



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Biosíntesis, purificación y
determinación de la triple mutante de
la tamapina E25K/K27E/P30K

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
QUÍMICA

PRESENTA:

Emily Iran Contreras Vargas



Ciudad de México, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

PRESIDENTE: Dr. José Federico del Río Portilla
VOCAL: Dr. Rubén Luis Gaviño Ramírez
SECRETARIO: M. en C. María Elena Rodríguez Alegría
1er. SUPLENTE: Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez
2do. SUPLENTE: M. en C. Tania Rojo Portillo

Laboratorio de Química de Biomacromoléculas 1

Instituto de Química - UNAM

Asesor del tema:

Dr. José Federico del Río Portilla

Supervisor técnico:

M. en C. Carolina Monserrath Melchor Meneses

Sustentante:

Emily Iran Contreras Vargas

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Federico del Río por su paciencia y guía durante este proyecto. De igual forma agradezco a Monserrath Melchor por compartir su tiempo, conocimientos y amistad conmigo.

Agradezco al Departamento de supercómputo de la DGTIC (Proyecto **LANCAD-UNAM-DGTIC-145**) por los recursos de cómputo otorgados. De igual manera agradezco al Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear (LURMN) por la adquisición de los experimentos realizados.

Este proyecto fue posible gracias a la beca de titulación otorgada del proyecto **DGAPA-PAPIIT-IN214722**.

Resumen

Existen aproximadamente 1500 especies de alacranes diferentes. Alrededor de 25 de estas especies representan un peligro mortal para el ser humano. Esto es provocado por la composición de su veneno, el cual está constituido por diversos compuestos entre los que destacan las toxinas. Los efectos neurotóxicos que desencadenan las toxinas del veneno en los mamíferos se producen debido al bloqueo directo o modulación de los canales iónicos. El grupo de toxinas que bloquean los canales iónicos de potasio y contienen menos de 40 residuos pertenecen a la familia de las toxinas α -KTx.

La tamapina es una toxina α -KTx peptídica que proviene del veneno del alacrán rojo de la India *Mesobuthus tamulus*. En 2002 se describió por primera vez su purificación y caracterización. A través de diversos estudios se ha comprobado que la tamapina es un potente bloqueador de los canales iónicos de potasio SK2. Mediante Resonancia Magnética Nuclear se determinó su estructura tridimensional. Esta toxina posee un motivo estructural CS- α/β estabilizado por tres enlaces disulfuro.

En años recientes los canales SK2 y SK3 han cobrado relevancia ya que se ha reportado que la inhibición de los canales SK3 disminuye la migración celular. Considerando que la tamapina tiene una gran afinidad por los canales SK2 y que los canales SK2 y SK3 son similares, se propuso utilizar esta toxina para estudiar su interacción con dichos canales.

Para mejorar la interacción con los canales SK3 se han planteado una serie de mutantes. Hasta la fecha la mutante que mejoró notablemente su interacción con los canales SK3 es la doble mutante E25K/K27E.

En el presente trabajo se purificó la tamapina con las mutaciones E25K/K27E/P30K mediante diversas técnicas cromatográficas. Su estructura fue determinada mediante Resonancia Magnética Nuclear.

Índice general

Antecedentes	1
Hipótesis	3
Objetivo	3
I Marco teórico	4
1. Biosíntesis	5
1.1. Proteínas	5
1.2. Proteínas recombinantes	7
1.3. Toxinas de alacrán	9
1.3.1. Canales iónicos	11
1.3.2. Canales iónicos de potasio	11
2. Purificación	13
2.1. Métodos cromatográficos	14
2.1.1. Cromatografía de afinidad	14
2.1.2. Cromatografía de líquidos en fase reversa.	15
2.1.3. Criterios de pureza	15
2.1.3.1. Espectrometría de masas	15
2.1.3.2. Electroforesis	16
3. Determinación de la estructura tridimensional	17
3.1. Resonancia Magnética Nuclear	17
3.1.1. Espín nuclear	17
3.1.2. Desplazamiento químico	18
3.1.3. Efecto Nuclear Overhauser	18
3.2. RMN de proteínas	19
3.2.1. RMN bidimensional	20

3.2.1.1.	COSY	20
3.2.1.2.	TOCSY	20
3.2.1.3.	NOESY	20
II	Diseño experimental	22
4.	Metodología	23
4.1.	Transformación	25
4.2.	Expresión	25
4.3.	Purificación	25
4.3.1.	Lisis celular	26
4.3.2.	Cromatografía de afinidad metal-quelato (CAMQ I)	26
4.3.3.	Corte con TEV	26
4.3.4.	CAMQ II	26
4.3.5.	Cromatografía de líquidos en fase reversa	27
4.3.6.	Corte con CNBr	27
4.3.7.	Espectrometría de masas	27
4.4.	Determinación de estructura	27
4.4.1.	Determinación de la estructura tridimensional por RMN	27
III	Resultados y discusión	29
5.	Resultados	30
5.1.	Transformación y expresión	30
5.2.	Purificación	30
5.2.1.	CAMQ	30
5.2.1.1.	Corte con TEV	31
5.2.1.2.	CAMQ II	32
5.2.2.	Cromatografía de líquidos en fase reversa	33
5.2.3.	Corte con CNBr	33
5.3.	Determinación de estructura tridimensional por RMN	36
5.3.1.	Asignación de las señales	40
5.3.2.	Cálculos de estructura	41

ÍNDICE GENERAL

6. Conclusiones	47
Apéndice A. Disoluciones	49
Apéndice B. Gráfico de Ramachandran	50
Referencias	51

Índice de figuras

1.	Estructura tridimensional de la tamapina recombinante. Exhibe un motivo estructural CS- α/β estabilizado por tres puentes disulfuro (indicados de color amarillo) entre sus 6 cisteínas. Código PDB: 2LU9.	1
1.1.	Estructura general de un aminoácido- α	5
1.2.	Esquema general de la formación de un enlace peptídico. [7]	6
1.3.	Estructura tridimensional de la silatoxina. Los puentes disulfuro se muestran de color amarillo. Código PDB: 1SCY.	10
3.1.	Espectro ^1H donde se indican los desplazamientos químicos frecuentes de los diferentes protones de los aminoácidos [30].	19
4.1.	Diagrama general del proceso de producción y purificación de la proteína recombinante de la tamapina con las mutaciones E25K/K27E/P30K.	23
4.2.	Plásmido pET-32a(+) utilizado para la expresión de la proteína recombinante de la tamapina con las mutaciones E25K/K27E/P30K.	24
4.3.	Esquematación de la proteína de fusión. Se indican cuatro regiones de izquierda a derecha. La tiorredoxina, la etiqueta de 6 histidinas, la secuencia del sitio de corte con la proteasa TEV y la triple mutante con terminación GM en N-Terminal.	24
5.1.	Gel de poliacrilamida al 15 %. 1) Marcador de peso molecular. 2) Lisado. 3) Fracción no retenida. 4) Elución con amortiguador de lisis 5) Elución con 50 mM de imidazol. 6) Elución con 300 mM de imidazol. 7) Elución con 500 mM de imidazol. 8) Corte con TEV a 0 h. 9) Corte con TEV a 16 h. 10) Reflujo CAMQ II. 11) Fracción de retención CAMQ II. En el recuadro rojo se muestra la banda correspondiente a la proteína de fusión. En el recuadro azul se muestra la banda correspondiente al residuo de corte. En el recuadro negro se muestra la banda correspondiente a GM-Mutante.	31
5.2.	Esquematación de los fragmentos obtenidos después de realizar el corte con TEV durante CAMQ II. En cada fragmento se señala su respectivo peso molecular.	32
5.3.	Cromatograma obtenido mediante cromatografía de líquidos en fase reversa de GM-Mutante.	33

5.4. Espectro de masas MALDI-TOF para GM-Mutante	34
5.5. Cromatograma obtenido mediante cromatografía de líquidos en fase reversa de la proteína.	35
5.6. Espectro de masas MALDI-TOF para la tamapina E25K/K27E/P30K.	36
5.7. Espectro ^1H -RMN de la proteína recombinante E25K/K27E/P30K. Muestra liofilizada disuelta en H_2O desionizada con D_2O al 3% (V/V) y adquiridos en un equipo Bruker Avance III HD 700 MHz.	37
5.8. Comparación de los espectros de ^1H de E25K/K27E y E25K/K27E/P30K. La flecha roja indica en dónde se ubicó el grupo funcional NH de la lisina. El espectro de la doble mutante fue adquirida en un Bruker de 500 MHz y la triple mutante en un Bruker de 700 MHz.	38
5.9. Espectro NOESY con tiempo de mezclado de 300 ms de la tamapina con las mutaciones E25K/K27E/P30K.	39
5.10. Espectro TOCSY con tiempo de mezclado de 80 ms de la tamapina con las mutaciones E25K/K27E/P30K.	40
5.11. Experimento NOESY 300 ms. Interacciones de los protones β de las cisteínas 8 y 26 marcadas con un círculo rojo.	41
5.12. Alineamiento de las 20 mejores estructuras obtenidas en el programa CYANA de la tamapina con las mutaciones E25K/K27E/P30K.	42
5.13. Relaciones de las señales NOEs de las conectividades de la secuencia de la triple mutante E24K/K27E/P30K.	43
5.14. Estructura tridimensional afinada mediante el programa AMBER de la tamapina con las mutaciones E25K/K27E/P30K.	44
5.15. Comparación entre la estructura tridimensional de la doble mutante E25K/K27E y la triple mutante E25K/K27E/P30K de la tamapina.	45
B.1. Gráfico de Ramachandran para las 20 estructuras calculadas por CYANA.	50

Tabla de abreviaturas

E. coli *Escherichia coli*.

ACN acetonitrilo.

CAMQ cromatografía de afinidad metal-quelato.

COSY Correlation Spectroscopy.

EM Espectrometría de Masas.

IPTG Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside.

LB Luria-Bertani.

MALDI-TOF Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight.

NOE Nuclear Overhouser Effect.

NOESY Nuclear Overhouser Spectroscopy.

ppm partes por millón.

RMN Resonancia Magnética Nuclear.

SDS-PAGE sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

TEV Tobacco Etch Virus.

TFA ácido trifluoroacético.

TOCSY Total Correlation Spectroscopy.

Índice de tablas

1.	Secuencias de la tamapina, la doble mutante de la tamapina E25K/K27E, silatoxina y la triple mutante de la tamapina E25K/K27E/P30K. El aminoácido mutado está resaltado en rojo.	2
1.1.	Características de las cepas de <i>E. coli</i> comúnmente utilizadas para la clonación y expresión de proteínas recombinantes. [12, 13]	9
1.2.	Resumen de las características de las principales familias de las toxinas que bloquean los canales iónicos de K^+ [17].	10

Antecedentes

La tamapina es una toxina peptídica que proviene del veneno del alacrán rojo de la India *Mesobuthus tamulus*. Perteneció a la familia de las α -KTx que bloquean los canales iónicos de K^+ activados por Ca^{2+} de baja conductancia (SK). En el 2002 Pedarzani y colaboradores [1] describieron por primera vez su purificación y caracterización farmacológica. En este mismo estudio se realizaron pruebas electrofisiológicas entre diversas toxinas de la familia α -KTx y los canales iónicos SK1, SK2 y SK3. La tamapina resultó tener mayor afinidad con el canal SK2.

En el 2005, Andreotti y colaboradores [2] publicaron modelos *in silico* de la interacción de los canales SK2 y SK3 con la tamapina. Ambos modelados sugieren que los canales SK2 y SK3 interactúan con la tamapina en la región de la hélice α . A partir de este estudio se sugirió que las principales interacciones para la unión de la tamapina a los canales SK2 están dadas por cuatro puentes de hidrógeno que involucran los residuos de tamapina R6, R13, Y31. De igual forma se reportan varias interacciones electrostáticas a través de los residuos R13, R7 y K20.

En el 2014 Ramírez y colaboradores [3] reportaron la estructura tridimensional de la tamapina recombinante obtenida por Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Se observó que posee un motivo estructural CS- α/β estabilizado por tres puentes disulfuro entre sus 6 cisteínas (C_3-C_{21} , C_8-C_{26} y $C_{12}-C_{28}$). En esta estructura los residuos L5-S14 forman la hélice α y los residuos L18-I22 a E25-P30 forman dos hebras β antiparalelas. La estructura tridimensional de la tamapina se muestra en la Figura 1.

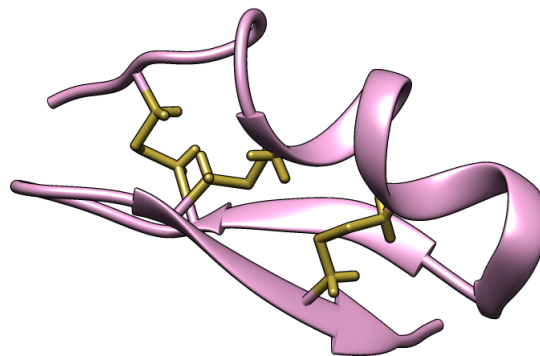


Fig. 1: Estructura tridimensional de la tamapina recombinante. Exhibe un motivo estructural CS- α/β estabilizado por tres puentes disulfuro (indicados de color amarillo) entre sus 6 cisteínas. Código PDB: 2LU9.

INTRODUCCIÓN

En este mismo trabajo se diseñaron las mutantes R6A, R7A, R13A y R6A/R7A y se estudió su actividad citotóxica sobre células con canales SK2. Dichas mutantes mostraron un efecto citotóxico similar al de la toxina con secuencia nativa, por lo que se concluyó que estos residuos no son esenciales para esta actividad. Se demostró que las interacciones sobre la hélice α no eran determinantes para la actividad citotóxica de la tamapina.

En años recientes se reportó que la inhibición de los canales SK3 disminuye la migración celular [4]. Estudios previos respaldan la relación que existe entre la migración celular y la sobreexpresión de los canales SK3 [5]. Considerando que la tamapina tiene una gran afinidad por los canales SK2 y que los canales SK2 y SK3 son similares, se propuso utilizar esta toxina para estudiar su interacción con dichos canales. A partir de los resultados de estos estudios se pretende crear una toxina que incremente su afinidad por el canal SK3.

En el 2020 Mayorga y colaboradores [6] diseñaron 12 mutantes de tamapina. Las mutaciones se realizaron en varios aminoácidos básicos, ácidos y aromáticos situados en la hebra β . Con el fin de incrementar la afinidad al canal SK3, se realizaron mutaciones en los residuos E25 y K27. Se eligieron dichos residuos con base en el análisis de la silatoxina, la cual tiene alta afinidad con los canales SK3. Como resultado se obtuvieron las mutantes E25K, K27E y la doble mutante E25K/K27E. A partir de los resultados electrofisiológicos se demostró que la doble mutante E25K/K27E incrementa la afinidad a los canales SK3 respecto a la tamapina.

Debido a lo anterior se propuso el diseño de la mutante E25K/K27E/P30K con el objetivo de seguir aumentando la similitud a la secuencia de la silatoxina. En la tabla 1 se muestran las secuencias de la tamapina, la doble mutante de la tamapina, la silatoxina y la nueva mutante E25K/K27E/P30K propuesta.

Proteína	Secuencia	10	20	30	
Tamapina	AFCNLRRCEL	SCRSLGLLGK	CIGEECKCVP	Y	
Tamapina E25K/K27E	AFCNLRRCEL	SCRSLGLLGK	CIGEKCECVP	Y	
Silatoxina	AFCNLRMCQL	SCRSLGLLGK	CIGDKCECVK	H	
Tamapina E25K/K27E/P30K	AFCNLRRCEL	SCRSLGLLGK	CIGEKCECVK	Y	

Tabla 1: Secuencias de la tamapina, la doble mutante de la tamapina E25K/K27E, silatoxina y la triple mutante de la tamapina E25K/K27E/P30K. El aminoácido mutado está resaltado en rojo.

Hipótesis

Es posible producir la triple mutante de la tamapina E25K/K27E/P30K purificada y en cantidades suficientes para realizar los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear bidimensionales y poder determinar su estructura tridimensional.

Objetivo

Producción heteróloga, purificación y determinación de la estructura tridimensional por medio de Resonancia Magnética Nuclear de la triple mutante de la tamapina E25K/K27E/P30K.

Objetivos particulares

- Realizar la expresión de gen que codifica para la mutante E25K/K27E/P30K de la tamapina, empleando como microorganismo huésped *Escherichia coli*.
- Purificar la proteína mediante técnicas cromatográficas.
- Caracterizar la proteína mediante espectrometría de masas.
- Determinar la estructura tridimensional de la proteína por medio de RMN.
- Comparar la estructura tridimensional de la doble mutante E25K/K27E con la triple mutante E25K/K27E/P30K.

Parte I

Marco teórico

1.1. Proteínas

Los aminoácidos juegan un papel clave en la gran mayoría de los procesos biológicos. De forma general son moléculas que contienen un grupo carboxilo ($-\text{COOH}$) y un grupo amino ($-\text{NH}_2$). Los aminoácidos se clasifican de acuerdo a las ubicaciones de los grupos funcionales estructurales centrales. En el caso de los aminoácidos- α el grupo amino y el grupo carboxilo están unidos al mismo carbono, el cual se denomina carbono α . En la figura 1.1 se muestra la estructura general de un aminoácido- α . Normalmente las proteínas están constituidas únicamente por aminoácidos- α .

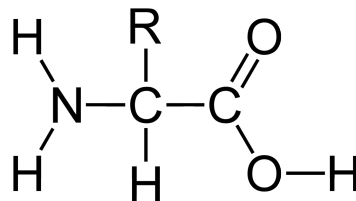


Fig. 1.1: Estructura general de un aminoácido- α .

La identidad del aminoácido se define por su cadena lateral, comúnmente denominada grupo R. Esta cadena determina las propiedades químicas del aminoácido. Tanto los péptidos como las proteínas están formadas por la unión de aminoácidos mediante enlaces peptídicos. Un enlace peptídico es la unión covalente entre dos aminoácidos adyacentes en una cadena polipeptídica. Este enlace se forma a través de una reacción de condensación entre el grupo amino y el grupo carboxilo de dos aminoácidos consecutivos, con la eliminación de una molécula de agua. En la figura 1.2 se muestra el esquema general de la formación del enlace peptídico.

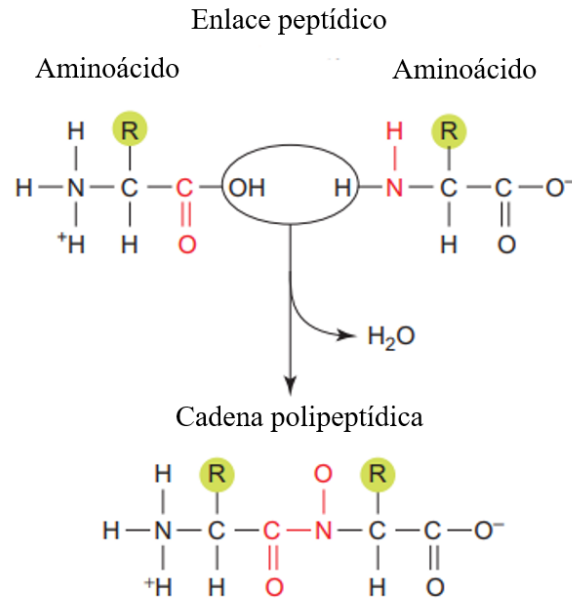


Fig. 1.2: Esquema general de la formación de un enlace peptídico. [7]

Una proteína consiste en una o más cadenas polipeptídicas plegadas y enlazadas de manera específica. Cuando una cadena polipeptídica está estructurada y tiene una función definida se le denomina proteína, sin importar la cantidad de aminoácidos (también llamados residuos). De manera general, la función de la proteína se deriva de su estructura tridimensional [8]. Cada proteína se puede describir de acuerdo con su estructura primaria, estructura secundaria y estructura terciaria. Algunas proteínas adoptan una estructura cuaternaria.

A la secuencia lineal de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos se le llama estructura primaria de la proteína. Hay 20 aminoácidos comunes que comprenden las estructuras de las proteínas. Se pueden ordenar de acuerdo a su carácter alifático, aromático, ácido, básico, etc.

A los arreglos espaciales estables de ciertos segmentos de una cadena polipeptídica que se mantienen unidos mediante interacciones no covalentes como puentes de hidrógeno se les llaman estructura secundaria. Estas interacciones sólo se dan entre los átomos de la cadena principal. Este tipo de estructuras a menudo implican patrones estructurales repetidos. Los tipos de estructuras secundarias más comunes son hélices α y hebras β .

Las hélices α son giros regulares de 3.6 residuos de largo por cada giro estabilizadas por interacciones entre el oxígeno del carbonilo y el NH. Estas interacciones son puentes de hidrógeno. Hay algunas raras excepciones a este esquema general donde los puentes de hidrógeno pueden ocurrir entre tres residuos (hélice 3_{10}) o entre 4.4 residuos (hélice π). Estas estructuras son mucho menos estables que las hélices α generales y normalmente no se ven favorecidas. Cualquiera de los 20 aminoácidos puede participar en una hélice α , pero algunos son más favorecidos que otros. Ala, Glu, Leu y Met se encuentran con mayor frecuencia en las hélices, mientras que Gly, Tyr, Ser y

Pro tienen menos probabilidades de verse [9].

Las hebras β están formadas por láminas paralelas y antiparalelas. Se dice que son paralelas cuando corren en la misma dirección, es decir sus extremos N-terminal y C-terminal se emparejan con los de la otra cadena. Esto permite la formación de puentes de hidrógeno entre las aminas y los carbonilos de los residuos de la cadena principal.

El plegamiento tridimensional de la proteína provocado por las interacciones no covalentes intermoleculares entre las cadenas de aminoácidos se le llama estructura terciaria, la cual le confiere la función y actividad biológica a la proteína en algunos casos. Esta estructura se encuentra estabilizada por diversos tipos de interacciones tales como: interacciones hidrofóbicas entre las cadenas laterales no polares, puentes de hidrógeno, puentes salinos e interacciones entre grupos aromáticos.

1.2. Proteínas recombinantes

Muchas proteínas de interés industrial, investigación básica o con aplicación terapéutica se sintetizan en sistemas heterólogos debido a la disponibilidad de las fuentes naturales o la dificultad para obtener rendimientos suficientes. A las proteínas sintetizadas en una célula huésped se les llaman proteínas recombinantes. Para producir una proteína recombinante primero se debe elegir el sistema huésped, por lo que se debe investigar previamente las propiedades de la proteína deseada. Cuando las proteínas no se encuentran modificadas post-traduccionalmente, las bacterias son un sistema de expresión adecuado.

La expresión de una proteína recombinante requiere la inserción de un fragmento de ADN en un vector de expresión el cual es transferido a células bacterianas competentes mediante un procedimiento llamado transformación. Posteriormente las células son cultivadas e inducidas a expresar la proteína de interés. Para la producción de proteínas recombinantes es necesario considerar aspectos importantes como el diseño del vector, selección de la cepa productora, el cultivo bacteriano y el procedimiento de purificación.

En términos generales *Escherichia coli* (*E. coli*) es el sistema de expresión procarionte de proteínas recombinantes más empleado debido a que ha sido mejor caracterizado en términos de su genética, fisiología y sistemas de expresión. Debido a lo anterior se tienen varios vectores bien establecidos para la producción de proteínas de fusión [10]. Una proteína de fusión es una proteína creada a partir de la unión de dos o más genes que originalmente codificaban para proteínas separadas. Una de las principales ventajas de la expresión de proteínas recombinantes es que la proteína de interés se puede expresar como una proteína de fusión que contenga etiquetas o sitios específicos que facilitan considerablemente la identificación y purificación de la proteína. De igual forma se mejora tanto el nivel de expresión como la solubilidad.

Existen una amplia variedad de vectores disponibles para la expresión de proteínas. Su elección depende del tipo de cepa bacteriana que se empleará, el tipo de etiqueta que contendrá la proteína de fusión, el nivel deseado de expresión, etc. Generalmente los vectores de expresión contienen las secuencias de un gen de resistencia a los antibióticos, de un promotor, del origen de replicación y una región donde se inserta el fragmento de ADN ajeno.

La ARN polimerasa reconoce el promotor e inicia la transcripción. Uno de los promotores más empleados es el promotor tardío del bacteriófago T7 [11]. Se emplean cepas bacterianas modificadas genéticamente, que en su genoma se ha insertado el gen que codifica la ARN polimerasa T7 del bacteriófago T7 bajo el control del operón *lac*. La transcripción inicia solo cuando se agrega al medio de cultivo lactosa o su análogo el Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). En primera instancia se sintetiza la ARN polimerasa T7 para posteriormente iniciar la transcripción y traducción de la proteína de interés.

Los vectores pET, están diseñados con los elementos mencionados en el párrafo anterior, adicionalmente integran a la proteína de interés una etiqueta de 6 histidinas que facilita la purificación de la proteína de interés. Normalmente las etiquetas pueden interferir con la estructura y función de la proteína recombinante. En este vector se han incorporado secuencias que codifican para diferentes sitios que reconocen enzimas proteolíticas que permiten la escisión precisa de la etiqueta de histidinas de la proteína de interés, por lo que dichas etiquetas se eliminan después de la expresión y durante la purificación de la proteína recombinante. Tal es el caso de la enterocinasa, el factor Xa, trombina o la proteasa Tobacco Etch Virus (TEV).

La elección de la cepa a emplear es relevante, ya que está íntimamente relacionada con la expresión de la proteína. Actualmente existen diferentes tipos de cepas de *E. coli* genéticamente alteradas según su idoneidad de la expresión de genes extraños. Generalmente, se emplean cepas con baja tasa de mutación o de inserción de secuencias provenientes del plásmido. Debe ser deficiente de proteasas naturales y mantener la estabilidad plasmídica [10]. Para elegir una cepa adecuada es necesario considerar aspectos tales como el tamaño de la proteína de fusión, la presencia de puentes disulfuro, etc. En la tabla 1.1 se muestran las características con las cepas de *E. coli* más empleadas para la producción de proteínas recombinantes. También se indica la resistencia a antibióticos de cada cepa.

Cepa de <i>E. coli</i>	Derivado	Descripción	Resistencia a antibiótico
BL21	B834	Menos degradación de proteasas de la proteína recombinante.	×
BL21(DE3)	B834	Expresión bajo el promotor T7.	×
Origami TM	K-12	Promover la formación de puentes disulfuro.	Kanamicina Estreptomina Tetraciclina
Rossetta TM	BL21	Expresión de proteínas de eucariotes que contienen codones raros para <i>E. coli</i> .	Cloranfenicol
Rosseta-gami TM	Origami (K-12)	Mejora la formación de enlaces disulfuro en el citoplasma de <i>E. coli</i> y proporcionan seis RNAt de codones raros.	Kanamicina Estreptomina Tetraciclina Cloranfenicol
C41(DE3)	BL21(DE3)	Sobreexpresión de proteínas tóxicas.	×
C43(DE3)	BL21(DE3)	Expresión de proteínas de membrana y globulares.	×

Tabla 1.1: Características de las cepas de *E. coli* comúnmente utilizadas para la clonación y expresión de proteínas recombinantes. [12, 13]

La biosíntesis de proteínas recombinantes presenta una gran ventaja cuando se desea producir una proteína que se encuentre en la naturaleza en poca cantidad. Tal es el caso de algunas proteínas de interés contenidas en el veneno de ciertos animales.

1.3. Toxinas de alacrán

Existen aproximadamente 1500 especies de alacrán diferentes. Alrededor de 25 de estas especies representan un peligro mortal para el ser humano. El motivo por el que algunas especies sean tan letales es debido a la composición de su veneno. Su veneno está constituido por diversos compuestos entre los que destacan sales, moléculas orgánicas, proteínas y toxinas. Las picaduras de alacrán causan una amplia gama de afecciones, desde lesiones cutáneas graves al colapso neurológico, respiratorio y cardiovascular [14]. Los efectos neurotóxicos que desencadenan las toxinas del veneno en los mamíferos se producen debido al bloqueo directo o la modulación de los canales iónicos [15].

Al grupo de toxinas que bloquea los canales iónicos de K^+ se les denomina KTx. Este grupo de toxinas se clasifica en 6 familias, α , β , γ , δ , λ y κ [16]. En la tabla 1.2 se describen algunas características de las principales familias de toxinas que bloquean este tipo de canales iónicos.

Familia	Características
α -KTx	<ul style="list-style-type: none"> Están conformadas por menos de 40 aminoácidos. Bloquean principalmente canales iónicos de K^+ dependientes del voltaje o dependientes de Ca^{2+}.
β -KTx	<ul style="list-style-type: none"> Están conformadas de 47 a 84 aminoácidos. Contienen tres puentes disulfuro con dos dominios reconocibles. El extremo N-terminal confiere actividad citolítica de la toxina. El dominio en el extremo C-terminal es responsable de la capacidad de bloqueo del canal de K^+.
γ -KTx	<ul style="list-style-type: none"> Están conformadas de 36 a 47 aminoácidos. Interactúan específicamente con los canales humanos ERG.
κ -KTx	<ul style="list-style-type: none"> Están conformadas de 22 a 28 aminoácidos. Adoptan una estructura formada por dos hélices α paralelas unidas por dos puentes disulfuro.
λ -KTx	<ul style="list-style-type: none"> Están conformadas por menos de 40 aminoácidos. Conforman un motivo estructural tipo nudo inhibitorio de cisteínas o inhibitor cystine knot (ICK).

Tabla 1.2: Resumen de las características de las principales familias de las toxinas que bloquean los canales iónicos de K^+ [17].

Las α -KTx comparten un motivo estructural característico, llamado motivo estructural α/β estabilizado con cisteína (CS- α/β) en donde la hélice α se conecta a dos hebras β antiparalelas mediante puentes disulfuro. Un ejemplo de este tipo de estructura se observa en la figura 1.3 donde se representa la estructura tridimensional de la silatoxina que pertenece a la familia de las α -KTx. En la figura se muestran los 3 puentes disulfuro formados entre sus 6 cisteínas (C_3 - C_{21} , C_8 - C_{26} y C_{12} - C_{28})

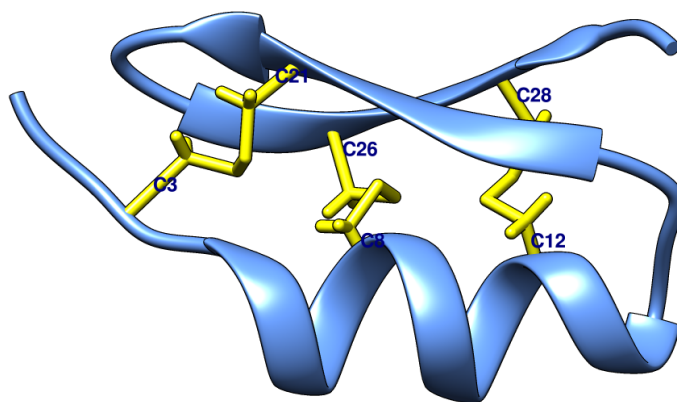


Fig. 1.3: Estructura tridimensional de la silatoxina. Los puentes disulfuro se muestran de color amarillo. Código PDB: 1SCY.

1.3.1. Canales iónicos

Los canales iónicos son proteínas transmembranales formadas por múltiples subunidades de proteínas a través de los cuales los iones pueden moverse a través de la membrana celular. Al momento que las especies iónicas atraviesan el canal, hay poca interacción con la proteína que conforma el canal debido a que el canal sufre pocos cambios conformacionales para permitir el paso de los iones.

Se han descrito diferentes tipos de canales iónicos. Su activación brinda una manera conveniente de categorizar la amplia gama de canales y las similitudes en el comportamiento de activación a menudo se correlacionan con mecanismos estructurales compartidos [18]. La activación de los canales constituye uno de los medios más importantes para controlar la función del canal. Gran parte de los canales son selectivos a iones específicos, dicha especificidad depende del tamaño de los poros y de la presencia de filtros en su entrada. Algunos canales son dependientes de la diferencia de potencial y consisten principalmente en canales de sodio (Na^+), potasio (K^+) y calcio (Ca^{2+}).

1.3.2. Canales iónicos de potasio

Los canales de potasio conforman una de las superfamilias más grandes y diversas de los canales iónicos. Estos canales son tetrámeros de subunidades peptídicas individuales que transportan selectivamente K^+ a través de la membrana celular. Dichos canales hiperpolarizan células, fijan el potencial de membrana y controlan la duración de los potenciales de acción, entre otras funciones [19]. Para distinguir los distintos tipos de canales que se encuentran reportados se considera principalmente el mecanismo mediante el cual éstos se abren. Existen cuatro principales familias de canales iónicos de potasio.

- Canales activados por voltaje (Kv)
- Canales rectificadores internos (Kir)
- Canales de dos poros (K2P)
- Canales activados por calcio (KCa)

Los canales de K^+ activados por Ca^{2+} (KCa) de baja conductancia se les denominan canales SK. El ion Ca^{2+} interactúa con una gran variedad de proteínas y participa en la regulación de un extenso número de vías de transducción de señales, por lo que las células regulan estrictamente la concentración intracelular de Ca^{2+} . Los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de baja conductancia utilizan el Ca^{2+} para regular su apertura y cierre y para apoyar la capacidad de la célula de regular la cantidad de Ca^{2+} que se permite entrar. Estos canales se abren cuando hay una baja concentración de calcio lo cual provoca una hiperpolarización del potencial de membrana y cambios en la excitabilidad celular.

Los canales SK están divididos en 4 miembros principales: SK1, SK2, SK3 y SK4/IK1[20]. Se le considera de gran interés esta familia debido a las zonas dónde se expresan. Los miembros SK1 y SK2 se expresan principalmente en la neocorteza, el hipocampo, la amígdala, el cerebelo y el tronco del encéfalo. El miembro SK3 se expresa en gran medida en el mesencéfalo, el tálamo, el cerebelo y el hipotálamo. El miembro SK4/IK se expresa principalmente en la sangre, células epiteliales y en algunas neuronas periféricas [21]. Entre las principales funciones de los canales SK se encuentra la regulación de las propiedades de disparo neuronal, el flujo sanguíneo y la proliferación celular [20].

Purificación

La purificación de proteínas es una técnica esencial en la investigación bioquímica y de diversas áreas y fundamentales en la mayoría de los procesos biológicos. Para estudiar y comprender sus funciones, es necesario obtener proteínas puras, estructuradas y en cantidades suficientes para su análisis. La purificación de proteínas implica una serie de pasos para separar la proteína de otros componentes celulares y posteriormente concentrarla y estabilizarla. La importancia de la purificación de proteínas radica en su capacidad para proporcionar información valiosa sobre su estructura y función. El estudio de las proteínas permite su uso en diversas aplicaciones biotecnológicas y farmacéuticas. A continuación se hará mención de los métodos más comunes utilizados en la purificación de proteínas y los desafíos que se presentan en este campo.

Existen muchos enfoques de purificación que se pueden emplear para aislar proteínas. Las propiedades de las proteínas son muy diversas, por lo que la estrategia de purificación varía dependiendo de la proteína de interés. Uno de los factores que más influyen en el proceso de purificación es la forma de obtenerlas. Pueden obtenerse de su fuente natural o por métodos recombinantes.

La purificación de proteínas de su fuente natural es un proceso difícil debido a su complejidad estructural y la diversidad de proteínas presentes en las células o tejidos. Las proteínas a menudo se encuentran en bajas concentraciones en las muestras biológicas, lo que requiere técnicas de enriquecimiento y concentración. Además, las proteínas pueden tener propiedades físicas y químicas similares, lo que dificulta su separación. El proceso de purificación es complicado y costoso, y requiere el uso de múltiples etapas y técnicas de separación para obtener una muestra pura.

Cuando la proteína de interés es recombinante y se produce en microorganismos como *E. coli* por lo general el proceso de purificación inicia con la ruptura de la célula. En este proceso se rompe la pared y la membrana celular para liberar materiales intracelulares como ADN, ARN, proteínas y demás componentes de una célula. Una vez que se rompen las células, las proteínas pueden purificarse mediante diversos métodos.

2.1. Métodos cromatográficos

La cromatografía es una técnica de separación y purificación de mezclas complejas en función de las diferencias en sus propiedades fisicoquímicas. Se basa en el principio de la distribución diferencial de los componentes de la mezcla entre dos fases, una fase móvil y una fase estacionaria.

En una técnica cromatográfica, la fase estacionaria es un material poroso que se coloca en una columna o placa plana. La fase móvil se hace pasar a través de la fase estacionaria. Los componentes de la mezcla se separan en función de su afinidad por la fase estacionaria y la fase móvil. Los componentes que tienen mayor afinidad por la fase estacionaria se mueven más lentamente y se separan de los componentes que tienen mayor afinidad por la fase móvil.

Existen diferentes tipos de técnicas cromatográficas, como la cromatografía de exclusión molecular, la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de afinidad, cromatografía de líquidos, etc. Cada una de ellas se utiliza para separar diferentes tipos de compuestos según sus propiedades fisicoquímicas. A continuación se explicará un poco más a detalle la cromatografía de afinidad y la cromatografía de líquidos de fase reversa.

2.1.1. Cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad es una técnica de purificación de una molécula específica o un grupo de moléculas de una mezcla. Hace uso de la interacción específica de la molécula de interés con algún ligante inmovilizado en una matriz [22]. Cuando la muestra pasa por la columna, la molécula de interés se une y se inmoviliza en la columna al mostrar afinidad por el ligante. Posteriormente la molécula de interés es eluida mediante la adición de una disolución con una alta concentración del ligante libre.

Para la purificación de proteínas se ha empleado con mucha eficiencia la cromatografía de afinidad por iones metálicos, donde se aprovecha la interacción de ciertos iones, como lo son Cu^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} con las cadenas laterales de ciertos aminoácidos. La histidina es el aminoácido que presenta la mayor interacción con los iones metálicos [22]. Una etiqueta de histidinas es una secuencia de aminoácidos que se agrega a una proteína para facilitar su purificación. La etiqueta consta de varias histidinas consecutivas, generalmente de seis a diez, que se unen selectivamente a una resina de los metales antes mencionados. [23]. La resina se utiliza en una columna de cromatografía de afinidad para aislar la proteína de interés de otras proteínas y materiales celulares. Una vez que la proteína se ha unido a la resina, se lava para eliminar las impurezas, y luego se eluye la proteína utilizando una solución de alta concentración de sales o un quelante de metales. Comúnmente se emplea imidazol.

La etiqueta de histidinas se puede eliminar posteriormente utilizando una enzima específica para liberar la proteína purificada. Esta es una de las etiquetas de afinidad más utilizadas en la purificación de proteínas. La inmovilización del ion metálico se lleva a cabo empleando un agente quelante que se une a un soporte estacionario lo cual resulta en la formación de un complejo de quelato metálico inmovilizado. A esta técnica específica se le llama cromatografía de afinidad metal-quelato (CAMQ).

2.1.2. Cromatografía de líquidos en fase reversa.

La cromatografía de fase reversa separa las moléculas con base a su hidrofobicidad. Las moléculas hidrofílicas se eluyen primero de una columna de fase reversa, mientras que las moléculas fuertemente hidrofóbicas se eluyen al final. Cuando se quiere realizar la separación de péptidos o proteínas generalmente se emplea una elución por gradiente, utilizando dos fases móviles diferentes [24]. La fase estacionaria en fase reversa es un material hidrofóbico que se coloca en una columna y consiste en partículas porosas de sílice o de un polímero funcionalizado con grupos hidrofóbicos, como C18 o una cadena de longitud inferior.

La cromatografía en fase reversa se ha convertido en una de las técnicas más empleadas para la purificación y el análisis de péptidos y proteínas debido a su gran capacidad de resolución, reproducibilidad y recuperación [24]. Generalmente cualquier tipo de péptido con residuos hidrofóbicos se puede analizar con este tipo de cromatografía. Sin embargo, no solo se restringe a péptidos, también se pueden analizar oligonucleótidos, aminoácidos y otras moléculas orgánicas.

2.1.3. Criterios de pureza

Los criterios de pureza en proteínas son un conjunto de medidas que se utilizan para evaluar la pureza de una muestra de proteína. Esta es esencial para la interpretación precisa de los resultados de cualquier experimento biológico en el que se utilice la proteína, así como para garantizar que la proteína es segura para su uso en aplicaciones clínicas y farmacéuticas. Algunos de los métodos más comunes para determinar la pureza de una muestra de proteína son electroforesis, Espectrometría de Masas (EM) y RMN.

2.1.3.1. Espectrometría de masas

EM es una técnica analítica que tiene como objetivo identificar un compuesto a partir de la masa molecular de sus constituyentes. El principio básico de esta técnica es generar iones a partir de compuestos orgánicos o inorgánicos mediante cualquier método adecuado, separar los iones por su relación masa-carga (m/z) y detectarlos de forma cualitativa y cuantitativa mediante sus respectivos valores de m/z y abundancia [25].

Se emplea comúnmente en la purificación de proteínas para identificarlas y caracterizarlas. La EM puede caracterizar proteínas específicas en la muestra basándose en su masa molecular, que es una propiedad única de cada proteína. Es capaz de medir masas moleculares con precisiones de masa dentro del 0.01 % de la masa calculada [26]. Es una técnica empleada como criterio de pureza cuando se obtiene un único ion molecular. La presencia de otro ion molecular implica que la proteína no está pura.

2.1.3.2. Electroforesis

La electroforesis es un término general que describe la migración y separación de partículas cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico [27]. La movilidad de la partícula iónica está determinada por el tamaño, la forma y la carga de la misma. Cuando la separación se realiza utilizando una corriente eléctrica aplicada a una matriz de gel se le denomina electroforesis en gel. Esta técnica se utiliza para la separación de biomoléculas, especialmente ácidos nucleicos y proteínas.

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio o sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) por sus siglas en inglés se basa en la diferente migración de proteínas en un gel bajo un campo eléctrico debido a su peso molecular. En este proceso primero se realiza la desnaturalización de las proteínas utilizando dodecilsulfato de sodio (SDS). Este es un detergente que rompe las interacciones débiles de las proteínas, obteniendo únicamente su estructura primaria. Además provoca una carga negativa neta en las proteínas. Al aplicar el campo eléctrico las proteínas migran a través del gel. La velocidad de migración y la distancia dependen de su peso molecular. En muchos casos este procedimiento ha demostrado ser un método muy útil para determinar el número y el tamaño de las proteínas en una muestra. En algunos casos puede emplearse como criterio de pureza.

Determinación de la estructura tridimensional

3.1. Resonancia Magnética Nuclear

La RMN es una técnica espectroscópica que permite determinar la estructura tridimensional de una molécula. Esta técnica es comúnmente empleada en el estudio de proteínas, ya que provee información a nivel atómico sobre estos sistemas. El principio de esta técnica es la interacción entre la radiación electromagnética de radiofrecuencia con los espines nucleares de átomos expuestos a una fuente de campo magnético. Al colocar una muestra en un campo magnético y someterla a una frecuencia de radiación adecuada, los núcleos de la muestra absorben energía. Después de la absorción de energía por los núcleos, el periodo de tiempo y la forma en que éstos disipan la energía se obtiene información sobre una variedad de procesos dinámicos.

Es importante mencionar que esta técnica se utiliza como criterio de pureza. Cuando un compuesto no está puro, se observan señales con integraciones diferentes y un incremento en el traslape de señales. Cuando son dos compuestos los que están impuros, rara vez se encuentran en la misma proporción de concentraciones; este hecho hace que sea posible asignar las señales de cada una de las impurezas. Los compuestos que se analizan por RMN para la obtención de sus estructuras requieren de una pureza superior al 95 %.

3.1.1. Espín nuclear

Una partícula giratoria posee una propiedad llamada momento angular; este puede visualizarse como un vector que apunta a lo largo del eje sobre el que gira la partícula. El momento angular de espín, llamado espín, es una forma de momento angular. Es una propiedad intrínseca de las partículas subatómicas. Cada partícula elemental tiene un número particular para el número cuántico de espín S . El número cuántico de espín nuclear se denomina convencionalmente I . Los espines de los núcleos se forman combinando los espines de los protones y neutrones. Los isótopos con números de masa pares tienen un espín entero y los isótopos con números de masa impares tienen un espín medio entero. Cuando los isótopos tienen un número de masa par pueden ocurrir dos casos:

- Si los números de protones y neutrones son pares, el espín nuclear es $I=0$ y no se detectan en RMN.
- Si los números de protones o neutrones son impares el espín nuclear es diferente de cero.

Los núcleos con espín $I = \frac{1}{2}$ son los de mayor importancia en espectroscopía de RMN; ya que son núcleos que tienen forma esférica y propiedades magnéticas convenientes [28]. En el caso del hidrógeno el isótopo más abundante es ^1H tiene espín de $1/2$. En cambio, el isótopo de carbono que tiene espín de $1/2$ es el menos abundante ^{13}C .

3.1.2. Desplazamiento químico

La frecuencia de absorción observada depende de la intensidad del campo magnético. Los espectros de RMN pueden aplicar diferentes intensidades de campo magnético y, en consecuencia, obtener distintos valores de frecuencia de absorción. Para facilitar la comparación de los espectros obtenidos con diferentes intensidades de campo, el efecto de la intensidad del campo se elimina al convertir todas las frecuencias a una escala unidimensional. Dicha escala se denomina desplazamiento químico (δ) y tiene unidades de partes por millón (ppm). Esta escala se define en la ecuación (3.1) donde ν_0 es una frecuencia de referencia.

$$\delta = \frac{\nu - \nu_0}{\nu_0} \times 10^6 \quad (3.1)$$

El tetrametilsilano (TMS) se utiliza como referencia en espectroscopía de RMN de ^1H y ^{13}C . La conversión de frecuencia a desplazamiento químico hace que la posición de la línea espectral sea independiente de la intensidad del campo magnético. Al efecto local que generan los electrones cercanos al núcleo frente al campo magnético externo se le llama apantallamiento. Es debido a este efecto que se observan variaciones en el desplazamiento químico entre núcleos de la misma especie. Por lo tanto, el desplazamiento químico depende del ambiente químico de cada núcleo.

3.1.3. Efecto Nuclear Overhauser

El Efecto Nuclear Overhauser o Nuclear Overhauser Effect (NOE) es uno de los efectos clave para la obtención de estructuras de moléculas, especialmente biomoléculas en solución mediante espectroscopia de RMN. Este efecto es consecuencia del acoplamiento dipolar. Se define como el cambio de intensidad de la resonancia de un núcleo cuando las transiciones de otro núcleo son perturbadas por irradiación [29]. El cambio en la intensidad corresponde a un aumento en moléculas pequeñas o una disminución en moléculas grandes. La detección de un NOE apreciable entre dos espines indica que hay una distancia internuclear relativamente corta entre ellos, generalmente menor a 5 \AA . La mayor utilidad del NOE es la obtención de información sobre las conformaciones moleculares. Esto se logra al saturar selectivamente la magnetización de un protón específico en la molécula y monitoreando los cambios en la intensidad de las resonancias de los protones cercanos o mediante un experimento en 2D llamado NOESY.

3.2. RMN de proteínas

Con RMN se puede determinar la estructura tridimensional de moléculas complejas como péptidos y proteínas. En el estudio de proteínas una de las principales ventajas de esta técnica es que las muestras se pueden estudiar en disolución, lo cual permite su estudio en condiciones fisiológicas.

Si la molécula es pequeña, la determinación del desplazamiento químico de cada hidrógeno puede ser suficiente para la determinación estructural de la molécula. A medida que se incrementa el número de núcleos, la sobreposición de señales aumenta provocando que varias señales se traslapen e impidan una interpretación rápida de los espectros. Sin embargo, los espectros unidimensionales nos brindan información importante sobre el plegamiento de la proteína.

Cuando una proteína no está plegada se espera que la cadena polipeptídica no posea puentes de hidrógeno que generan la estructura secundaria. Por lo tanto, se obtiene un desplazamiento químico similar para todos los protones que es equivalente a aminoácidos libres resultando en un cúmulo de señales entre 7-8 ppm aproximadamente. En cambio, cuando la proteína está plegada, cada hidrógeno en la estructura tridimensional posee un entorno químico generando una gran dispersión de señales de protón particulares para una proteína plegada. En la figura 3.1 se muestra un espectro de ^1H de una proteína plegada.

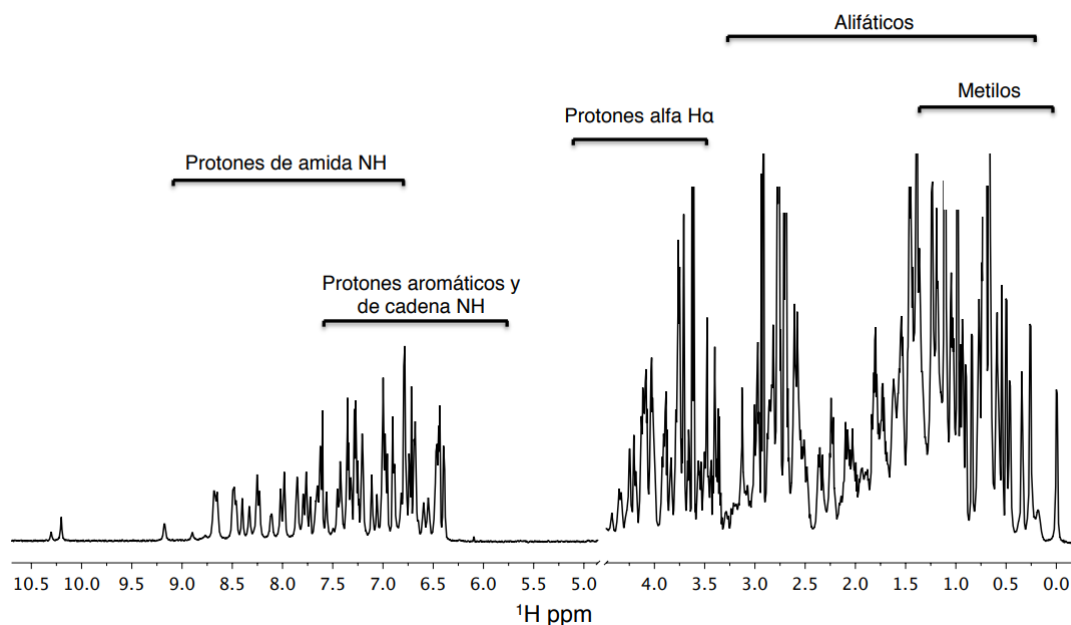


Fig. 3.1: Espectro ^1H donde se indican los desplazamientos químicos frecuentes de los diferentes protones de los aminoácidos [30].

3.2.1. RMN bidimensional

Para obtener un espectro RMN unidimensional se llevan a cabo dos pasos: preparación y detección. El periodo de preparación consiste en un solo pulso de radiofrecuencia, que se utiliza para excitar los espines nucleares. Durante el periodo de detección la magnetización excitada evoluciona con respecto al tiempo e induce una señal en el receptor, a lo que se le denomina decaimiento libre de la inducción. Para obtener un espectro RMN bidimensional se agregan dos pasos, el periodo de evolución y el periodo de mezcla. Finalmente para la adquisición de un espectro bidimensional se generan una serie de datos unidimensionales en los que cada espectro se asocia con un valor particular de la variable de tiempo mediante incrementos constantes en donde la señal es modulada por una segunda frecuencia.

3.2.1.1. COSY

Correlation Spectroscopy (COSY) o Espectroscopía de Correlación es el primer experimento bidimensional y el más simple. Correlaciona un protón con otro a través de un acoplamiento escalar que puede ser de 2 enlaces (germinal), 3 enlaces (vecinales) o, en casos raros, 4 o 5 enlaces (largo alcance) [31]. Existen varios métodos para registrar los espectros COSY. Estos van desde el simple COSY-90, que proporciona poco más que información y conectividad cualitativa, hasta los métodos más sensibles a la fase, como DQF-COSY que puede dar valores de constantes de acoplamiento [32].

3.2.1.2. TOCSY

Total Correlation Spectroscopy (TOCSY) o Espectroscopía de Correlación Total tiene muchas similitudes con el experimento COSY. Por ejemplo, la correlación depende del acoplamiento escalar. Sin embargo, en el experimento TOCSY se puede observar la correlación entre protones aún cuando no hay un acoplamiento directo entre ellos. El experimento utiliza el periodo de mezcla para transferir hasta dónde se pueden observar las correlaciones en la cadena de acoplamiento. Un TOCSY con un tiempo de mezcla cercano de 10 ms produce sólo correlaciones de espines directamente acoplados (al igual que en COSY), en un TOCSY de 80 ms es posible que todos los protones en el sistema de espín estén correlacionados. En el estudio de las proteínas, cada aminoácido representa un sistema de espín.

3.2.1.3. NOESY

Nuclear Overhauser Spectroscopy (NOESY) o Espectroscopía del Efecto Nuclear Overhauser es un experimento bidimensional que correlaciona protones a una distancia de 5 Å o menos que están acoplados dipolarmente. El experimento es una exploración de la estructura local, revela información sobre la conformación y el plegamiento de proteínas. Los experimentos NOESY se utilizan ampliamente para la determinación de los efectos nucleares Overhauser homonucleares (^1H - ^1H). El NOE forma parte importante del procedimiento de asignación secuencial, haciendo

3.2 RMN de proteínas

el vínculo entre los protones a través del enlace peptídico. Los experimentos NOESY son de naturaleza no selectiva y, por lo tanto, todos los NOEs se mapean en un solo experimento.

Parte II

Diseño experimental

Metodología

En la figura 4.1 se observa el diagrama de la metodología empleada para la obtención y purificación de la tamapina con las mutaciones E25K/K27E/P30K. Dicha metodología fue previamente optimizada para un trabajo aún no escrito.

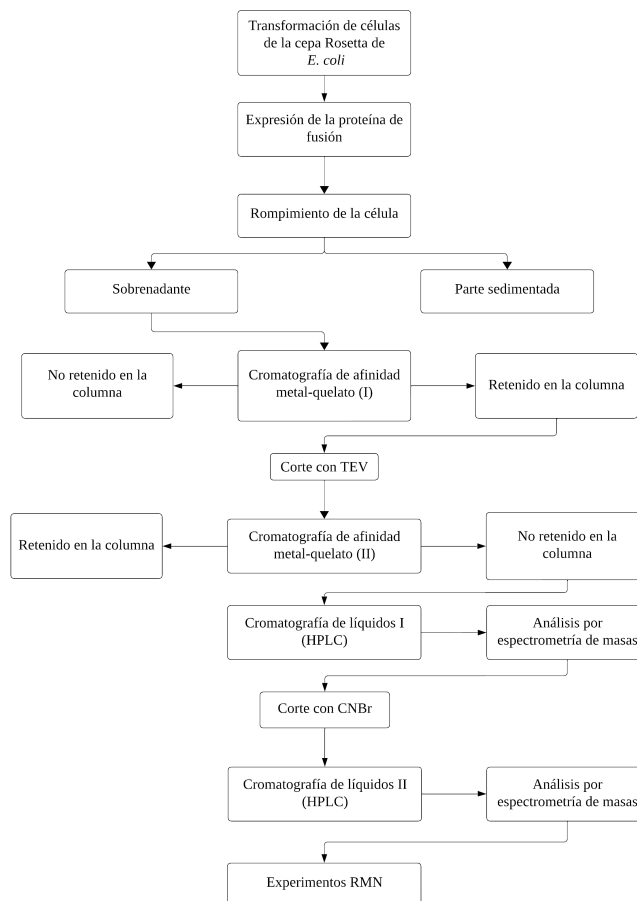


Fig. 4.1: Diagrama general del proceso de producción y purificación de la proteína recombinante de la tamapina con las mutaciones E25K/K27E/P30K.

En este trabajo se utilizó el plásmido pET-32a(+) el cual se muestra en la figura 4.2

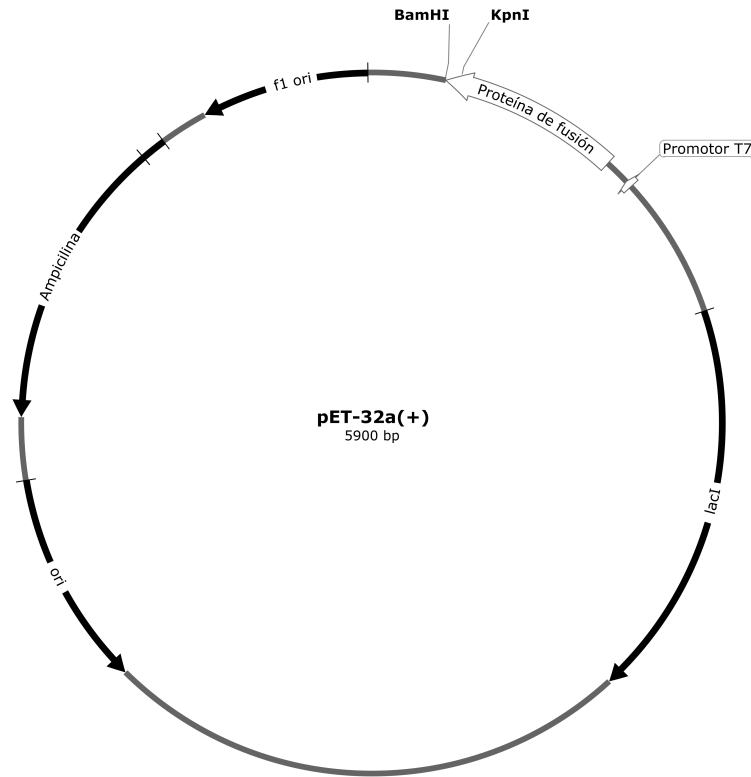


Fig. 4.2: Plásmido pET-32a(+) utilizado para la expresión de la proteína recombinante de la tamapina con las mutaciones E25K/K27E/P30K.

El plásmido antes mencionado contiene la secuencia que codifica para la proteína de fusión, la cual está constituida de 192 aminoácidos y tiene un peso molecular de 20.9 KDa. En la figura 4.3 se muestran sus principales regiones. Contiene un dominio de tiorredoxina, una etiqueta de 6 histidinas, un sitio de 6 aminoácidos que reconoce la proteasa TEV y la secuencia de la toxina de interés. La secuencia de la triple mutante de la tamapina contiene glicina (G) y metionina (M) que posteriormente se eliminan mediante una reacción con bromuro de cianógeno (CNBr).



Fig. 4.3: Esquematación de la proteína de fusión. Se indican cuatro regiones de izquierda a derecha. La tiorredoxina, la etiqueta de 6 histidinas, la secuencia del sitio de corte con la proteasa TEV y la triple mutante con terminación GM en N-Terminal.

4.1. Transformación

Se inició el trabajo experimental con el plásmido de la triple mutante previamente construido y purificado. El primer paso que se llevó a cabo fue la transformación del vector en la cepa RosettaTM de *E. coli*. Se siguió el siguiente protocolo.

1. Agregar 1 μL del plásmido a células competentes y mezclar suavemente.
2. Mantener en un baño de hielo durante 30 minutos.
3. Someter a choque térmico durante 45 segundos a 42 °C.
4. Agregar 200 μL de medio Luria-Bertani (LB) líquido y estéril e incubar durante 1 hora a 37 °C.
5. Sembrar las células en caja petri con medio LB sólido con ampicilina y cloranfenicol.
6. Dejar incubando la caja a 37 °C por 12-18 horas.

4.2. Expresión

Para realizar la expresión de la proteína de fusión correspondiente se preparó medio LB de cultivo con ampicilina y cloranfenicol. La composición del medio de cultivo y todas las disoluciones empleadas en la purificación se muestran en el Apéndice A. Primero se preparó un preinóculo de 100 mL con las células previamente transformadas. Se dejó crecer a 37 °C durante 16 horas. Posteriormente se tomaron 45 mL y se colocaron en un matraz Fernbach con 1.5 L del medio antes mencionado. Este procedimiento se repitió una vez más para tener un total de 3 L de cultivo. Durante el crecimiento se monitoreó la densidad óptica a 600 nm. Una vez alcanzado el valor de 0.7 se detuvo la incubación y se realizó la inducción con IPTG a 0.5 mmol L⁻¹. Una vez realizada la inducción se dejó incubando por 6 horas a 37 °C. Posteriormente se centrifugó el medio de todos los matraces a 6500 x g durante 7 minutos a 4 °C.

4.3. Purificación

Para monitorear la purificación se tomaron muestras en distintos pasos determinantes del proceso. El control se realizó mediante SDS-PAGE. Se utilizó el marcador de peso molecular Precision Plus ProteinTM Dual Xtra Standards. Se realizó en un gel al 15% de poli(acrilamida) en condiciones reductoras.

4.3.1. Lisis celular

La porción sedimentada que se acumuló durante la centrifugación o pellet fue resuspendida en 30 mL de solución amortiguadora de lisis por cada gramo de pellet obtenido. La lisis celular se realizó por medio de choques sónicos a una potencia de 55 W utilizando pulsos de 10 segundos y descansos de 20 segundos hasta completar un tiempo final de 10 minutos en un baño de hielo. Posteriormente el lisado fue centrifugado durante 45 minutos a 16000 x g. Finalmente se conservó el sobrenadante.

4.3.2. Cromatografía de afinidad metal-quelato (CAMQ I)

La fracción soluble fue filtrada con membrana Durapore[®] de 0.45 μm . Posteriormente se suministró en una columna HiTrap[™] cargada con Ni^{2+} . Una vez retenida la proteína de fusión en la columna se realizó un lavado con una solución amortiguadora de lisis para eluir las proteínas con baja afinidad. La proteína de fusión se obtuvo al realizar distintos lavados de solución amortiguadora de elución con diferentes concentraciones de imidazol (50, 300 y 500 mmol L^{-1}).

Una vez recolectada la proteína se realizó una diálisis utilizando una solución amortiguadora de corte con TEV. Una hora después de haber iniciado el procedimiento se realizó un cambio de solución amortiguadora. La diálisis se llevó a cabo hasta completar un tiempo de 16 horas. Esto se realizó utilizando una membrana de diálisis Spectra/Por[®] de 12 a 14 kDa.

4.3.3. Corte con TEV

Para realizar el corte enzimático se utilizó la proteasa TEV. El sitio de reconocimiento óptimo para esta enzima es la secuencia [ENLYFQ(G)] y la escisión se produce entre los residuos de glutamina (Q) y glicina (G). Dicho corte se realizó para retirar la tiorredoxina y la etiqueta de histidinas de la proteína de fusión.

Para llevar a cabo el corte enzimático se utilizó la solución amortiguadora de corte de TEV. Se agregó 1 mg de TEV por cada 50 mg de proteína de fusión. Posteriormente se dejó en agitación durante 16 horas a 4 °C. Una vez completado el corte se centrifugó la mezcla de reacción durante 11 minutos a 14000 x g y se decantó el sobrenadante. Finalmente se filtró con una membrana Durapore[®] de 0.45 μm .

4.3.4. CAMQ II

La mezcla de reacción se colocó en reflujo por la columna de afinidad metal-quelato durante 4 horas. Una vez retenido el fragmento de etiqueta de histidinas se almacenó la mezcla de reacción que contenía la fracción de la proteína. Posteriormente, la mezcla de reacción se hizo pasar a través de una columna de extracción en fase sólida Strata[®] para concentrar la muestra. Con el fin de eluir la muestra se utilizaron disoluciones a diferentes concentraciones de acetonitrilo (ACN) y agua. Las fracciones recuperadas fueron liofilizadas.

4.3.5. Cromatografía de líquidos en fase reversa

La proteína es purificada por cromatografía de líquidos de fase reversa. Se hace pasar por una columna de fase reversa Phenomenex Júpiter[®] Proteo C12 con un tamaño de partícula de 4 μm y poro de 90 Å acoplada a un sistema HPLC. Se midió la absorbancia a 230 nm. Como eluyente se emplea un gradiente de ACN y agua, ambos con 0.05% de ácido trifluoroacético (TFA). Se colectaron los picos más abundantes. Posteriormente, se liofilizaron las muestras para caracterizarla por Espectrometría de Masas.

4.3.6. Corte con CNBr

Para realizar el corte de los aminoácidos glicina (G) y metionina (M) en el extremo N-terminal de la toxina, se utilizó CNBr. Para realizar el corte se disolvió la proteína hasta alcanzar una concentración de 10 mg por cada mL de la mezcla de reacción. La mezcla de reacción debe estar compuesta por agua desionizada y TFA con una relación 1:1. Por cada equivalente de proteína se agregaron 120 equivalentes de CNBr.

La reacción de corte se llevó a cabo en atmósfera inerte de N_2 durante 16 horas con agitación constante. Al terminar la reacción de corte se agregó agua desionizada hasta alcanzar un valor de pH igual a 2. Una vez obtenido este valor se pasó la muestra por una columna de extracción en fase sólida Strata[®] para concentrar la muestra. El siguiente paso fue liofilizar la muestra y purificar nuevamente por cromatografía de fase reversa. Finalmente, se obtiene la fracción de la proteína cortada libre de los aminoácidos GM.

4.3.7. Espectrometría de masas

Una vez realizado el corte con CNBr se realizó un análisis por Espectrometría de Masas Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) en un equipo Bruker Daltonics Microflex LT del laboratorio de servicios analíticos del Instituto de Química de la UNAM. La matriz utilizada fue ácido α -ciano-4-hidroxicinámico.

4.4. Determinación de estructura

4.4.1. Determinación de la estructura tridimensional por RMN

Los espectros de ^1H -RMN fueron obtenidos en un equipo Bruker Avance III HD 700 MHz. Se adquirieron espectros unidimensionales y bidimensionales. La muestra se preparó disolviendo la toxina liofilizada en una concentración de 1 mmol L^{-1} en H_2O desionizada con D_2O al 3% (v/v). El experimento TOCSY fue obtenido con un tiempo de mezclado de 80 ms. Los experimentos NOESY se adquirieron con tiempos de mezclado de 150 y 300 ms. Los datos de los espectros bidimensionales se procesaron con el programa NMRpipe. La asignación de los sistemas de espín se realizaron empleando el programa CARRA 1.8. Posteriormente se realizaron los cálculos

4.4 Determinación de estructura

estructurales en el programa CYANA 2.1. A partir de las 20 mejores estructuras generadas se realizó el afinamiento de cada una mediante el programa AMBER 22 en vacío.

Parte III

Resultados y discusión

5.1. Transformación y expresión

Al realizar la transformación del vector en la cepa Rosetta™ de *E. coli* se obtuvo una cantidad adecuada de colonias aisladas. Para confirmar que las colonias observadas corresponden únicamente a las células transformadas se realizó un control negativo. El control negativo se realizó en medio LB con antibióticos con la cepa no transformada. No se observó crecimiento en el control, por lo que se confirmó que las colonias obtenidas corresponden únicamente a las células transformadas.

Al finalizar la expresión se pesó la cantidad de porción sedimentada obtenida. A partir de 3 L de medio LB que se prepararon, se obtuvieron 6 g de pellet. Es decir, 2 g/L de cultivo (peso húmedo). Una vez confirmada la cantidad de pellet obtenida se realizó la lisis celular para liberar el material celular, incluyendo la proteína de fusión.

5.2. Purificación

En la figura 5.1 se muestra el gel obtenido durante el proceso de purificación. En el primer carril se agregó el marcador de peso molecular. En el segundo carril se cargó una muestra del lisado, donde se observa la presencia de distintas proteínas de diferente peso molecular. Con el fin de eliminar dichas proteínas que no son de interés se realizaron distintos métodos de purificación para obtener únicamente la proteína de interés.

5.2.1. CAMQ

Como primer paso para eliminar de la mezcla de reacción proteínas que no son de interés se realizó una CAMQ. El lisado se hizo pasar por una columna HiTrap™ cargada con Ni²⁺. Al realizar este paso la proteína de fusión queda retenida en la columna. Esto ocurre debido a la etiqueta de histidinas, las cuales tienen alta afinidad por el catión Ni²⁺. Para confirmar la retención de la proteína de fusión en la columna se tomó una muestra del lisado que no se retuvo

y se cargó en el tercer carril del gel. La proteína de fusión tiene un peso molecular de 20.9 kDa. Como se observa en la Figura 5.1, la banda que corresponde a la proteína de fusión (recuadro rojo) no se observa en el carril 3, pero sí en el 2. Lo anterior confirma que la columna retiene la proteína de interés.

Posteriormente, la proteína retenida eluyó con diferentes concentraciones de imidazol. Se utilizaron concentraciones de 20, 50, 300 y 500 mmol L⁻¹. Con el primer lavado se eluyen proteínas poco afines a la resina. Como se observa en la Figura 5.1 al realizar los lavados con 50 y 300 mmol L⁻¹ se obtiene una fracción enriquecida en proteína de fusión. Sin embargo se decidió continuar la purificación con la fracción de 300 mmol L⁻¹ ya que las proteínas contaminantes están en mejor proporción. Al finalizar la recolección de las fracciones se realizó un lavado con una disolución de 500 mmol L⁻¹ de imidazol con el fin de limpiar la columna.

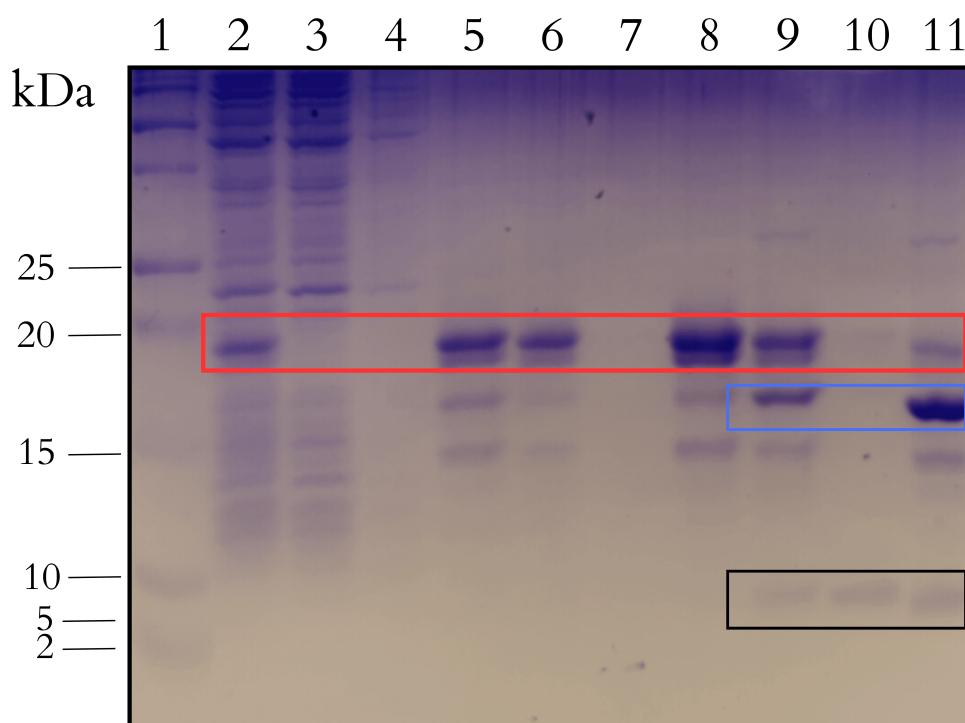


Fig. 5.1: Gel de poliacrilamida al 15%. 1) Marcador de peso molecular. 2) Lisado. 3) Fracción no retenida. 4) Elución con amortiguador de lisis 5) Elución con 50 mM de imidazol. 6) Elución con 300 mM de imidazol. 7) Elución con 500 mM de imidazol. 8) Corte con TEV a 0 h. 9) Corte con TEV a 16 h. 10) Reflujo CAMQ II. 11) Fracción de retención CAMQ II. En el recuadro rojo se muestra la banda correspondiente a la proteína de fusión. En el recuadro azul se muestra la banda correspondiente al residuo de corte. En el recuadro negro se muestra la banda correspondiente a GM-Mutante.

5.2.1.1. Corte con TEV

Una vez recolectada la fracción con proteína de fusión se realizó una diálisis de 16 horas con el fin de retirar el imidazol de la muestra. Es importante realizar este procedimiento ya que el imidazol inhibe las proteasas, lo cual afectaría el rendimiento del siguiente paso de purificación.

Ya retirado el imidazol se realizó la reacción de corte enzimático con TEV. Para llevar a cabo dicha reacción es necesario agregar 1 mg de la proteasa por cada 50 mg de la proteína de fusión. Para calcular la concentración de la proteína de fusión se utilizó la ley de Lambert-Beer. El coeficiente de extinción molar para la proteína de fusión a 280 nm tiene un valor de 0.833 L g^{-1} y fue calculado en el servidor Expasy ProtParam. Posteriormente, se midió la absorbancia de la muestra a 280 nm obteniendo un valor de 0.591. Empleando los datos antes mencionados y haciendo el cálculo correspondiente se obtuvo un valor para la concentración de la proteína de fusión de 0.71 mg mL^{-1} . Conforme a las condiciones antes mencionadas de la reacción se agregaron 28.38 mg de proteína de fusión y $567 \mu\text{L}$ de TEV.

Antes de iniciar la reacción se tomó una muestra de la disolución dializada (corte con TEV a 0 h). Una vez transcurridas las 16 horas de reacción se tomó otra muestra para monitorear la reacción enzimática. En el carril 8 de la Figura 5.1 se cargó la muestra del corte antes de iniciar, en el 9 se cargó la muestra del corte al finalizar. En el carril 9 se observan 2 bandas importantes. La que corresponde a la proteína de fusión en 20 kDa y una que aparece aproximadamente en 16 kDa (recuadro azul). El peso molecular correspondiente al residuo de corte (proteína de fusión sin GM-mutante) es de 17.3 kDa. Lo anterior confirma que la reacción de corte se llevó a cabo.

5.2.1.2. CAMQ II

Para obtener el fragmento de GM-Mutante se coloca la mezcla de reacción en reflujo por la columna de afinidad metal-quelato durante 4 horas. En la columna queda retenida la etiqueta de histidinas contenida en el residuo de corte, como se muestra en la figura 5.2

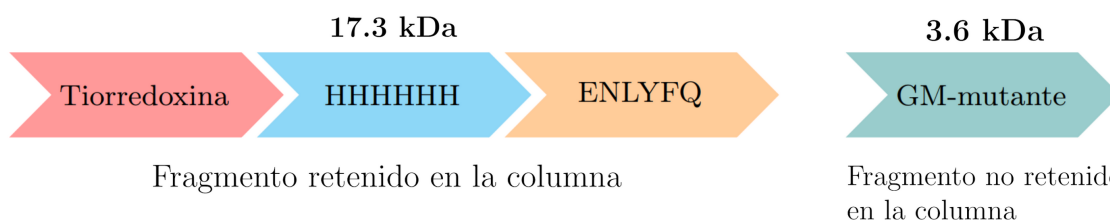


Fig. 5.2: Esquemización de los fragmentos obtenidos después de realizar el corte con TEV durante CAMQ II. En cada fragmento se señala su respectivo peso molecular.

Para confirmarlo se tomó una muestra del reflujo a las 4 horas y de la fracción no retenida en la columna. En el carril 10 del gel se observa que la banda que corresponde al residuo de corte no está. Mientras que en el carril 11 sí se observa, por lo que se infiere que la separación se realizó con éxito. Además se observa la presencia de una banda entre 5 y 2 kDa (recuadro negro). Dicha banda corresponde al peso molecular del fragmento GM-Mutante que es de 3.6 kDa.

5.2.2. Cromatografía de líquidos en fase reversa

Con el fin de continuar con la purificación de GM-Mutante se prepararon las muestras para realizar una cromatografía de líquidos en fase reversa. Para preparar la muestra se realizó una extracción en fase sólida Strata[®]. Se eluyó la muestra con un gradiente de ACN con TFA. Al final del procedimiento se recuperan las fracciones de 60 y 100 % de ACN. Dichas fracciones fueron liofilizadas para retirar el ACN y el agua. Finalmente, se realizó la cromatografía en fase reversa acoplada a un sistema HPLC. En la Figura 5.3 se muestra el cromatograma obtenido. Se observó la presencia de un pico mayoritario el cual se infirió que correspondía a la GM-mutante. Por lo que el pico fue recolectado para su análisis.

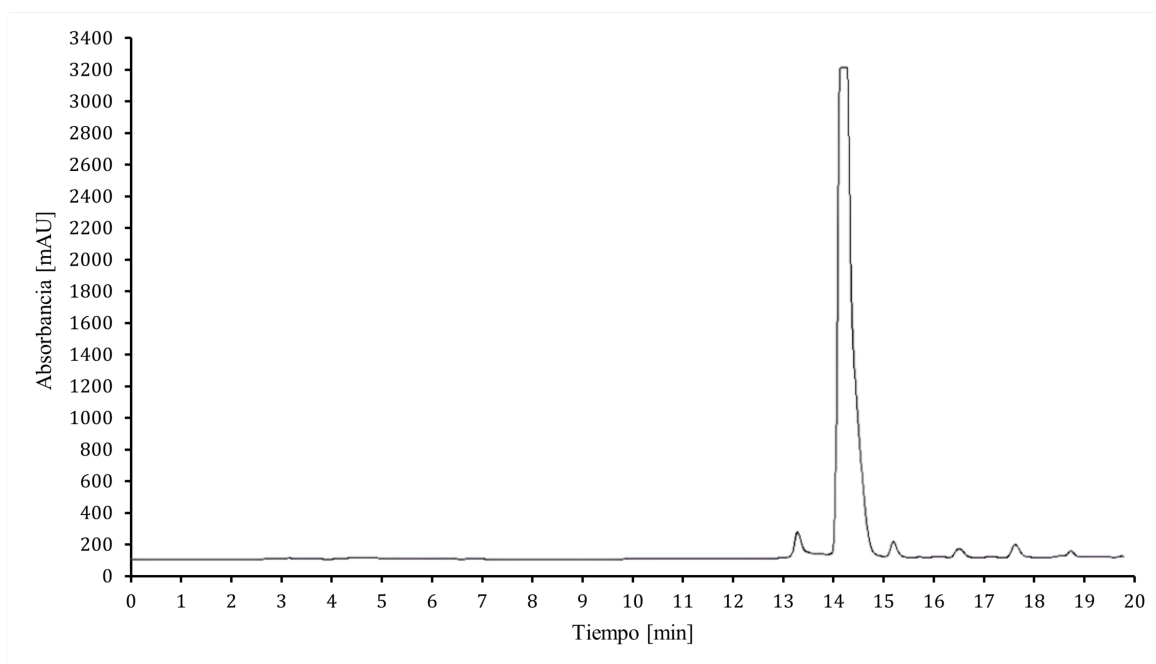


Fig. 5.3: Cromatograma obtenido mediante cromatografía de líquidos en fase reversa de GM-Mutante.

5.2.3. Corte con CNBr

Para confirmar que la fracción recuperada correspondiente al pico mayoritario pertenece a GM-Mutante se realizó un estudio de espectrometría de masas MALDI-TOF. En la Figura 5.4 se observa el pico para el ion molecular $[M+H]^+$ con una relación m/z de 3683.216 Da. Puesto que la masa teórica de GM-Mutante es de 3684.46 Da, se confirmó que la masa obtenida corresponde al fragmento GM-Mutante.

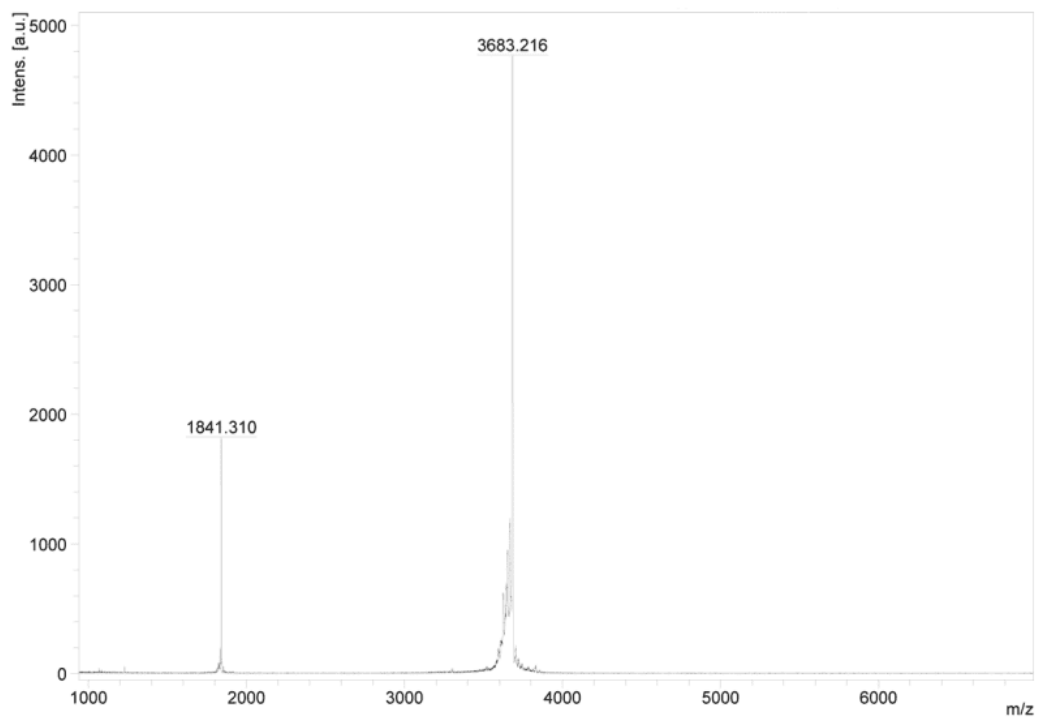


Fig. 5.4: Espectro de masas MALDI-TOF para GM-Mutante

Una vez confirmada la masa molecular y pureza de GM-Mutante se realizó el corte con CNBr para retirar el fragmento GM de la proteína. Cuando el corte fue realizado, la muestra se hizo pasar por una columna de extracción en fase sólida Strata[®]. Finalmente, se purificó nuevamente por cromatografía en fase reversa para retirar todas las posibles impurezas aún presentes en la muestra. El cromatograma obtenido se muestra en la Figura 5.5.

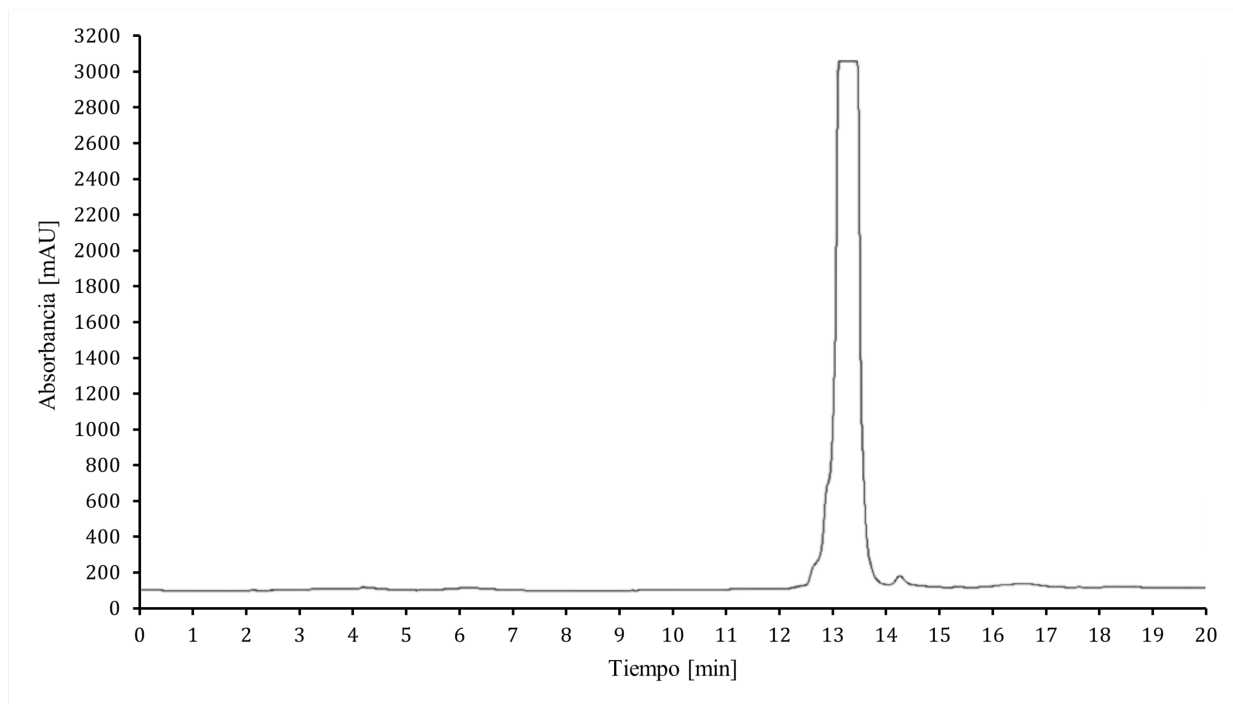


Fig. 5.5: Cromatograma obtenido mediante cromatografía de líquidos en fase reversa de la proteína.

Se obtuvo un único pico, el cual fue recolectado y liofilizado. Para confirmar que los residuos GM fueron retirados se realizó un estudio de espectrometría de masas MALDI-TOF. La masa teórica de la proteína obtenida por el servidor ProtParam es de 3496.22 Da. En la Figura 5.6 se observa el pico para el ion molecular $[M+H]^+$ con una relación m/z de 3491.578 Da. Por lo que se confirma la obtención de la mutante de la tamapina E25K/K27/P30K sin los residuos GM.

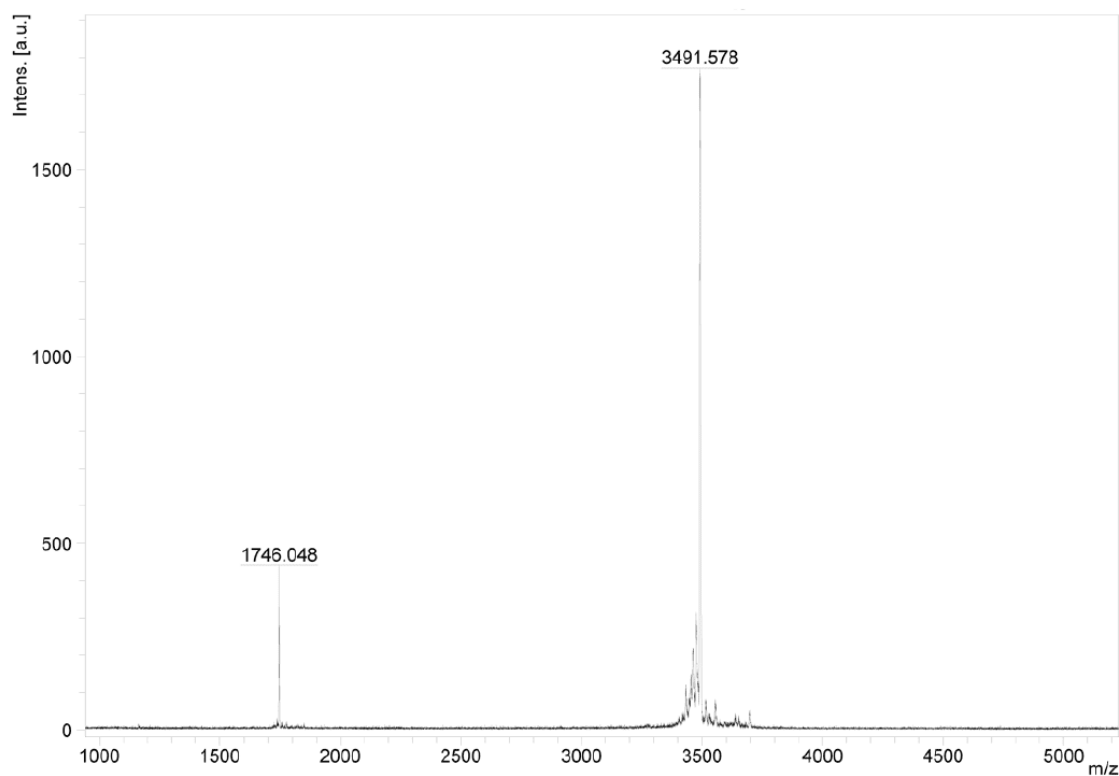


Fig. 5.6: Espectro de masas MALDI-TOF para la tamapina E25K/K27E/P30K.

Una vez pura y liofilizada la proteína, se realizaron los experimentos de RMN unidimensionales y bidimensionales. Al recuperar la muestra se liofilizó y se pesó la muestra seca en una microbalanza. Se obtuvo un total de 2.241 mg de la tamapina con las mutaciones E25K/K27E/P30K pura. El rendimiento de corte de CNBr fue de 48 %. Al final del proceso de purificación se obtuvieron 0.747 mg/L de cultivo.

5.3. Determinación de estructura tridimensional por RMN

En la Figura 5.7 se muestra el espectro de ^1H obtenido de la proteína. Se observa un espectro convencional de una proteína plegada, debido a la dispersión de las señales. El grupo funcional NH de la lisina 30 se asignó a la señal indicada con la flecha roja en la figura 5.8. Una vez confirmada esta primera caracterización de estructura de la proteína se adquirieron los espectros RMN bidimensionales para determinar su estructura tridimensional. En la Figura 5.9 se muestra el experimento NOESY y en la figura 5.10 se muestra el experimento TOCSY.

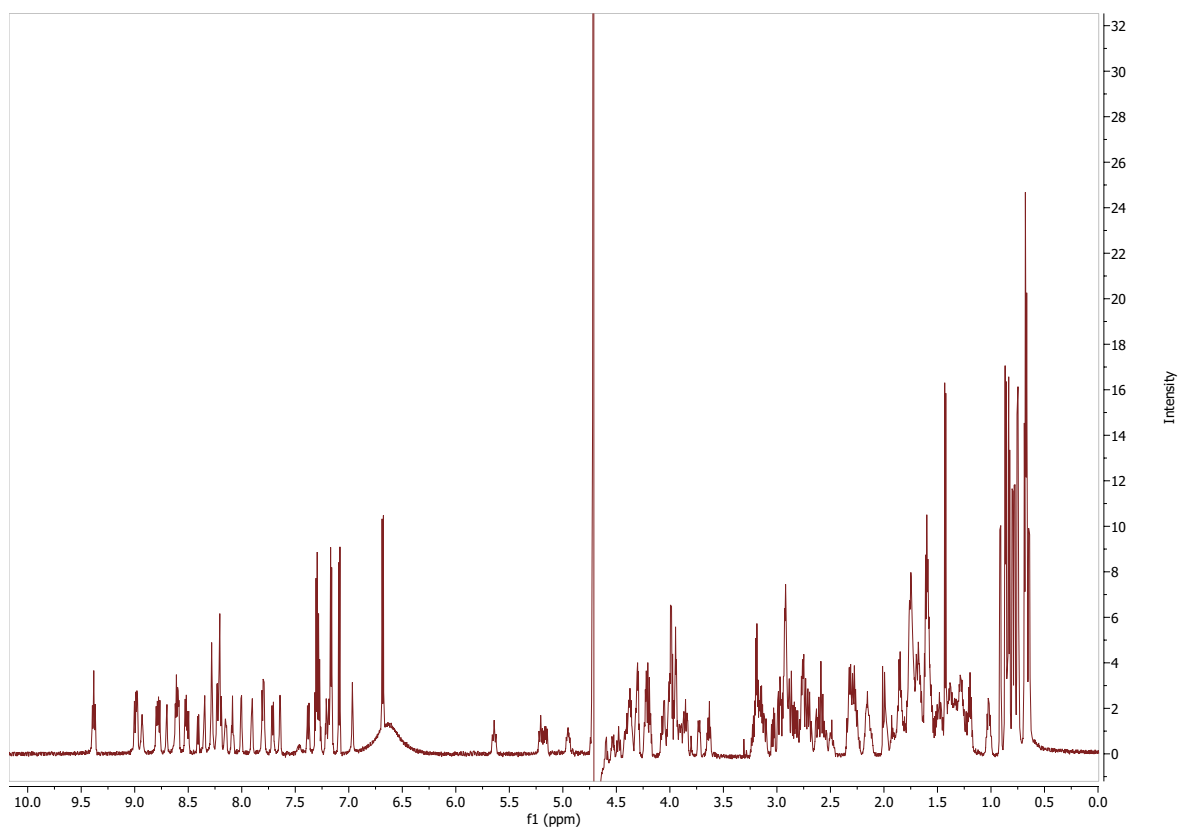


Fig. 5.7: Espectro ^1H -RMN de la proteína recombinante E25K/K27E/P30K. Muestra liofilizada disuelta en H_2O desionizada con D_2O al 3% (V/V) y adquiridos en un equipo Bruker Avance III HD 700 MHz.

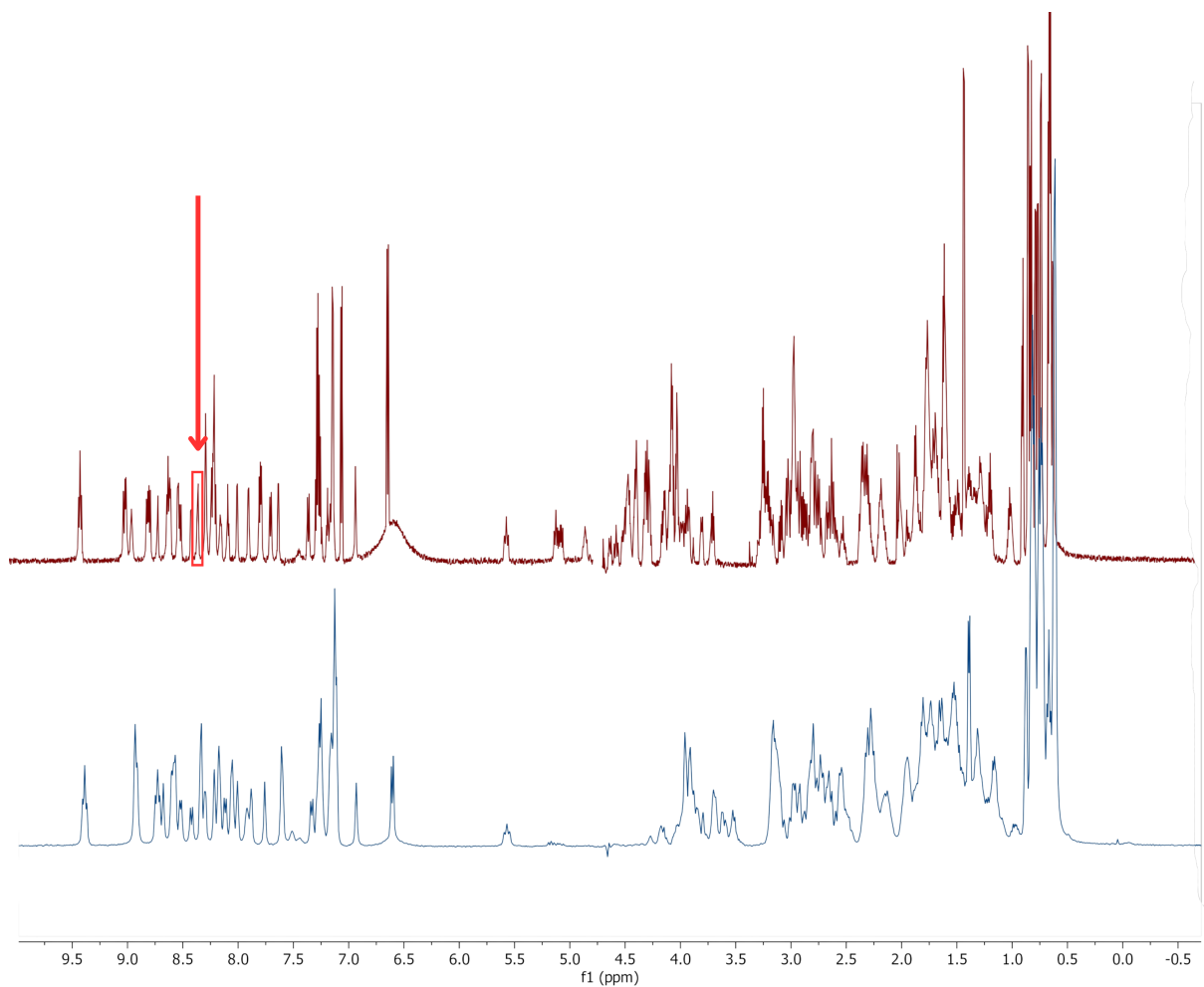


Fig. 5.8: Comparación de los espectros de ^1H de *E25K/K27E* y *E25K/K27E/P30K*. La flecha roja indica en dónde se ubicó el grupo funcional NH de la lisina. El espectro de la doble mutante fue adquirida en un Bruker de 500 MHz y la triple mutante en un Bruker de 700 MHz.

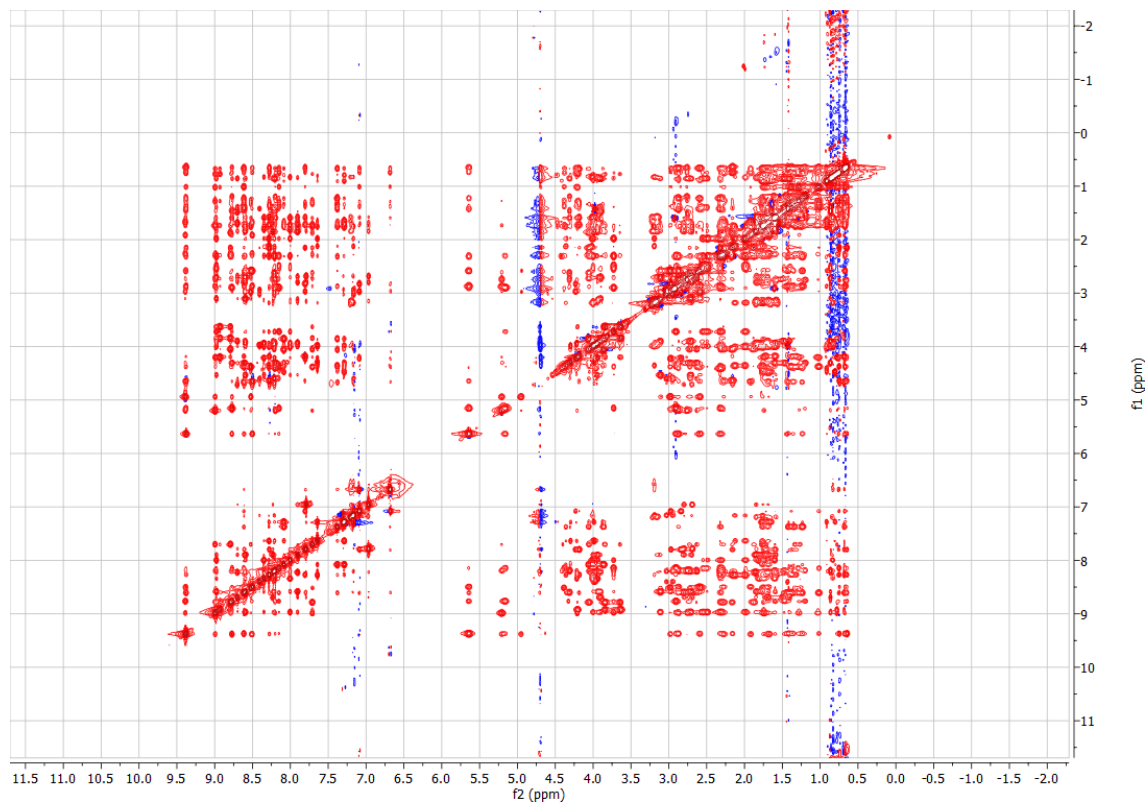


Fig. 5.9: Espectro NOESY con tiempo de mezclado de 300 ms de la tamapina con las mutaciones E25K/K27E/P30K.

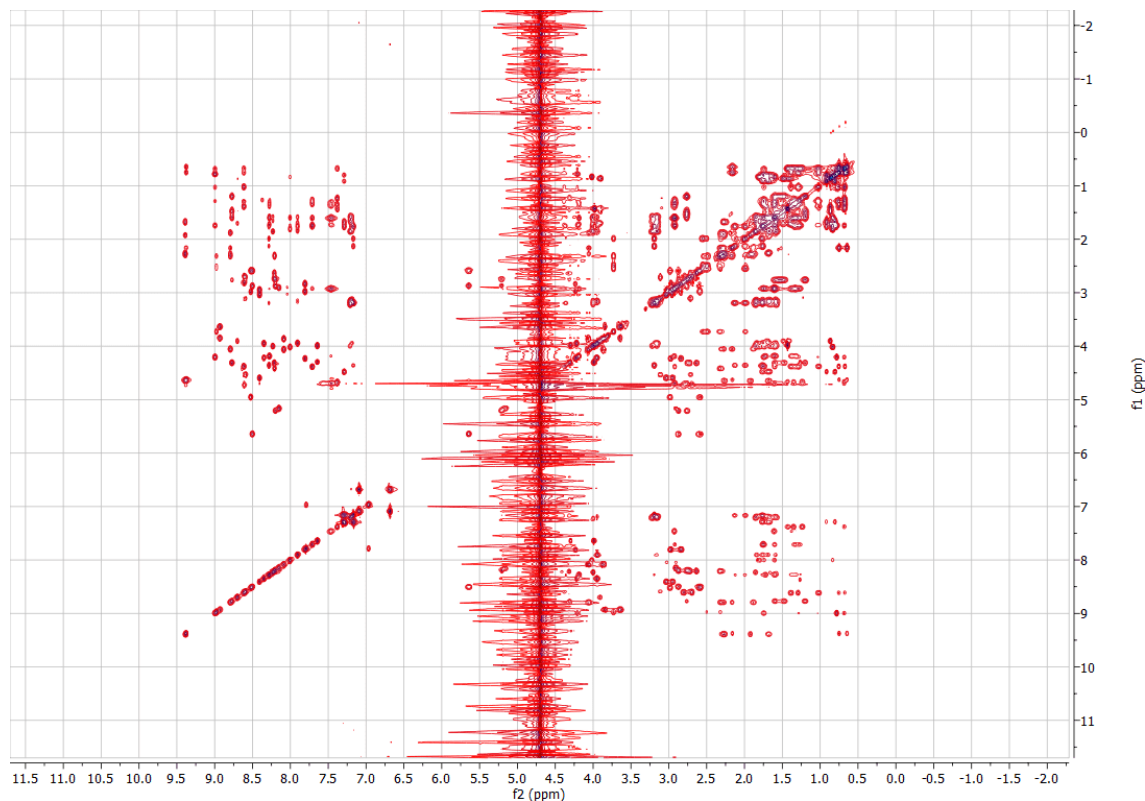


Fig. 5.10: Espectro TOCSY con tiempo de mezclado de 80 ms de la tamapina con las mutaciones E25K/K27E/P30K.

5.3.1. Asignación de las señales

Para la asignación de los sistemas de espín se utilizaron los espectros NOESY y TOCSY. En el experimento TOCSY se identificaron los sistemas de espín de todos los aminoácidos.

Posteriormente, se realizó la asignación de los NOEs en el experimento NOESY de 300 ms. Al hacerlo, fue posible encontrar las correlaciones que se utilizaron para calcular la estructura de la proteína.

Además, utilizando el espectro NOESY fue posible determinar la conectividad de las cisteínas que se encuentran formando un enlace disulfuro. Éstas se observan por la correlación entre los protones β de las cisteínas. Se pudo confirmar que los puentes disulfuro entre las cisteínas de la mutante fueron los esperados: C_3-C_{21} , C_8-C_{26} , $C_{12}-C_{28}$.

En la Figura 5.11 se observa la conectividad de C_8-C_{26} . Se muestra la correlación entre $H_{\beta 3}$ de C_{26} y $H_{\beta 2}$ de C_8 .

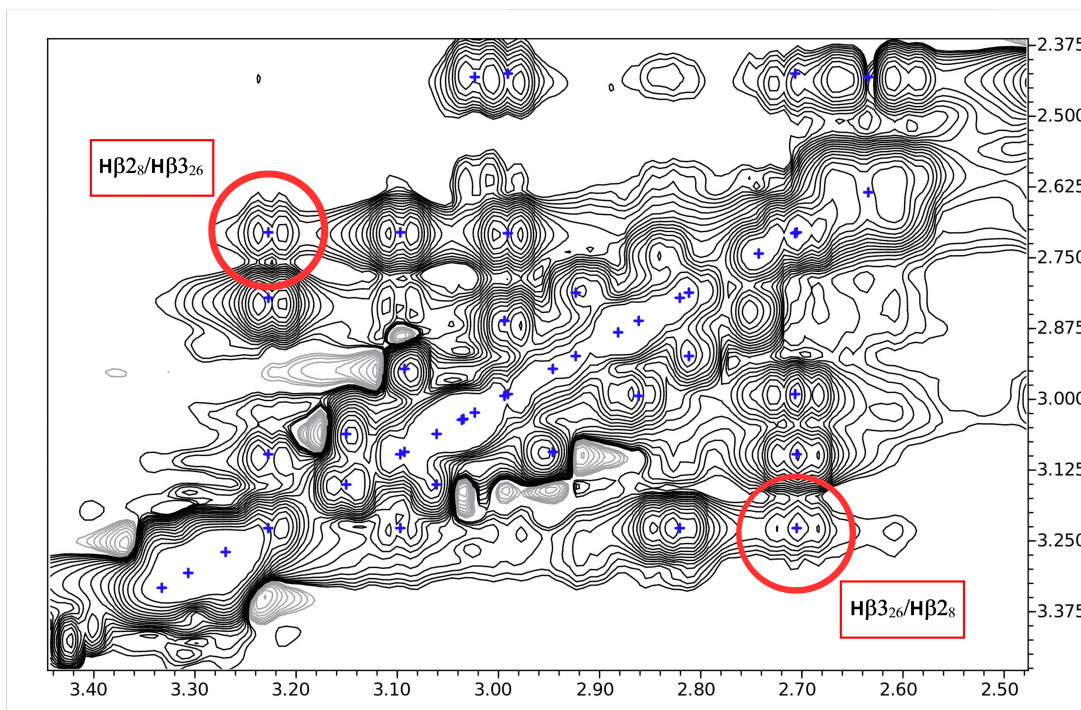


Fig. 5.11: Experimento NOESY 300 ms. Interacciones de los protones β de las cisteínas 8 y 26 marcadas con un círculo rojo.

5.3.2. Cálculos de estructura

Se realizó la asignación del 98 % de los protones en los espectros para la mutante. Una vez concluida la asignación, se integraron las señales del experimento NOESY de 150 ms.

A partir de la integración se calculó la estructura tridimensional utilizando el programa de CYANA. Se calcularon 200 estructuras de las cuales fueron elegidas las mejores 20 que se muestran en la figura 5.12. Dichas estructuras no presentaron una violación mayor o igual a 0.5 Å. Las estadísticas y los datos del gráfico de Ramachandran de las estructuras generadas se muestran en el Apéndice B.

En el gráfico se obtuvieron 69.0 % de los ángulos diedros en regiones muy favorecidas, 31.0 % se encuentran en regiones permitidas, 0.0 % en regiones generosamente permitidas y 0.0 % en regiones desfavorables. Las estructuras se obtuvieron con un valor de RMSD de 0.17.

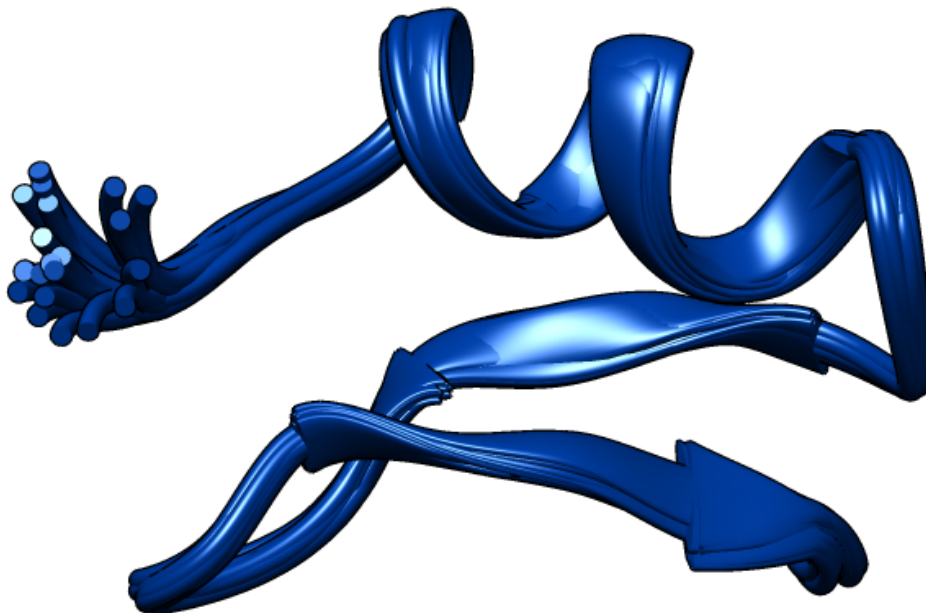


Fig. 5.12: Alineamiento de las 20 mejores estructuras obtenidas en el programa CYANA de la tamapina con las mutaciones E25K/K27E/P30K.

La determinación de la estructura parcial se puede obtener mediante un enfoque empírico para la identificación de estructuras secundarias regulares en cadenas polipeptídicas, que se basa en el reconocimiento de patrones distintos de NOEs [33].

En la Figura 5.13 se muestran las interacciones que ofrecen una primera predicción de los elementos de estructura secundaria presentes en la mutante. Las primeras 3 filas son distancias que se manifiestan en los NOEs secuenciales y el grosor de la línea es proporcional a la intensidad del NOE. Se observan las interacciones NOEs por cada residuo de la triple mutante E25K/K27E/P30K para sus protones.

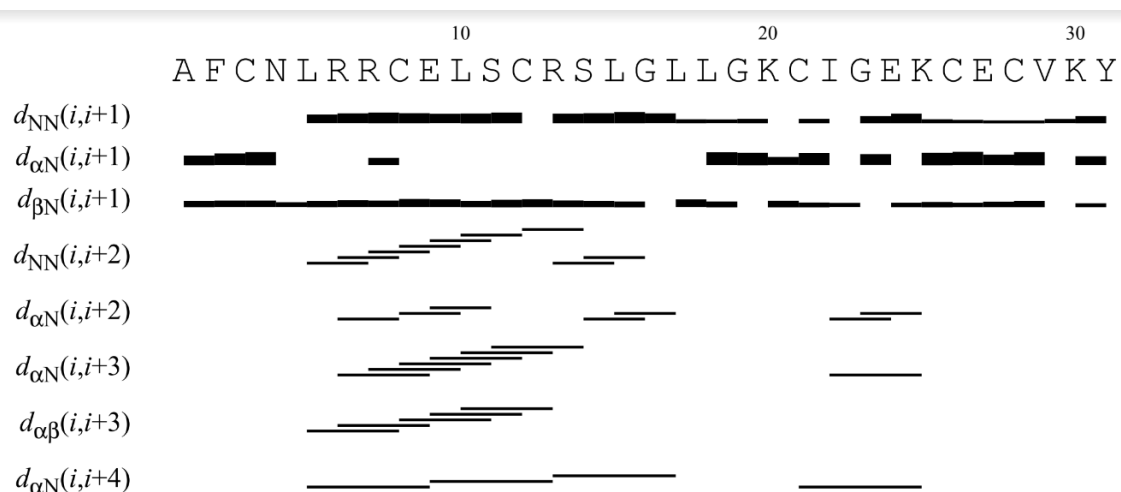
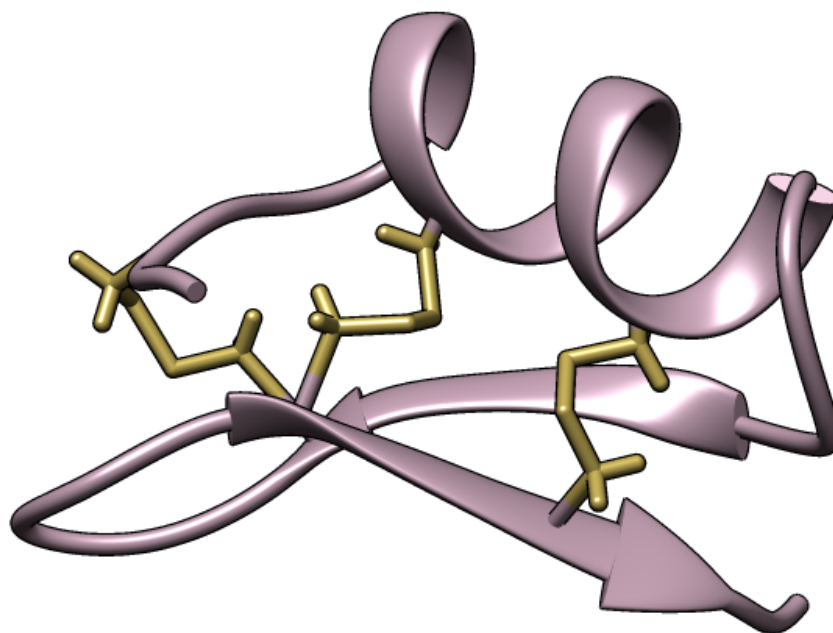


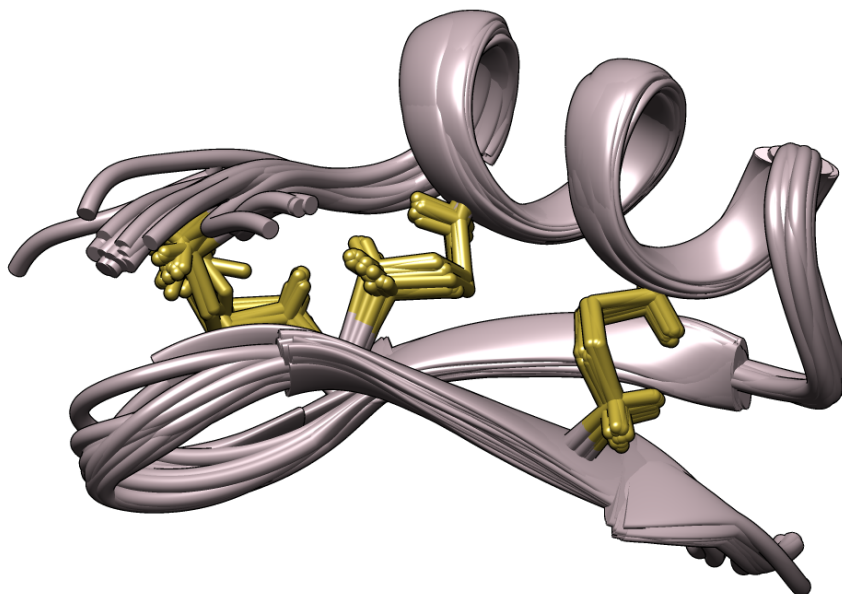
Fig. 5.13: Relaciones de las señales NOEs de las conectividades de la secuencia de la triple mutante E24K/K27E/P30K.

En la Figura 5.13 se corroboran las interacciones provocadas por el plegamiento esperado de la mutante.

Finalmente se realizó el afinamiento por dinámica molecular mediante el programa AMBER para las 20 estructuras calculadas por CYANA. En la figura 5.14 se muestra la estructura obtenida. La triple mutante conservó el motivo estructural tipo CS- α/β estabilizado por tres puentes disulfuro entre C₃-C₂₁, C₈-C₂₆ y C₁₂-C₂₈. que presenta la tamapina y la doble mutante E25K/K27E.

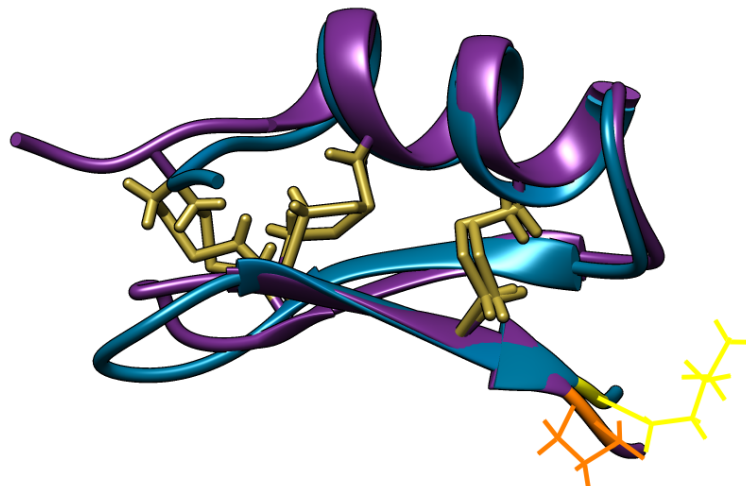


a) Estructura tridimensional de menor energía de la tamapina con las mutaciones E25K/K27E/P30K.

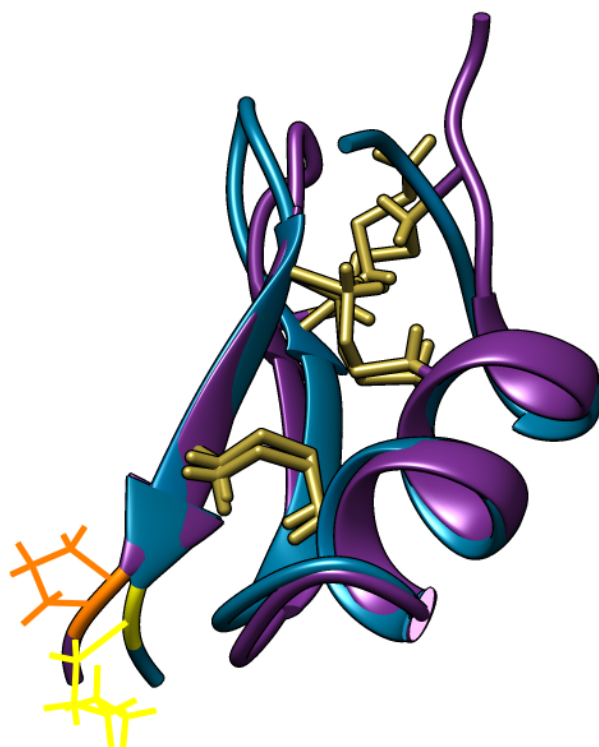


b) Alineamiento de las 20 estructuras afinadas mediante el programa AMBER de la tamapina con las mutaciones E25K/K27E/P30K.

Fig. 5.14: Estructura tridimensional afinada mediante el programa AMBER de la tamapina con las mutaciones E25K/K27E/P30K.



a) Alineamiento de la estructura tridimensional de la **dobles mutante E25K/K27E** y la **triple mutante E25K/K27E/P30K** de la tamapina.



b) En la **dobles mutante E25K/K27E** se muestra el residuo de **prolina** en la posición 30. En la **triple mutante E25K/K27E/P30K** se muestra el residuo de **lisina** en la posición 30.

Fig. 5.15: Comparación entre la estructura tridimensional de la **dobles mutante E25K/K27E** y la **triple mutante E25K/K27E/P30K** de la tamapina.

En la Figura 5.15 se muestra el alineamiento de las estructuras tridimensionales de la doble mutante **E25K/K27E** y la triple mutante **E25K/K27E/P30K**. Se observa que en las zonas con mayor similitud son los elementos de estructura secundaria. Es decir, la hélice α y las dos hebras β . En la figura antes mencionada, se señala el aminoácido 30 mutado en ambas proteínas. En el caso de la doble mutante se muestra de color naranja la prolina. En la triple mutante se muestra de color amarillo la lisina. De forma general se percibe que la mutación no generó cambios importantes. Sin embargo, en el C-terminal y el N-terminal se observan zonas de menor similitud, esto se atribuye a que son zonas altamente flexibles en las proteínas.

Conclusiones

Se realizó la producción heteróloga de la tamapina con las mutaciones E25K/K27E/P30K empleando como microorganismo huésped *E. coli*. Dicha proteína se obtuvo pura y estructurada.

Se obtuvieron cantidades suficientes de la triple mutante de la tamapina. Esto permitió determinar su estructura tridimensional mediante Resonancia Magnética Nuclear.

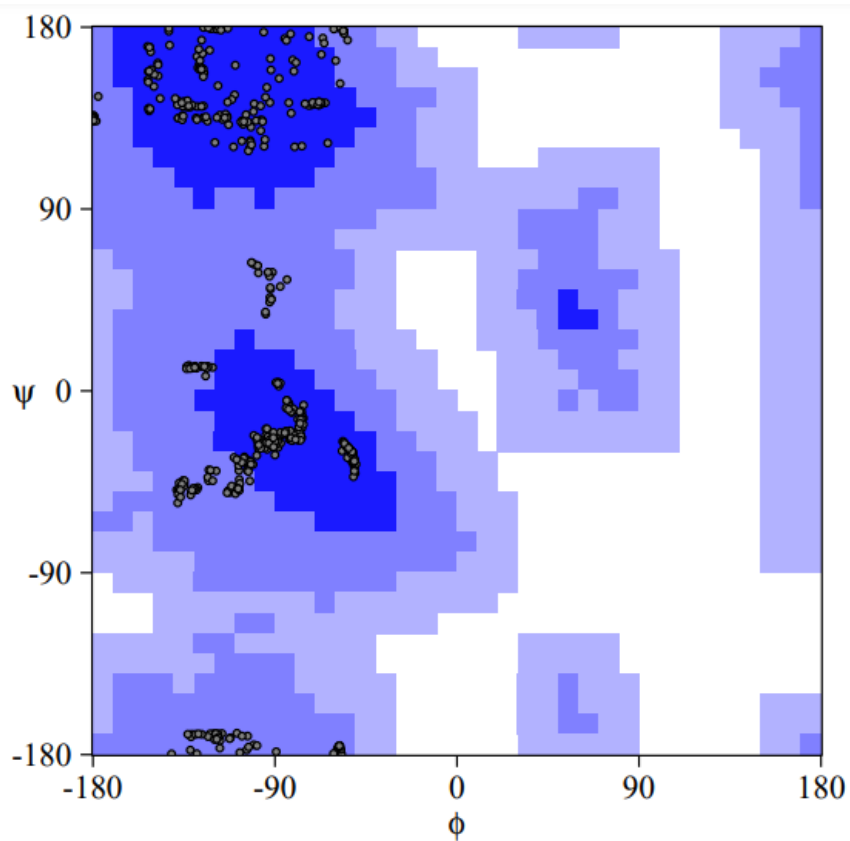
Al comparar la estructura de la doble mutante E25K/K27E con la triple mutante E25K/K27E/P30K se concluyó que esta última conservó el motivo estructural CS- α/β estabilizada por tres puentes disulfuro. Las diferencias entre ambas estructuras es un pequeño giro en el C-terminal y N-terminal.

Apéndices

Disoluciones

1. Medio LB (1 L)
 - 10 g de triptona.
 - 5 g de extracto de levadura
 - 10 g de NaCl
2. Solución amortiguadora de lisis
 - 300 mmol L⁻¹ NaCl
 - 20 mmol L⁻¹ Imidazol
 - 50 mmol L⁻¹ Tris/HCl pH=8
3. Solución amortiguadora de HiTrap (LH1)
 - 300 mmol L⁻¹ NaCl
 - 50 mmol L⁻¹ Imidazol
 - 50 mmol L⁻¹ Tris/HCl pH=8
4. Solución amortiguadora de elución (BE1)
 - 300 mmol L⁻¹ NaCl
 - 300 mmol L⁻¹ Imidazol
 - 50 mmol L⁻¹ Tris/HCl pH=8
5. Solución amortiguadora de elución 2 (BE2)
 - 300 mmol L⁻¹ NaCl
 - 500 mmol L⁻¹ Imidazol
 - 50 mmol L⁻¹ Tris/HCl pH=8
6. Solución amortiguadora de corte con TEV
 - 300 mmol L⁻¹ NaCl
 - 50 mmol L⁻¹ Tris/HCl pH=8
 - 5 mmol L⁻¹ MgCl₂
 - 5 % glicerol

Gráfico de Ramachandran



69.0% in most favored regions
31.0% in additionally allowed regions
0.0% in generously allowed regions
0.0% in disallowed regions

Fig. B.1: Gráfico de Ramachandran para las 20 estructuras calculadas por CYANA.

Referencias

- [1] P. Pedarzani, D. D'Hoedt, K. B. Doorty, J. D. Wadsworth, J. S. Joseph, K. Jeyaseelan, R. M. Kini, S. V. Gadre, S. M. Sapatnekar, M. Stocker y P. N. Strong. Tamapin, a venom peptide from the Indian red scorpion (*Mesobuthus tamulus*) that targets small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels and afterhyperpolarization currents in central neurons. *The Journal of biological chemistry*, **277**:46101-46109, 48, nov. de 2002. DOI: [10.1074/JBC.M206465200](https://doi.org/10.1074/JBC.M206465200) (citado en la pág. 1).
- [2] N. Andreotti, E. D. Luccio, F. Sampieri, M. D. Waard y J. M. Sabatier. Molecular modeling and docking simulations of scorpion toxins and related analogs on human SKCa2 and SKCa3 channels. *Peptides*, **26**:1095-1108, 7, jul. de 2005. DOI: [10.1016/J.PEPTIDES.2005.01.022](https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2005.01.022) (citado en la pág. 1).
- [3] B. Ramírez-Cordero, Y. Toledano, P. Cano-Sánchez, R. Hernández-López, D. Flores-Solis, A. L. Saucedo-Yáñez, I. Chávez-Uribe, L. G. Brieba y F. D. Río-Portilla. Cytotoxicity of recombinant tamapin and related toxin-like peptides on model cell lines. *Chemical Research in Toxicology*, **27**:960-967, 6, jun. de 2014. DOI: [10.1021/TX4004193/SUPPL_FILE/TX4004193_SI_001.PDF](https://doi.org/10.1021/TX4004193/SUPPL_FILE/TX4004193_SI_001.PDF) (citado en la pág. 1).
- [4] A. Chantome, A. Girault, M. Potier, C. Collin, P. Vaudin, J. C. Pagès, C. Vandier y V. Joulin. KCa2.3 channel-dependent hyperpolarization increases melanoma cell motility. *Experimental Cell Research*, **315**:3620-3630, 20, dic. de 2009. DOI: [10.1016/J.YEXCR.2009.07.021](https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2009.07.021) (citado en la pág. 2).
- [5] A. Girault, J.-P. Haelters, M. Potier-Cartereau, A. Chantome, P.-A. Jaffres, P. Bougnoux, V. Joulin y C. Vandier. Targeting SKCa Channels in Cancer: Potential New Therapeutic Approaches. *Current Medicinal Chemistry*, **19**:697-713, 5, ene. de 2012. DOI: [10.2174/092986712798992039](https://doi.org/10.2174/092986712798992039) (citado en la pág. 2).
- [6] M. Mayorga-Flores, A. Chantôme, C. M. Melchor-Meneses, I. Domingo, G. A. Titau-Delgado, R. Galindo-Murillo, C. Vandier y F. D. Río-Portilla. Novel Blocker of Onco SK3 Channels Derived from Scorpion Toxin Tamapin and Active against Migration of Cancer Cells. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, **11**:1627-1633, 8, 2020. DOI: [10.1021/acsmchemlett.0c00300](https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.0c00300) (citado en la pág. 2).
- [7] G. Litwack. *Human Biochemistry*. En Elsevier, ene. de 2017. Capítulo 4, páginas 63-94. ISBN: 9780123838643. DOI: [10.1016/C2009-0-63992-1](https://doi.org/10.1016/C2009-0-63992-1) (citado en la pág. 6).
- [8] H. Lodish, A. Berk, C. Kaiser, M. Krieger, A. Bretscher, H. Ploegh, A. Amon y K. Martin. *Molecular Cell Biology*. Katherine Ahr Parker, 8.ª edición, 2016, página 1170. ISBN: 978-0-12-813289-0 (citado en la pág. 6).

- [9] L. Skipper. PROTEINS | Overview. *Encyclopedia of Analytical Science: Second Edition*:344-352, ene. de 2005. DOI: [10.1016/B0-12-369397-7/00493-3](https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00493-3) (citado en la pág. 7).
- [10] Álvaro R. Lara. Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista mexicana de ingeniería química*, **10**:209-223, 2, 2011 (citado en las págs. 7, 8).
- [11] C. Langlais y B. Korn. Recombinant Protein Expression in Bacteria. *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine*:1609-1616, sep. de 2005. DOI: [10.1007/3-540-29623-9_4800](https://doi.org/10.1007/3-540-29623-9_4800) (citado en la pág. 8).
- [12] *pEt System Manual*. 11.^a edición. Novagen. 11.^a edición. 80 páginas (citado en la pág. 9).
- [13] G. J. Gopal y A. Kumar. Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Protein Journal*, **32**:419-425, 6, jul. de 2013. DOI: [10.1007/S10930-013-9502-5/FIGURES/2](https://doi.org/10.1007/S10930-013-9502-5/FIGURES/2) (citado en la pág. 9).
- [14] S. Senthilkumaran, M. Ramachandran y P. Thirumalaikolundusubramanian. Problems and Paradoxes of Animal Toxins and the Heart. *Heart and Toxins*:133-149, ene. de 2015. DOI: [10.1016/B978-0-12-416595-3.00004-9](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416595-3.00004-9) (citado en la pág. 9).
- [15] R. C. R. de la Vega, N. Vidal y L. D. Possani. *Scorpion Peptides*. En Academic Press, ene. de 2013. Capítulo 9. Two-Dimensional NMR Spectroscopy: HETCOR, COSY, and TOCSY, páginas 423-429. ISBN: 9780123850959. DOI: [10.1016/B978-0-12-385095-9.00059-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385095-9.00059-2) (citado en la pág. 9).
- [16] J. I. Cid-Urbe, E. P. Meneses, C. V. Batista, E. Ortiz y L. D. Possani. Dissecting Toxicity: The Venom Gland Transcriptome and the Venom Proteome of the Highly Venomous Scorpion *Centruroides limpidus* (Karsch, 1879). *Toxins*, **11**, 5, mayo de 2019. DOI: [10.3390/TOXINS11050247](https://doi.org/10.3390/TOXINS11050247) (citado en la pág. 9).
- [17] A. Bartok, G. Panyi y Z. Varga. *Scorpion Venoms*. En Springer, Dordrecht, 2014. Capítulo 21 (citado en la pág. 10).
- [18] S. C. Hebert. General principles of the structure of ion channels. *American Journal of Medicine*, **104**:87-98, 1, ene. de 1998. DOI: [10.1016/S0002-9343\(97\)00358-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(97)00358-6) (citado en la pág. 11).
- [19] R. R. Crichton. *Sodium and Potassium—Channels and Pumps*. En Elsevier, ene. de 2008, páginas 151-164. DOI: [10.1016/b978-044452740-0.50009-0](https://doi.org/10.1016/b978-044452740-0.50009-0) (citado en la pág. 11).
- [20] M. Stocker. Ca²⁺-activated K⁺ channels: Molecular determinants and function of the SK family. *Nature Reviews Neuroscience*, **5**:758-770, 10, 2004. DOI: [10.1038/nrn1516](https://doi.org/10.1038/nrn1516) (citado en la pág. 12).
- [21] C. González, D. Baez-Nieto, I. Valencia, I. Oyarzún, P. Rojas, D. Naranjo y R. Latorre. K⁺ Channels: Function-Structural Overview. *Comprehensive Physiology*, **2**:2087-2149, 3, jul. de 2012. DOI: [10.1002/CPHY.C110047](https://doi.org/10.1002/CPHY.C110047) (citado en la pág. 12).
- [22] M. Urh, D. Simpson y K. Zhao. *Guide to Protein Purification, 2nd Edition*. En volumen 463. Academic Press, ene. de 2009. Capítulo 26 Affinity Chromatography: General Methods, páginas 417-438. DOI: [10.1016/S0076-6879\(09\)63026-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63026-3) (citado en la pág. 14).
- [23] A. Malhotra. Chapter 16 Tagging for Protein Expression. *Methods in Enzymology*, **463**:239-258, C, ene. de 2009. DOI: [10.1016/S0076-6879\(09\)63016-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63016-0) (citado en la pág. 14).

- [24] H. SchlüTer. *Protein Liquid Chromatography*. En volumen 61. Elsevier, ene. de 2000. Capítulo 4 Hydrophobic Interaction Chromatography, páginas 147-234. DOI: [10.1016/S0301-4770\(08\)60531-X](https://doi.org/10.1016/S0301-4770(08)60531-X) (citado en la pág. 15).
- [25] J. H. Gross. Introduction. *Mass Spectrometry*:1-28, 2017. DOI: [10.1007/978-3-319-54398-7_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-54398-7_1) (citado en la pág. 15).
- [26] G. Zhang, R. S. Annan, S. A. Carr y T. A. Neubert. Overview of peptide and protein analysis by mass spectrometry. *Current protocols in protein science*, **Chapter 16**, SUPPL.62, nov. de 2010. DOI: [10.1002/0471140864.PS1601S62](https://doi.org/10.1002/0471140864.PS1601S62) (citado en la pág. 15).
- [27] R. Fritsch e I. Krause. *ELECTROPHORESIS*. En Elsevier, ene. de 2003, páginas 2055-2062. DOI: [10.1016/B0-12-227055-X/01409-7](https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/01409-7) (citado en la pág. 16).
- [28] W. S. Price. *Spin dynamics: Basics of nuclear magnetic resonance, 2nd edition*. Volumen 34A. 2009, páginas 60-61. ISBN: 9780470511183. DOI: [10.1002/cmr.a.20130](https://doi.org/10.1002/cmr.a.20130) (citado en la pág. 18).
- [29] *Solving Problems with NMR Spectroscopy*. En Elsevier. Capítulo 6 - Nuclear Overhauser Effect, páginas 227-264. DOI: [10.1016/b978-0-12-411589-7.00006-1](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-411589-7.00006-1) (citado en la pág. 18).
- [30] G. Titau. *Sistemas de expresión para la obtención de toxinas ricas en enlaces disulfuro y su caracterización estructural por Resonancia Magnética Nuclar*, Universidad Nacional Autónoma de México, 2020, páginas 1-88 (citado en la pág. 19).
- [31] N. E. Jacobsen. *NMR Spectroscopy Explained: Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology*. En John Wiley & Sons, Inc., ago. de 2007. Capítulo 9 Two-Dimensional NMR Spectroscopy: HETCOR, COSY, and TOCSY, páginas 353-407. DOI: [10.1002/9780470173350.ch9](https://doi.org/10.1002/9780470173350.ch9) (citado en la pág. 20).
- [32] A. J. Edwards y D. Reid. Introduction to NMR of Proteins. *Current Protocols in Protein Science*, **19**:17.5.1-17.5.39, 1, mar. de 2000. DOI: [10.1002/0471140864.ps1705s19](https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1705s19) (citado en la pág. 20).
- [33] K. Wüthrich. NMR Studies of Structure and Function of Biological Macromolecules (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, **42**:3340-3363, 29, jul. de 2003. DOI: [10.1002/ANIE.200300595](https://doi.org/10.1002/ANIE.200300595) (citado en la pág. 42).