGLVKNKFPAGIVKNLLQAGIHVKVAKMQYGCPIIKDYCSFHCNDLEKHEGYCHGFKCKCNI PNQYELF 96
A0A059UI30|KBX1_MESGB 1 MQRNLVLLFLGMVALSSCGLREKHVQKLVKYAVPEGLRTIIQTVVHKVGTQFGCPAYQGYCDDHCQDIKKEEGFCHGFKCKCGIPMGF--- 91

```

Clase 2

```

Q0GY41|KBX2_HOFGE 1 ----MAKSFFAAFLIIMLISSLVLDGK--STVGQKLLKKNLQAVDKV----KEVLNKSEYMCVVSSFCQKQHCARLGKSGQCDLLEICIS----- 79
P0CH57|NDB51_MESEU 1 --MMKQQFFLFLAVIVMISSVIEAGRGREFMSNLKEKLSGVKEKMKNSWNRLTSMSEYACPVIEKWCEHDHCQAKNAIGRCENTECKCLSK--- 88
Q9NJ66|KBX2_MESMA 1 ----MMKQQFFLFLAVIVMISSVIEAGRKEIMKNIKEKLTVEVKDKMKHNSWNKLTSMSEYACPVIEKWCEHDHCAAKKAIGKCEDTECKCLKLRK- 90
Q0GY42|KBX2_TITCO 1 -----KIKSGWERLTSESEYACPAIDKFCEDHCAAKKAVGKDDDFKCNICIKL--- 47
Q0GY43|KIK2_TITDI 1 MVATNRCCVFALLVALLLIHSLAEAGKGEVLGKIKNKLVEVKEKIKAGWDKLTSEYACPVIDKFCEDHCAAKNAIGKDDDFKQCLNS--- 91
P0C8W4|KBX2_TITST 1 MVATNRCCVFALLFALLLVHSLTEAGKGEILGKIKEKIEAKDKMKAGWERLTSQSEYACPAIDKFCEDHCAAKKAVGKDDDFKCKCIKL--- 91
P86822|KBX2_TITSE 1 MVATNRCCVFALLFALLLVHSLTEAGKGEILGKIKEKIEAKDKMKAGWERLTSQSEYACPAIDKFCEDHCAAKKAVGKDDDFKCNICIKL--- 91
Q0GY45|KBX2_TITTR 1 MVATNRCCVFALLFALLLVHSLTEAGKGEVLGKIKDKLIEAKDKIKSGWERLTSQSEYACPAIEKFCEDHCAAKKAVGKDDDFKCNICIKL--- 91
P0CJ45|KBX21_LYCMC 1 ----MKQYIFFLALIVLTATFAEAGKTEILDVKVVKVFSKAKDKVLAGVEDLNNMSELGCPFIDKWCEDHCDSSKLVGKCNENFDCSCVVLGGK 89
D9U2B1|KBX22_LYCMC 1 ----MKQYIFFLALIVLVSTFAEAGKTEILDVKVVKVFSKAKDKILAGVEDLNNMSELGCPFIDKWCEDHCDSSKLVGKCNENFDCSCVVLGGK 89
P0CI42|KBX23_LYCMC 1 ----MKQYIFFLALIVLTATFAEAGKTEILDVKVVKVFSKG----IAGVADLNNMSELGCPFIEKWCEHDHCDSSKLVGKCNENFDCSCVVLGGK 85
C6ZH27|KBX27_LYCMC 1 ----MKQYIFFLALIVLVSTFAEAGKTEILDVKVVKVFSKG----IAGVADLNNMSELGCPFIEKWCEHDHCDSSKLVGKCNENFDCSCVVLGGK 85

```

Clase 3

```

Q0GY40|KBX3_HOFGE 1 MNTKLTVLCFLGIVTIVSCGWMSEKVKVQGIIDDK-----LPEGIIRNAAKAIVHKMAKNQFGCFANVDVKGDCKRHC-AEDKEGICHGTRKCKCGVPLSYL-- 95
P0C2F4|KBX3_HETLA 1 MNSKLTALIFLGLVAIASCGWINEEKIQKIDK-----IGNNILGGMMAKAVVHKLAKGEFQCVANIDTMGNCEHCQKTSGEKGFCHGTRKCKCGKPLSYRRK 95
C5J891|KBX3_OPICY 1 -----GLIHKVTQVQQLCAFNDMAGWCEKSCQAABEGKNYCHGTRKCKCGKPLSYRRK 53
P56972|KBX3_PANIM 1 MNSKLTALIFLGLIAIAYCGWINEEKIQKIDK-----MGNTVLGGMAKAVVHKMAKNEFQCMANMDMLGNCEKHCQ-TSSEKGYCHGTRKCKCGTPLSY--- 94
P86121|KBX3L_OPICY 1 -----GWINEEKIQKIDK----- 15
Q5WR03|KBX31_OPICA 1 MNNKLTALIFLGLLAIASCKWFNEKSIQNKIDK-----IGKNFLGGMAKAVVHKLAKNEFMCVANVDMTKSCDTHCQKASGEKGYCHGTRKCKCGVPLSY--- 95
P0C8W5|KBX32_HOFGE 1 --MKLTILLLVITSFCSGILREKYAHKAIQVLTIPMIGVPVSVKIVNNAKQLVHAKIKNQQLCMFNKDVAGWCEKSCQSAHQKGYCHGTRKCKCGIPLNYK-- 101
Q5WR01|KBX32_OPICA 1 MNNKLTALIFHGLLAIASCKWLNEKSIQNKIDK-----IGKNFLGGMAKAVVHKLAKNEFMCVANMDPTGSCETHCQKASGEKGYCHGTRKCKCGVPLSY--- 95
Q5WQZ7|KBX33_OPICA 1 MNNKLTALIFLGLLAIASCKWLNEKSIQNKIDK-----IGKNFLGGMAKAVVHKLAKNEFMCVANVDMTKSCDTHCQKASGEKGYCHGTRKCKCGVPLSY--- 95
Q5WQZ9|KBX34_OPICA 1 MNNKLTALIFLGLLAIASCKWLNEKSIQNKIDK-----IGKNFLGGMAKAVVHKLAKNEFMCVANIDMTKSCDTHCQKASGEKGYCHGTRKCKCGVPLSY--- 95

```

Figura XXX. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de las tres clases de la familia β -KTx. En amarillo se encuentra resaltada la secuencia de la neurotoxina β -KTx 14.3, en azul las cisteínas presentes en cada secuencia, los asteriscos en rojo indican posiciones que tienen un solo residuo totalmente conservado.