



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA

Expresión, purificación y caracterización por Resonancia Magnética Nuclear de la doble mutante Y20K, Q32Y de la defensina 1 del alacrán  
*Centruroides limpidus limpidus*

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA

PRESENTA

Fátima Carolina Escobedo González

MÉXICO, D.F.

AÑO 2015





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.



## JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Profesor: Francisco Rojo Callejas
VOCAL:	Profesor: Rogelio Rodríguez Sotres
SECRETARIO:	Profesor: José Federico del Río Portilla
1er. SUPLENTE:	Profesor: Nuria Esturau Escofet
2° SUPLENTE:	Profesor: Luis Tonatihut Sanchez Linares

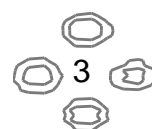
SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio 1, departamento de Química de Biomacromoléculas, Instituto de Química Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DEL TEMA: José Federico del Río Portilla

SUSTENTANTE: Fátima Carolina Escobedo González

## Lista de abreviaturas por orden alfabético

$1H\alpha$	Protón de alfa de un aminoácido.
$1H\beta$	Protón beta en la cadena lateral de un aminoácido.
$1HN$	Protón de amida de un aminoácido.
ACN	Acetonitrilo.
$B_0$	Intensidad del campo magnético.
BL21	Cepa de E. Coli BL21
CAMQ	Cromatografía de afinidad metal quelato.
COSY	Correlated Spectroscopy. (Espectroscopia de correlación)
CS- $\alpha/\beta$	Motivo estructural $\alpha/\beta$ estabilizado por cisteínas.
DEF1	Defensina 1
$\delta$	Desplazamiento químico.
DNA	Ácido DesoxirriboNucleico.
E. Coli	Escherichia coli.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
$\gamma$	Constante giromagnética.
IPTG	Isopropil-tio- $\beta$ -galcto-piranósido.
kDa	Kilo Dalton; Da = 1g/mol
KTx	Toxina bloqueadora de canales iónicos de potasio.
/	Número cuántico de momento angular o espín nuclear.
LB	Luria Bertani.
M1D1	Mutante Y20K de la defensina 1.
M2D1	Doble mutante de la defensina 1. (Mutante Y20K, Q32Y)
M3D1	Mutante tres de la defensina 1 (Mutante Y20K, Q32Y, IQY $\Delta$ (24-26))



MALDI-TOF	Matriz Assisted Laser Desorption-Ionization/time of flight( Desorción Ionización Láser Asistida por Matriz con detector de Tiempo de Vuelo )
$\mu$	Número cuántico magnético.
PDB	Protein Data Bank.
PF	Proteína de fusión.
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
ppm	Partes por millón.
rpm	Revoluciones por minuto.
RMN	Resonancia Magnética Nuclear.
RMSD	Root Mean Square Deviation.
RNA	Ácido Ribonucleico.
SDS	Dodecilsulfato de sodio.
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis.
TFA	Ácido Trifluoroacético.
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy (Espectroscopia de correlación total).
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano.
NOE	Efecto Nuclear Overhauser.
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (Espectroscopia del efecto nuclear Overhauser).

## *Índice*

Resumen	6
Introducción	7
Objetivos	9
Hipótesis	9
Marco teórico	10
• Aminoácidos	10
• Proteínas	11
• Defensinas	15
• Toxinas bloqueadoras de canales iónicos	21
• Resonancia magnética nuclear de proteínas.	28
Metodología	31
Resultados y discusión	37
Conclusiones	55
Perspectivas	55
Bibliografía	56
Anexo	58
Estructura, clasificación y sistema de espines de los aminoácidos proteicos.	
59	
Geles de cinéticas de expresión	62

## Resumen

Las defensinas son péptidos antimicrobianos de bajo peso molecular presentes en el sistema inmune de diversos organismos. La defensina 1 (Def1) fue aislada de la hemolinfa del alacrán *Centruroides limpidus limpidus*. Al determinar su estructura terciaria se encontraron similitudes entre ésta y la de toxinas bloqueadoras de canales de potasio. Ambas conservan un motivo estructural compuesto por una hélice  $\alpha$  y una hoja  $\beta$ , estabilizado mediante tres puentes disulfuro. Este hecho lleva a establecer la hipótesis de que existe una relación filogenética entre defensinas y toxinas bloqueadoras de canales de potasio.

El presente trabajo forma parte de una investigación cuyo objetivo general es corroborar dicha hipótesis establecida por diversos autores, para lo cual se realizaron sobre la secuencia primaria de la Def1 dos mutaciones puntuales y una deleción, con el objetivo de obtener un péptido tipo defensina que presente actividad biológica como toxina selectiva a canales de potasio, corroborando así la relación evolutiva entre ambas.

Se describe a continuación los procesos de biosíntesis para la obtención en forma recombinante de la proteína de fusión que contiene una de las mutantes de la Defensina1, la purificación de la proteína de interés utilizando diversas técnicas cromatográficas como son cromatografía de afinidad metal-quelato y cromatografía de líquidos de alta eficiencia y la caracterización mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF).

Se realizó la caracterización estructural del péptido purificado mediante la interpretación de experimentos bidimensionales de RMN logrando obtener la estructura terciaria de la segunda mutante de la defensina 1. Conservando el mismo motivo estructural presente en la defensina 1 y mutante 3.

## Introducción

Debido al uso inadecuado de fármacos antimicrobianos durante el siglo XXI, han surgido agentes patógenos resistentes a antibióticos convencionales. Esto representa un problema de salud mundial, debido a que se requiere un prolongado tiempo de tratamiento lo que conlleva un aumento en los costos. <sup>[1,2]</sup> Al limitar las opciones terapéuticas para combatir las enfermedades infecciosas causadas por dichas bacterias farmacoresistentes, se eleva la tasa de mortalidad, por lo que es de vital importancia el desarrollo, descubrimiento y estudio de nuevos agentes antimicrobianos. <sup>[1,2]</sup>

Los péptidos antimicrobianos son componentes esenciales del sistema inmune en una amplia gama de especies incluyendo artrópodos, anfibios, insectos, plantas y seres humanos;<sup>[1]</sup> pueden ser empleados como alternativa para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por bacterianas resistentes. Así mismo, presentan actividad antimicrobiana contra bacterias, hongos, virus o parásitos. Los péptidos antimicrobianos han sido investigados y considerados como una importante alternativa para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos debido a su amplio espectro de actividad y el bajo potencial para inducir resistencia. Por lo general, estos péptidos actúan sobre las membranas bacterianas y moléculas intracelulares de varias vías de señalización por lo que se sugiere que esto dificultaría a los agentes patógenos la generación de resistencia al tratamiento terapéutico. <sup>[1]</sup>

Están constituidos por menos de 100 aminoácidos. Las dos principales subfamilias de péptidos antimicrobianos son defensinas y catelicidinas. Las defensinas son la subfamilia más ampliamente distribuida en la naturaleza. <sup>[3]</sup>

Particularmente, en el veneno y hemolinfa de los alacranes se han identificado una diversidad de péptidos bioactivos útiles en el diseño y desarrollo de nuevos fármacos. Se ha propuesto que la presencia de péptidos antimicrobianos podría desempeñar la función de protección de la glándula del veneno contra infecciones o potencializar de la acción de toxinas. <sup>[1]</sup>

Se ha observado que las defensinas de insecto y las toxinas bloqueadoras de canales de potasio presentes en el veneno del alacrán tienen una estructura tridimensional conservada; basándose en dicha similitud estructural, diversos autores sugieren la existencia de una relación filogenética entre ambas, estableciendo que las toxinas y defensinas podrían compartir un ancestro común o incluso que las toxinas pudiesen haber surgido como resultado de la evolución de defensinas.<sup>[4,5,6]</sup>

Para corroborar dicha hipótesis se pretende realizar mutaciones específicas para obtener a partir de un péptido tipo defensina otro que conserve el motivo estructural característico y presente así mismo actividad como toxina. Dicha investigación proveerá un sistema ideal para estudiar como pudo haber ocurrido la evolución funcional.





La resonancia magnética nuclear es una técnica espectroscópica utilizada para la determinación estructural de proteínas y otras moléculas de importancia biológica. Se emplea cuando se presentan dificultades para el análisis mediante difracción en rayos X. En los últimos años la resonancia magnética nuclear se ha empleado para conocer la estructura en disolución acuosa de una inmensa variedad de moléculas.<sup>[6]</sup>

### Objetivos

- Objetivo general.

Producir de manera recombinante y realizar la caracterización estructural mediante Resonancia Magnética Nuclear bidimensional de la mutante 2 de la Defensina 1 (M2Def1).

- Objetivos Particulares.

Bioproducir en un sistema heterólogo la M2Def1.

Optimizar las condiciones de expresión en un sistema bacteriano (cepa, temperatura y tiempo).

Purificar la proteína biosintetizada mediante cromatografía de afinidad metal-quelato y cromatografía de líquidos de alta eficiencia en fase reversa.

Optimizar los procesos de purificación.

Realizar y optimizar la proteólisis enzimática de la proteína de fusión para la obtención del péptido de interés.

Obtener, procesar e interpretar los espectros de RMN mono- y bidimensionales de la M2Def1.

Realizar cálculos computacionales con las restricciones obtenidas a partir de los experimentos de RMN.

Obtener la estructura terciaria de la M2Def1.

### Hipótesis

Las mutaciones Y20K y Q32Y sobre la secuencia primaria de la defensina 1 (Def1) no afectarán la estructura terciaria del péptido. Por lo que la M2Def1 conservará el motivo estructural CS- $\alpha/\beta$  observado en la Def1 y la mutante 3 de la defensina 1 (M3Def1).

## Marco teórico

Las proteínas son las macromoléculas biológicas más abundantes, versátiles y diversas, desempeñan un papel fundamental para la vida. Son imprescindibles para el crecimiento y desarrollo de los organismos vivos ya que de su presencia y/o actividad dependen todos los procesos biológicos.<sup>[7]</sup> Las proteínas son polímeros de aminoácidos unidos covalentemente mediante enlaces peptídicos, debido a que los aminoácidos son las unidades que conforman las proteínas se mencionará en primer lugar su estructura y propiedades.

- Aminoácidos

Los aminoácidos predominantes en la naturaleza son los alfa aminoácidos de los cuales 20 de ellos, denominados aminoácidos proteicos, conforman la mayoría de las proteínas presentes en la naturaleza. <sup>[8]</sup>

Con excepción de la prolina todos los aminoácidos principales poseen la misma estructura general: consiste en un carbono alfa al que se encuentran unidos un grupo carboxilo (-COOH), un grupo amino (-NH<sub>2</sub>), un átomo de Hidrógeno (-H) y una cadena lateral (-R), la cual es característica para cada aminoácido y le confiere sus propiedades características, que permite clasificarlos con base en ellas como aminoácidos polares, apolares, básicos, ácidos etc. (anexo) <sup>[9]</sup>

Los aminoácidos protéicos, exceptuando la glicina, son moléculas quirales cuyo centro asimétrico es el carbono alfa, lo cual quiere decir que son ópticamente activos y existen dos estereoisómeros el dextrógiro D y el levógiro L; sin embargo, en la naturaleza el isómero óptico que se encuentra formando las proteínas es el enantiómero L cuya configuración absoluta es S. <sup>[8]</sup>

Los aminoácidos poseen regiones con cargas eléctricas positiva y negativas debido a la disociación en medios biológicos y soluciones acuosas de los grupos ácidos y básicos de la molécula, por lo que se dice que los aminoácidos son iones bipolares o *zwitteriones*. Por lo anterior, las propiedades eléctricas de los aminoácidos dependerán del pH de la disolución en la que se encuentren. Hay un valor de pH característico para cada aminoácido en el cual la disociación de cargas positivas y negativas se iguala, por lo que la carga total del aminoácido es neutra; a este valor de pH se le denomina punto isoeléctrico (pI o pHi).<sup>[9]</sup>

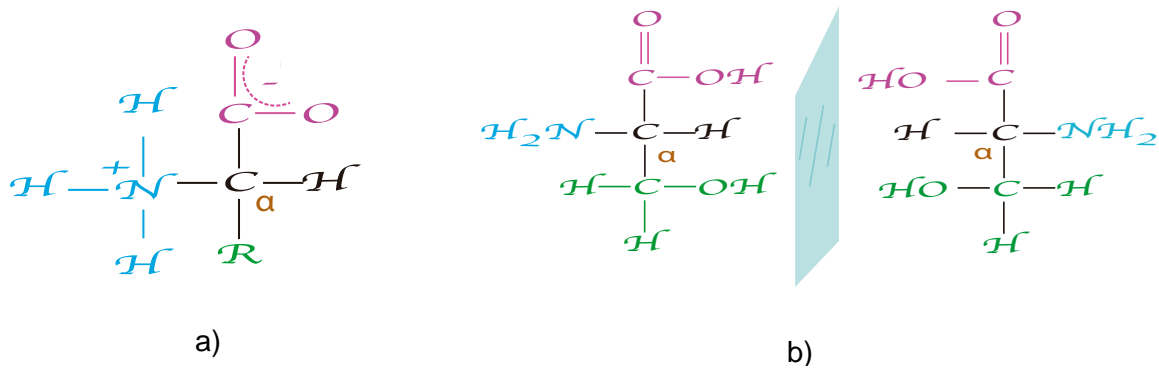


Figura 2.0. a) Forma zwitterionica general de un aminoácido b) Estereoisómeros L y D del aminoácido serína.

• Proteínas

Los aminoácidos establecen entre el grupo carbonilo de uno y el nitrógeno del grupo alfa amino de otro enlaces covalentes tipo amida. Este enlace conocido como peptídico se produce con pérdida de agua ( -H del grupo amino y -OH de grupo carboxilo) por lo que las unidades que conforman el polímero se denominan residuos de aminoácidos); al producto de dicho enlace se le denomina dipéptido. Es posible adicionar a este unidades aminoacidicas con el mismo tipo de unión hasta formar polipéptidos (polímeros formados por más de

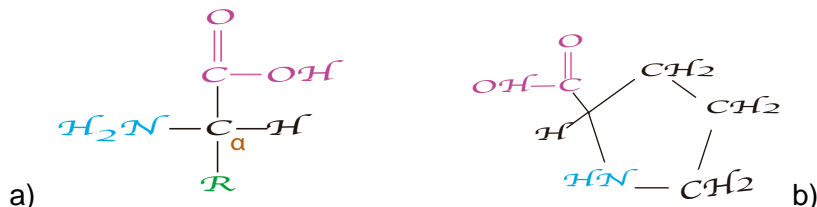


Figura 1. a) Estructura general de un α-aminoácido b) Estructura del aminoácido cíclico prolina.

10 residuos de aminoácidos) o proteínas, cuando la cadena polipeptídica se conforma por más de 50 residuos de aminoácidos aproximadamente.<sup>[8]</sup>

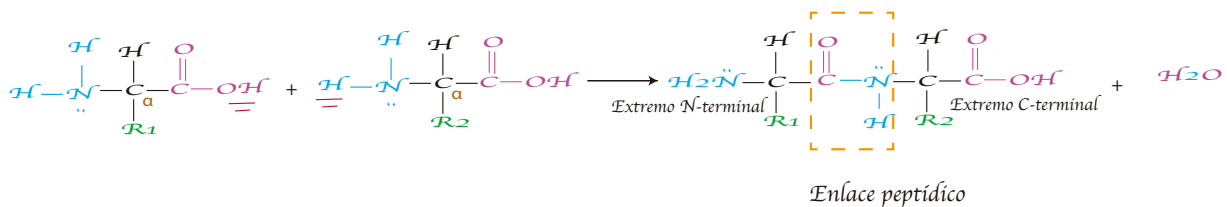


Figura 2.1. Formación del enlace peptídico.

El enlace peptídico posee un carácter intermedio entre un enlace simple y uno doble lo cual impide la rotación libre a los átomos C y N. Sin embargo, los

enlaces de los carbonos alfa ( $C\alpha-C=O$  y  $N-C\alpha$ ) son sencillos permitiendo el libre movimiento a través de los ángulos de rotación  $\Psi$  (psi) y  $\Phi$  (phi), respectivamente.<sup>[9]</sup>

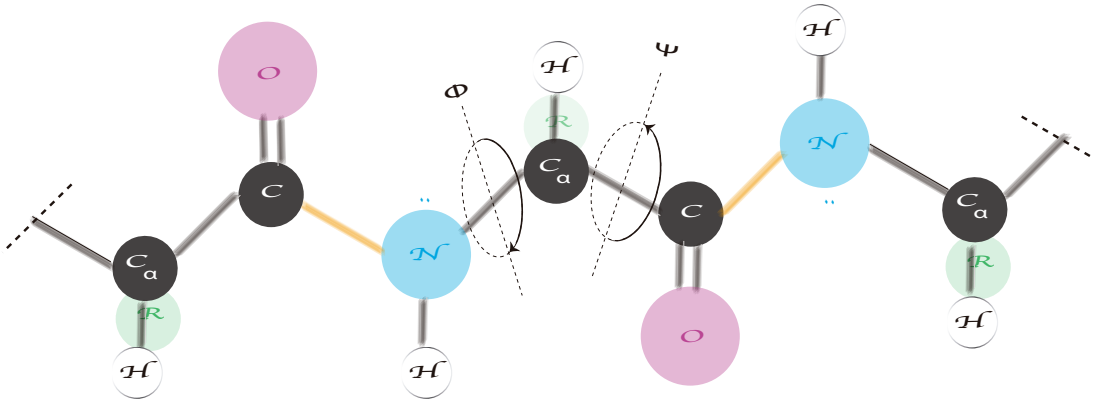


Figura 2.2. En uniones peptídicas los enlaces del carbono alfa presentan libre rotación a través de los ángulos de torsión  $\Psi$  y  $\Phi$ .

La mayoría de las cadenas polipeptídicas tienen un extremo en el cual queda un aminoácido con su grupo alfa amino libre, por convención se considera a éste el comienzo de la cadena y se le denominado extremo amino-terminal o N-terminal. El fin de la cadena es el extremo que posee el grupo carbonilo libre carbonilo-terminal o C-terminal.<sup>[9]</sup>

Las propiedades ácido-base de los péptidos están determinados por los grupos N- y C- terminales así como por los grupos ionizables de las cadenas laterales de sus residuos aminoácidos. Los péptidos al igual que los aminoácidos aislados poseen un  $pI$ .<sup>[9]</sup>

Debido a su participación en prácticamente todos los procesos biológicos en la naturaleza, las proteínas ocupan uno de los lugares de mayor importancia entre las biomoléculas. Entre la enorme variedad de funciones a ellas asignadas destacan:

Estructural (colágeno, queratina) , reguladora de actividad celular (hormonas como la insulina), de transporte (hemoglobina), acciones de defensa natural (anticuerpo), catalizador biológico (enzimas como pepsina), contráctil (por ejemplo la actina).<sup>[10]</sup>

La actividad que exhibe cada proteína depende de los residuos de aminoácidos que las constituyen, del ordenamiento y conformación espacial que adoptan. Cada proteína puede estudiarse a partir de cuatro niveles estructurales:

Estructura primaria. Se refiere al número e identidad de aminoácidos que componen la cadena peptídica, así como al orden de estos en la secuencia lineal, comenzando por el extremo amino terminal hasta el extremo carbonilo terminal. <sup>[8,9]</sup>

Estructura secundaria. Fragmentos locales de la cadena peptídica puede adoptar una disposición espacial definida y estabilizadas mediante interacciones no covalentes por ejemplo puentes de hidrógeno, formados por la interacción entre el H unido al N de un grupo amina y el O de un grupo carbonilo) a este ordenamiento específico se le conoce como estructura secundaria. En general, se tiende a adoptar la orientación espacial termodinámicamente más favorable. Ejemplo de este nivel estructural son las hélices alfa y hebras beta, ciertas combinaciones de aminoácidos favorecen o dificultan la formación de estos motivos estructurales por lo que su presencia depende directamente de la estructura primaria.<sup>[8,9]</sup>

Dentro de la estructura secundaria se puede encontrar zonas que no posean una estructura regular en cuyo caso se habla de distensión o enrollamiento al azar.

Estructura terciaria. En una misma molécula pueden encontrarse distintos tipos de estructura secundaria, la disposición tridimensional global del conjunto de estructuras secundarias y cadenas laterales hidrofóbicas o hidrofílicas de la proteína, así como de las fuerzas estabilizantes fuerzas de atracción o repulsión electrostática, fuerzas de Van der Waals, puentes salinos y puentes disulfuro (enlaces covalentes formados entre los grupos sulfhidrilo de dos residuos de cisteína), se considera en la estructura terciaria.<sup>[8,9]</sup>

Estructura cuaternaria. Existen también proteínas oligoméricas formadas por más de una cadena polipeptídica. La estructura cuaternaria, se refiere a la disposición espacial de las subunidades, cadenas polipeptídicas individuales, que constituyen a estas moléculas compuestas.<sup>[8,9]</sup>

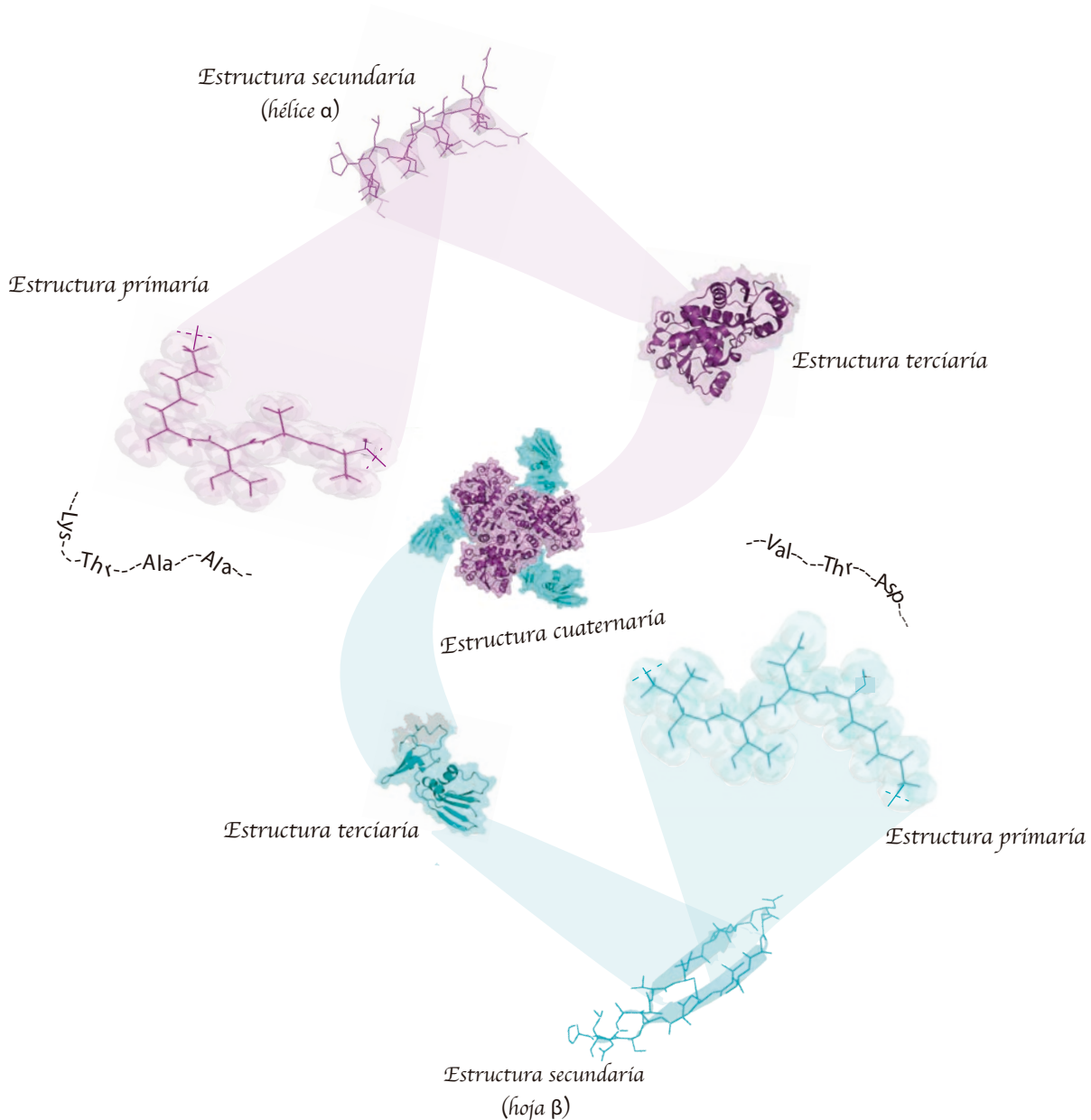


Figura2.2. Niveles estructurales protéicos.

La función biológica que desempeña una proteína es dependiente de su plegamiento, por lo que pequeños cambios en su estructura primaria podrían conllevar profundas modificaciones conformacionales y, por consiguiente, modificaciones en las propiedades exhibidas. [11]

Las moléculas proteicas no constituyen un conjunto rígido e indeformable; por el contrario, muestran flexibilidad. Por lo que es importante en el estudio de proteínas verificar que estas no adquieran un plegamiento defectuoso.

Cuando las proteínas son sometidas a cambios en pH, radiación, variaciones bruscas de temperatura o presión pueden sufrir alteraciones en su

conformación, lo que produce una disminución o pérdida de sus propiedades y funciones naturales. Esta variación en la conformación con pérdida de la actividad es denominado desnaturalización. La desnaturalización puede ser un proceso reversible, sí la desorganización molecular no conlleva algún otro proceso tal como la agregación u oxidación. La proteína podría recuperar su conformación original y actividad, al eliminar el agente desnaturalizante.<sup>[9,10]</sup>

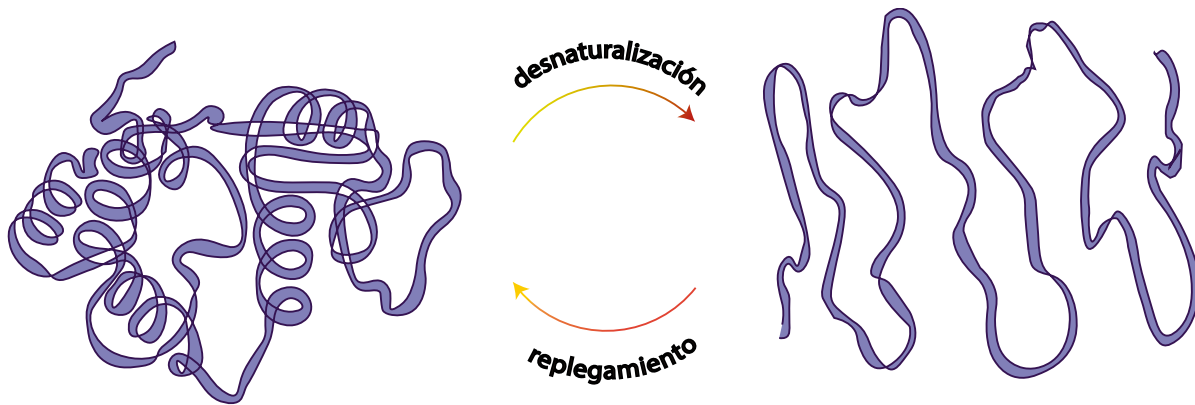


Figura 2.3. Desnaturalización y replegamiento protéico.

- Defensinas

Las sustancias antimicrobianas empleadas por el organismo huésped van desde productos químicos inorgánicos simples (por ejemplo, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, óxido nítrico) a relativamente complejos (péptidos y proteínas antimicrobianas).

Las péptidos antimicrobianos están ampliamente distribuidos en las superficies epiteliales de la mucosa, en los fluidos corporales y en los orgánulos de las células fagocíticas. Varían en tamaño, estructura y actividad, pero la mayoría son polipéptidos catiónicos (como complemento de la carga aniónica de superficies celulares microbianas) conformados por menos de 100 aminoácidos, presentan a concentraciones aproximadas de  $1-10 \mu\text{g mL}^{-1}$  actividad antimicrobiana contra bacterias gram positivas, gram negativas, micobacterias, hongos, virus envueltos e inclusive contra el virus de inmunodeficiencia humana.<sup>[12]</sup>

Las dos familias de péptidos antimicrobianos más importantes son las catelicidinas y defensinas. Sin embargo, las defensinas se encuentran más ampliamente distribuidas en la naturaleza, ya que están presentes en el sistema inmune de plantas, hongos, reptiles, insectos y mamíferos incluyendo los seres humanos.<sup>[13]</sup>

Su nombre se debe precisamente a el papel que desempeñan en la defensa del huésped contra infecciones microbianas. En general, las defensinas son péptidos antimicrobianos, catiónicos, ricos en cisteínas, estabilizados mediante enlaces disulfuro, lo cual contribuye a aumentar su resistencia a la proteólisis o



desnaturalización.<sup>[12]</sup>

- Modelos de acción propuestos para péptidos antimicrobianos

Existen varios mecanismos de acción propuestos para los péptidos antimicrobianos, incluyendo las defensinas, entre ellos están: 1) el modelo de la alfombra, 2) el modelo de barril, 3) modelo de poro toroidal y 4) el modelo de agregación. Esencialmente estos modelos sugieren que estos péptidos actúan sobre la membrana de las bacterias bajo la influencia de potenciales transmembranales de las células, formando canales en la membrana, ocasionándole con esto fugas y aumentando su permeabilidad. Este efecto, induce una despolarización de la membrana. Posteriormente, ocurre el agotamiento de ATP y la inhibición de la respiración celular, ocasionando la muerte celular. También, se sugieren otros mecanismos de acción tales como: la inhibición de determinadas actividades enzimáticas, la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, el deterioro de la síntesis de la pared celular, la inhibición de la síntesis de proteínas y la unión a ácidos nucleicos<sup>[3]</sup>

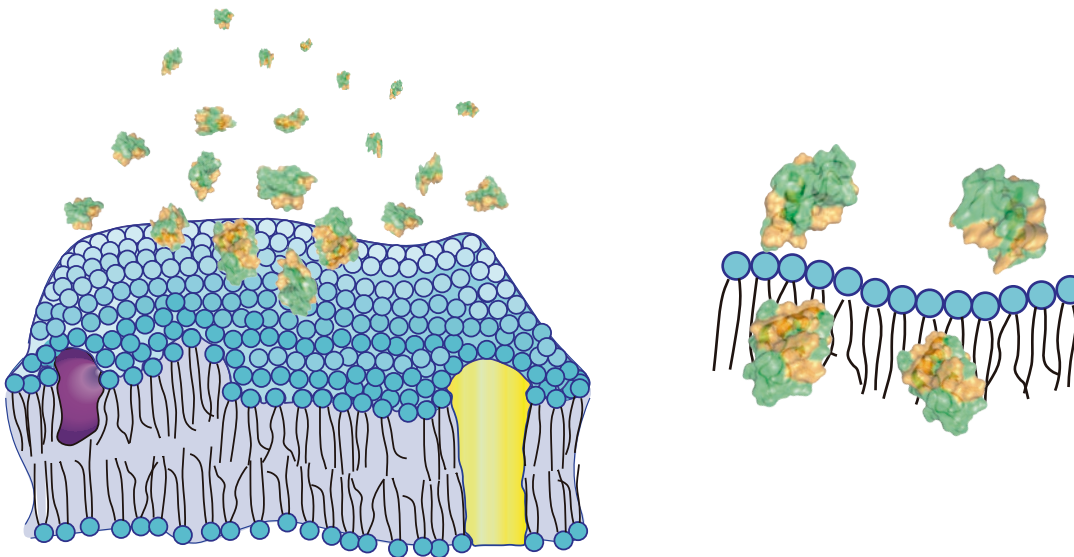


Figura 3. Interacción de péptidos antimicrobianos con la membrana celular. Etapa inicial compartida por los diversos modelos de acción propuestos para péptidos antimicrobianos.

### Modelo de la alfombra

En este modelo propuesto para algunos péptidos antimicrobianos, establece que los péptidos se distribuyen sobre la superficie de la membrana, cubriéndola hasta alcanzar una concentración límite. La formación de pequeñas micelas en la membrana provoca su colapso.<sup>[13,14]</sup>

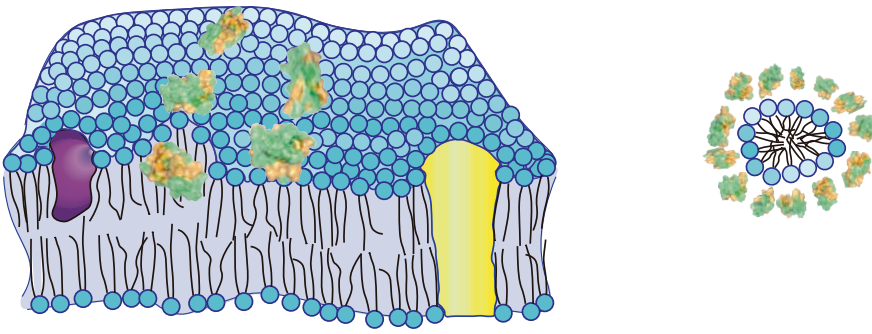


Figura 3.1 Distribución de péptidos antimicrobianos en la membrana celular provocando la formación de micelas.

Modelo de barril. De acuerdo con este modelo la muerte celular es el resultado de la pérdida de componentes intracelulares debido a la formación de un poro en forma de barril delimitado por los péptidos antimicrobianos, en el cual las cadenas laterales de los aminoácidos no polares entran en contacto con las colas alifáticas de los ácidos grasos al interior de la bicapa lipídica, mientras que las cadenas hidrofílicas quedan expuestas al disolvente.<sup>[13,14]</sup>

Modelo del poro toroidal. Este modelo es muy similar al modelo de barril. En este caso los péptidos antimicrobianos unidos a la membrana se agregan e inducen autoplegamientos en la capa lipídica, estabilizando la formación de poros por las interacciones hidrofóbicas entre las regiones apolares del péptido que envuelven a las cabezas de los lípidos de la membrana.<sup>[13,14]</sup>

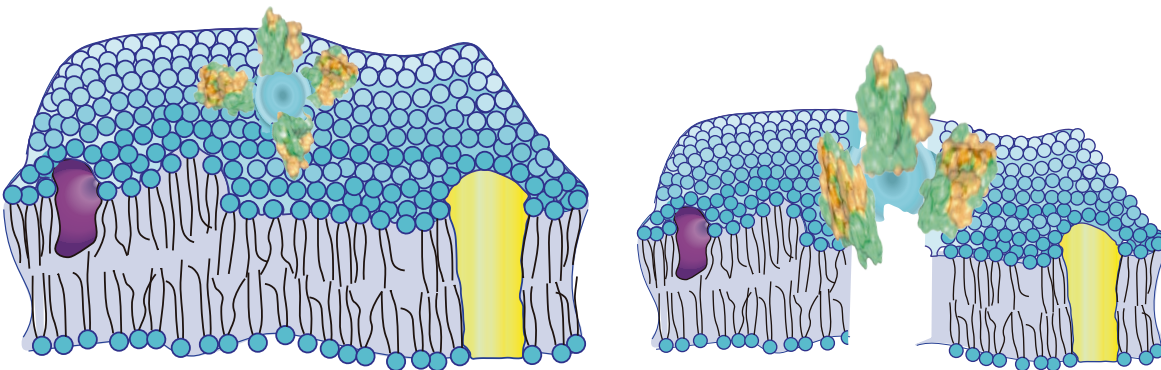


Figura 3.2. Inducción de la formación de un poro en la membrana celular por acción de péptidos antimicrobianos.

El modelo de agregación. En este modelos se propone que los péptidos antimicrobianos se orientan en el espacio de la membrana en forma de agregados, sin adquirir una orientación particular, y la muerte de las células bacterianas podría ser causada por la pérdida de moléculas pequeñas o por la translocación de los péptidos e inhibición de diversos blancos incluida la interferencia en la síntesis de proteínas.<sup>[13,14]</sup>

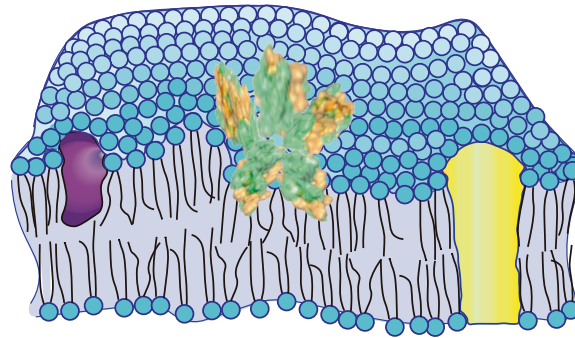


Figura 3.3. Formación de agregados peptídicos en la superficie de la membrana celular

En virus su actividad se debe a que algunas defensinas se unen a las glicoproteínas que conforman la cápside.

La actividad de las defensinas contra muchas bacterias y hongos se inhibe sustancialmente debido al aumento en la concentración de cationes como calcio y sodio probablemente por interferir en las interacciones electrostáticas no específicas entre las defensinas (catiónicas) y las membranas microbianas (aniónicas).<sup>[12]</sup>

- Clasificación de las defensinas

Dentro de la familia de defensinas se distinguen tres subfamilias presentes en vertebrados: alfa, beta y teta defensinas. Las cuales difieren entre sí en la longitud de los segmentos peptídicos entre los residuos de cisteínas, es decir, en la posición que ocupan dichos residuos en la secuencia primaria y en la conexión entre ellas mediante enlaces disulfuro.<sup>[16]</sup>

Tanto alfa como beta, defensinas se componen aproximadamente de 29- 45 residuos de aminoácidos, de los cuales, 6 son residuos de cisteínas. Tienen un motivo estructural distintivo compuesto por una hoja beta de triple hebra, difieren entre sí en la conectividad entre cisteínas y el motivo estructural de hélice alfa presente en la subfamilia beta.<sup>[16]</sup>

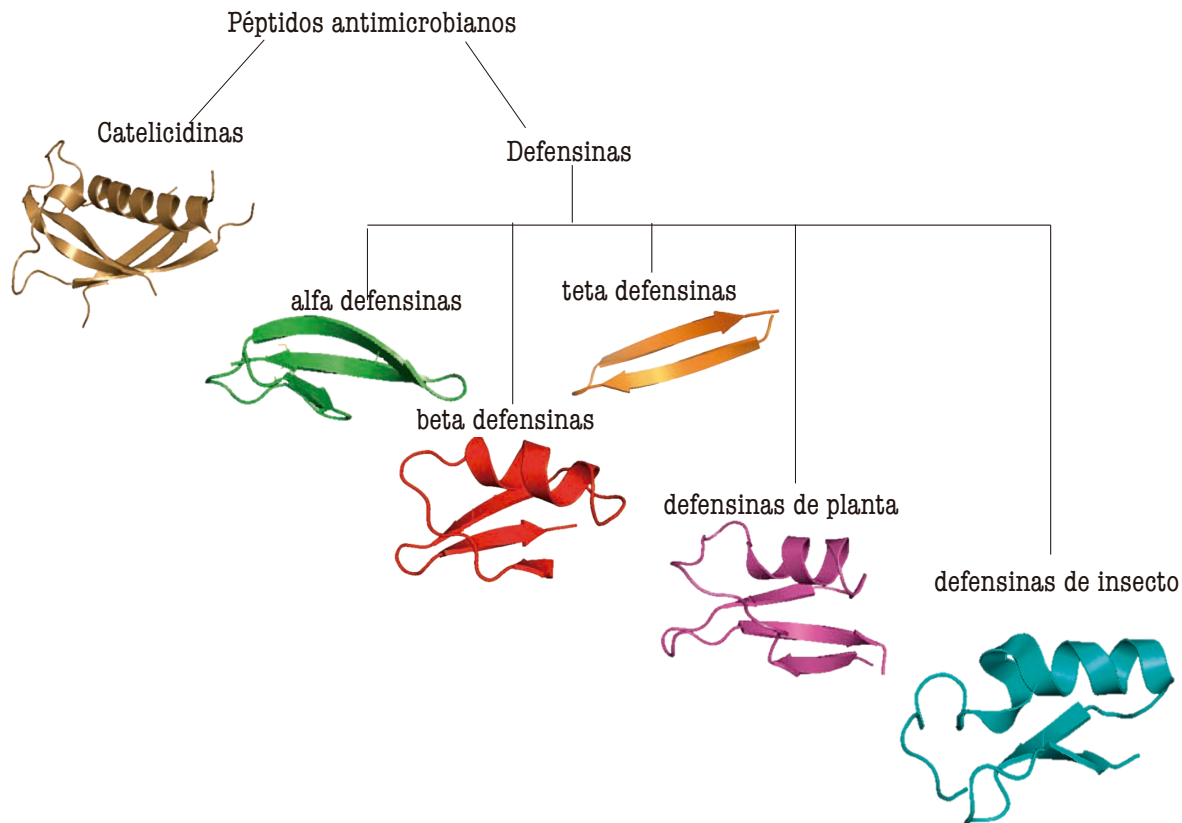


Figura 4. Clasificación y estructura de las dos principales familias de péptidos antimicrobianos.

Las alfa defensinas presentan la siguiente conectividad: Cys1–Cys6, Cys2–Cys4, Cys3–Cys5, mientras que las beta defensinas Cys1–Cys5, Cys2–Cys4, Cys3–Cys6.<sup>[5]</sup>

Las teta defensinas se han identificado en primates. Son péptidos cíclicos compuestos por 18 residuos de aminoácidos y cuya conectividad entre cisteínas es: Cys1–Cys6, Cys2–Cys5, Cys3–Cys6.<sup>[5]</sup>

Las defensinas de plantas e insectos difieren de las defensinas de vertebrados, pues éstas pueden contener seis o más residuos de cisteínas formando enlaces disulfuro.

Las defensinas de insectos se encuentran principalmente en su hemolinfa; presentan un motivo estructural formado por un asa en el extremo N terminal, una alfa hélice unida mediante 3 enlaces disulfuro a una hoja beta antiparalela. Este motivo estructural CS $\alpha$ / $\beta$  está asociado con la siguiente secuencia ...Cys1-... - Cys2- Xaa-Xaa-Xaa-Cys3-...-Gly-Xaa-Cys4-...-Cys5-Xaa-Cys 6 donde la Cys 2 y 3 se encuentran formando el alfa hélice, y se observa la siguiente conectividad entre cisteínas Cys1–Cys4, Cys2–Cys5, Cys3–Cys6<sup>[5]</sup>

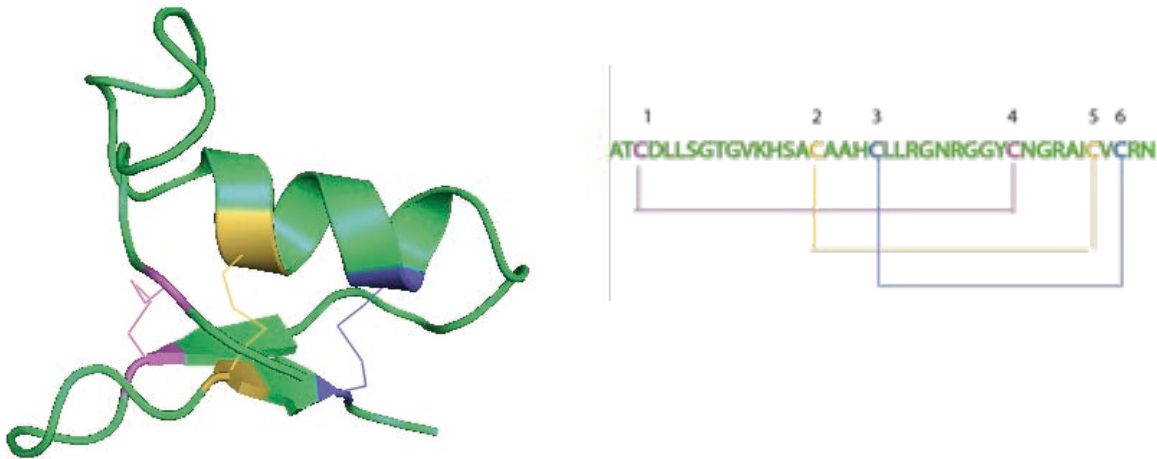


Figura 4.1 Estructura con enlaces disulfuro de una defensina de insecto PDB: defensinas 2LLD

Realizando una comparación entre estructuras de proteínas pequeñas se encontró que las toxinas bloqueadoras de canales de potasio presentan un plegamiento muy similar al de las defensinas de insectos.<sup>[17]</sup> Basándose en dichas similitudes, diversos autores han propuesto que las defensinas de insectos y las toxinas bloqueadoras de canales iónicos podrían tener un ancestro en común.<sup>[18]</sup>

La defensina 1 es un péptido de tipo inducido, aislado de la hemolinfa del alacrán *Centruroides limpidus limpidus*, un alacrán nativo de México que habita principalmente en el estado de Guerrero. Se encontró que su secuencia consta de 32 residuos de aminoácidos:

ACQFWSCNSSCISRGYRQGYCWGIQYKYCQCQ

y forma tres enlaces disulfuro del tipo Cys1-Cys4, Cys2-Cys5, Cys3-Cys6 característicos de las defensinas de insectos. Presenta actividad biológica contra *E. coli*, *B. subtilis*, *K. pneumoniae* y *S. aureus* a concentración de 20 µg/mL de péptido total. Al obtener su estructura terciaria mediante Resonancia Magnética Nuclear se observó que esta presenta un motivo estructural CS- $\alpha/\beta$  (Cysteine stabilized  $\alpha/\beta$ ).<sup>[19,20]</sup>

Comparando la secuencia primaria de la defensina 1 con las secuencias de toxinas de veneno, se encontró similitudes entre ambas. Por lo que se decidió realizar sobre ésta dos mutaciones puntuales y una delección que con la cual pudiese obtenerse un péptido tipo defensina con actividad de toxina bloqueadora de canales de potasio.<sup>[19]</sup>

La primera mutación M1D1[\*] consiste en cambiar una tirosina, un aminoácido de tipo aromático que se encuentra en la posición 20, por lisína la cual es un aminoácido cargado positivamente. La segunda mutación M2D1 consiste en cambiar glutamína, un aminoácido polar sin carga en la posición 32 por

tirosina, un aminoácido aromático. Con dichas mutaciones se cumple lo sugerido por la teoría de la diada funcional. Dando lugar así a la mutante 2 de la defensina 1 (M2D1), posteriormente se realizó una tercera mutación la mutante 3 de la defensina 1 (M3D1)<sup>[20]</sup> la cual consiste en una deleción de los aminoácidos IQY presentes en las posiciones 24-26. Estos tres aminoácidos forman una vuelta que que afecta el tamaño y forma del péptido y, por lo tanto, podría afectar la interacción con la cavidad del canal iónico.<sup>[19,20]</sup> Al realizar estas tres mutaciones se pretende obtener un péptido tipo defensina que presente actividad como toxina bloqueadora de canales iónicos de potasio.

- Toxinas bloqueadoras de canales iónicos

En el veneno de alacrán se encuentran una gran variedad de sustancias de las cuales sólo una pequeña parte son tóxicas. Entre las que se encuentran las toxinas de naturaleza proteica que puede llegar a afectar de manera letal para diversos organismos pluricelulares. Las toxinas pueden ser de cadena larga compuestas de 60 a 70 residuos de aminoácidos y las toxinas de cadena corta las cuales actúan selectivamente bloqueando a los canales iónicos.

Se clasifican dependiendo del canal iónico ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  ó  $\text{Ca}^{2+}$ ) al cual reconocen. Este tipo de toxinas se componen por 23-42 residuos de aminoácidos y ambas presentan un motivo estructural  $\text{C}\alpha/\beta$  similar al de las defensinas de insecto, estabilizado igualmente mediante 3 o 4 enlaces disulfuro.<sup>[22,23]</sup>



Figura 5. Estructura terciaria a) defensina de insecto PDB 1MM0 b) toxina bloqueadora de canales de potasio PDB 2KY3.

De las distintas toxinas bloqueadoras de canales iónicos, la familia KTx, (toxinas bloqueadoras de canales de potasio dependientes de voltaje) es la más extensa. Se conocen cuatro subfamilias: alfa-KTx ( $\alpha$ -KTx), beta-KTx ( $\beta$ -KTx), gamma-KTx ( $\gamma$ -KTx) y kappa-KTx ( $\kappa$ -KTx).

Estas toxinas afectan las funciones de los canales de potasio dependientes de voltaje KV de las membranas neuronales mediante la unión de éstas a los poros del canal para impedir el paso de iones de  $\text{K}^+$ .<sup>[17]</sup>

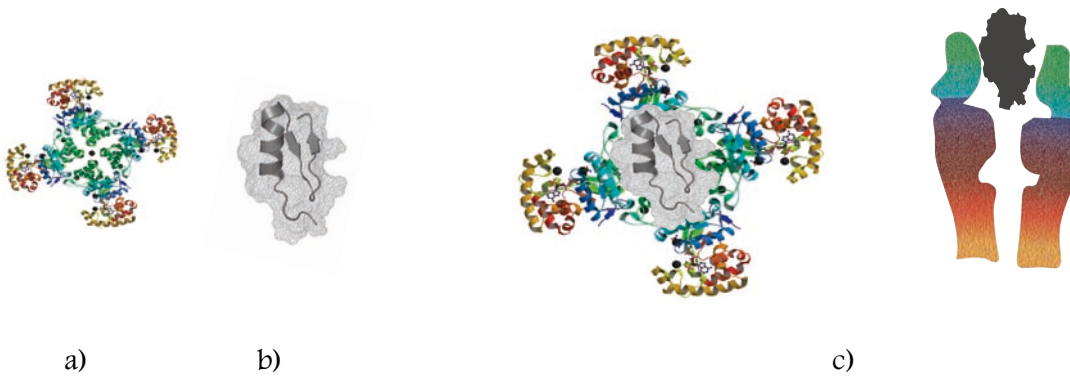


Figura 5.1. Mecanismo de acción de una toxina bloqueadora de canales de potasio a) canal de potasio b) toxina bloqueadora de canal de potasio c) Interacción toxina KTx-canal iónico KV.

Los canales iónicos representan una clase heterogénea de complejos protéicos oligoméricos responsables de la generación y mediación de señales de y entre membranas celulares. Suelen denominarse en función de la permeabilidad y selectividad a ciertos iones y responden a cambios de potencial en la membrana. A dichos canales le son atribuidas una gran variedad de funciones biológicas.<sup>[24]</sup>

Para el estudio filogenético entre defensinas y toxinas varias estructuras de defensinas han sido resueltas por RMN y por cristalografía de rayos x, aunque el uso de esta última técnica presenta dificultades ya que la mayoría de las defensinas son difíciles de cristalizar y las estructuras cristalinas obtenidas pueden estar compuestas por dímeros o multímeros; se desconoce si estas formas son biológicamente activas.<sup>[1]</sup>

A pesar de que las proteínas constituyen una gran fracción de la masa de todos los organismos, existen proteínas específicas como el caso de las toxinas y defensinas que se encuentran en una concentración muy baja en las células que las producen. Esto hace que su aislamiento de la fuente natural sea un proceso muy complicado y con un rendimiento muy bajo.<sup>[28]</sup>

Para facilitar su estudio se emplean técnicas de biología molecular, originado un método muy efectivo para facilitar y mejorar su producción. La técnica general consiste en aislar un gen que codifica para una proteína específica, insertarlo por medio de un vector (plásmido) a otro organismo (*sistema de expresión*) que puede ser una bacteria, levadura, célula de insecto o de mamífero el cual se hace crecer en condiciones adecuadas.<sup>[8]</sup>

A las proteínas expresadas en un organismo diferente al que las producen en condiciones naturales se le conoce como proteínas recombinantes.

## Purificación de proteínas

Existen una gran variedad de técnicas empleadas para la purificación de

complejas mezclas protéicas. Las técnicas cromatográficas son de las más empleadas puesto que permiten la purificación de péptidos y proteínas específicos, aprovechando las características físicas y químicas que estas poseen. Ejemplo de estas técnicas son la cromatografía de afinidad y la cromatografía de líquidos.

#### *Purificación de péptidos y proteínas mediante cromatografía de afinidad*

Este tipo de cromatografía aprovecha la capacidad de algunas proteínas de formar complejos con moléculas específicas, conocidas como ligandos (cofactor, anticuerpo o ion metálico). Los ligandos se encuentran inmóviles en la matriz cromatográfica, al hacer pasar una mezcla de proteínas a través de ésta, la proteína de interés se une específicamente al ligando mientras las sustancias que no presentan afinidad son eluidas de la columna. La proteína de interés puede posteriormente recuperarse de manera pura al variar las concentraciones de la solución amortiguadora de elución, el cuál debe presentar una mayor afinidad a la matriz que la que presentan las proteínas inmovilizados en ella.<sup>[6]</sup>

#### *Cromatografía de afinidad metal quelato*

Una de las grandes ventajas de emplear técnicas recombinantes en la síntesis de proteínas es que éstas pueden ser diseñadas con secuencias de residuos de aminoácidos específicas para facilitar su purificación. Estas secuencias son conocidas como etiquetas. Una de las etiquetas mayormente empleada es una secuencia de 6 histidinas que permite la purificación de proteínas mediante cromatografía de afinidad metal quelato, donde la coordinación entre los grupos imidazólicos presentes en las histidinas y los cationes metálicos tales como  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$  (previamente fijados a los grupos funcionales de la fase estacionaria de la columna) permiten la separación de la proteína o péptido de interés.

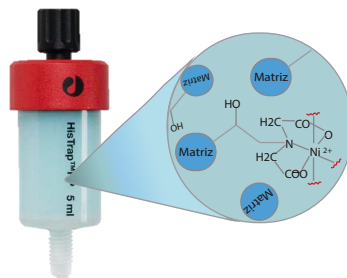


Figura 6. Resina funcionalizada con ácido iminodiacético de columna de afinidad metal quelato His Trap cargada con iones  $\text{Ni}^{2+}$  indicando los sitios de unión disponibles.

En la mezcla proteica pueden existir proteínas que presenten afinidad media a la columna y por tanto sean retenidas en ella, para eliminar dichas proteínas se hacen lavados con disoluciones de un agente que module su afinidad a la fase estacionaria por ejemplo el imidazol.

Los grupos coordinados al metal fijado a la fase estacionaria serán desplazados conforme se incrementa la concentración de imidazol. De igual manera se puede eluir el péptido de interés al hacer pasar una disolución de imidazol lo



suficientemente concentrada para que las histidinas coordinadas al metal sean desplazadas.

Purificación de péptidos y proteínas mediante cromatografía líquida.

Mediante el empleo de esta técnica cromatográfica de partición líquido-líquido podemos llevar a cabo de manera muy eficaz la purificación de un péptido que se encuentra en una mezcla proteica.

Comúnmente algunas proteínas de bajo peso molecular son purificadas por ésta técnica en ella se pueden usar una gran variedad de fases estacionarias, siendo una de las más comunes la fase reversa, cuya fase estacionaria se compone de partículas de sílice químicamente modificadas con hidrocarburos de diferentes tipos; una de ellas es por ejemplo la C18, que contienen una resina que posee una cadena lineal de 18 carbonos  $\text{SiO}_2\text{-(CH}_2\text{)}_{17}\text{-CH}_3$ .

En estas columnas la retención es inversamente proporcional al carácter polar, es decir, las sustancias polares no interaccionarán con la columna de fase reversa y eluirán primero que las sustancias menos polares las cuales presentan mayor afinidad.

Algunos de los disolventes comúnmente utilizados en la separación de proteínas por cromatografía en fase reversa son acetonitrilo, agua, acetato de etilo, acetona y alcoholes alifáticos.

Regularmente a los disolventes que conforman la fase móvil se les agrega ácido trifluoroacético (TFA), la adición tienen como objetivos ajustar el pH de la disolución a alrededor de 1.5 - 2, para neutralizar los grupos silano libres en la columna y neutralizar las cargas presentes en la proteína; para mejorar interacción con la fase estacionaria.

El empleo de sistemas de alta presión para la purificación de proteínas ha traído como resultado la purificación más eficiente de péptidos y proteínas.

Para evaluar la pureza de una proteína durante los procesos de aislamiento puede utilizarse la electroforesis.<sup>[33]</sup>

### Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Esta técnica se basa en la separación molecular por tamaño de iones por influencia de un campo eléctrico. La velocidad de migración depende de la fuerza del campo eléctrico aplicado, carga, tamaño y estructura de las moléculas a separar.

Al emplear geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, las muestras se encuentran disueltas en una solución amortiguadora de pH la cual contiene SDS, llamada buffer de carga, la mayor parte de las proteínas se encuentran cargadas negativamente por efecto del SDS; por lo que al aplicar el campo eléctrico, las proteínas migrarán hacia el cátodo. La migración de las

moléculas sólo depende de su peso molecular, por lo que las proteínas pequeñas viajarán más rápido que las de mayor tamaño ya que el movimiento de estas moléculas se halla impedido por la red de poliacrilamida.

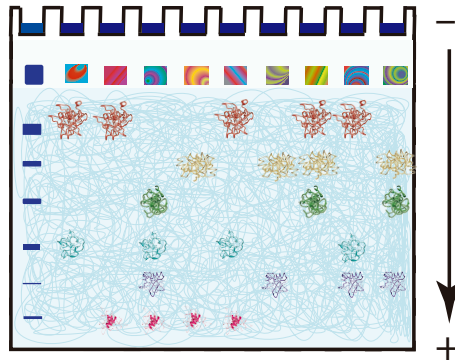


Figura 7. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE donde se muestra la separación de una mezcla proteica de acuerdo al peso molecular de las proteínas que la conforman.

- Determinación estructural de proteínas

Una vez purificada la proteína deseada es de interés obtener su estructura terciaria; ya que como se vió anteriormente de ella depende su función biológica.

En la actualidad se cuenta diversas técnicas analíticas que pueden emplearse para la determinación estructural de biomoléculas a nivel atómico, tales como la difracción por rayos X de monocristales y la RMN.

La cristalografía de rayos X es una técnica en la cual se expone un cristal de la molécula a un haz de rayos X monocromático y se registra la difracción consiguiente. Este mapa de difracción se analiza para determinar su estructura.

Sin embargo, algunas proteínas son muy difíciles de cristalizar por lo que en estos casos se opta por la determinación estructural mediante RMN.

- Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear<sup>[30]</sup>

La espectroscopia de RMN es una técnica empleada para el estudio estructural de una amplia gama de sistemas bioquímicos.

El estudio de la estructura molecular a través de la RMN es mediante la medición de la interacción de la materia con energía electromagnética en el rango de radiofrecuencias que se manifiesta en un campo magnético. Un espectro de RMN puede proveer información detallada acerca de la estructura molecular.

La RMN se basa en el momento angular de espín nuclear el cual se representa con el número cuántico  $I$  y puede tomar valores fraccionarios.

Los núcleos con espín nuclear al ser expuestos a un campo magnético externo tienden a orientarse preferentemente a favor del campo. Se dice que

el sistema se encuentra en resonancia cuando en este estado se le aplica energía a los núcleos de tal forma que estos invierten su orientación respecto al campo magnético. A este fenómeno en el cual se excitan los espines nucleares se le llama resonancia magnética nuclear.

Los núcleos más empleados RMN, tanto en moléculas orgánicas como en biomoléculas, son los isótopos  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  que tienen espín nuclear  $1/2$ , así como el  $^2\text{H}$  cuyo espín nucleares es igual a 1 por ejemplo: en el caso de los núcleos con espín  $1/2$  al ser sometidos a un campo magnético externo, algunos se orientaran a favor y otros en contra del campo.

Núcleo	Valor de espín nuclear	Abundancia natural %
$^1\text{H}$	$1/2$	99.99
$^{13}\text{C}$	$1/2$	1.1
$^{19}\text{F}$	$1/2$	100
$^{31}\text{P}$	$1/2$	100
$^{15}\text{N}$	$-1/2$	0.37

Tabla1. Isótopos mas usados en RMN y sus abundancias naturales

La energía asociada a estos dos niveles energéticos posibles está dado por la ecuación

$$E_m = -m\hbar\gamma B_0$$

donde  $\hbar$  es la constante de Planck dividida entre  $2\pi$ ,  $\gamma$  es la constante giromagnética dependiente de cada núcleo y  $B_0$  es el campo magnético aplicado.

Por tanto el valor de la diferencia energética entre ambos subniveles del espín nuclear al aplicar un campo magnético  $B_0$  se describe con la ecuación:

$$\Delta E = \hbar\gamma B_0$$

Debido a la diferencia energética entre los dos niveles habrá una diferencia poblacional regida por la distribución de Boltzman favoreciendo al estado de menor energía. Estos núcleos son los responsables del fenómeno de resonancia que nos brinda la información para determinar la estructura molecular.

Se puede observar que las transiciones entre los niveles energéticos del espín nuclear son de mayor energía entre mayor sea el campo magnético aplicado y por tanto mayor será la resolución de los experimentos.

## Parámetros RMN.

### Desplazamiento químico.

Las señales en el espectro de resonancia se ven influenciadas en formas características por los campos magnéticos locales generados por la densidad electrónica que rodea a cada núcleo observado, es decir, por su ambiente químico.

La frecuencia en la que se observa cada núcleo se le conoce como desplazamiento químico ( $\delta$ ), el cual es empleado para identificar cada tipo de núcleo en una molécula y distinguir núcleos que se encuentran en ambientes químicos distintos.

El desplazamiento químico es a dimensional y su magnitud se da en partes por millón (ppm), las cuales se determina estableciendo la relación entre la frecuencia de un compuesto referencia y la del núcleo en observación de la siguiente manera

$$ppm = (\nu_o - \nu_{ref}) * 10^6 * \nu_{ref}^{-1}$$

en donde  $\nu_o$  es la frecuencia del núcleo a observar y  $\nu_{ref}$  es la frecuencia del núcleo de referencia. [28,29]

### Acoplamiento

Existen dos tipos de acoplamientos observados en RMN, uno que se transmite a través del enlace químico (acoplamiento escalar o indirecto) y otro que se transmite a través del espacio (acoplamiento dipolar).

El acoplamiento escalar es un acoplamiento a través del enlace químico, propagado por las interacciones del espín nuclear con el espín de los electrones: por lo que, al tener dos núcleos acoplados cada uno sentirá a través de los enlaces químicos un incremento o decremento del campo magnético debido al espín a favor o en contra del núcleo vecino. Por lo tanto, cada tipo de enlace tiene una constante de acoplamiento  $J$  característica que no depende de la fuerza del campo magnético  $B_0$  y es una propiedad de la estructura molecular. [28]

El acoplamiento escalar se observa generalmente de 1 a 3 enlaces de distancia y no se manifiesta entre núcleos equivalentes. Este tipo de acoplamiento está determinado por la presencia del número de núcleos vecinos.

Para que se lleve a cabo el acoplamiento dipolar, sólo se requiere la proximidad espacial y depende de la orientación con respecto a  $B_0$ . [31]

El acoplamiento dipolar se manifiesta a través del Efecto Nuclear Overhauser (NOE, Nuclear Overhauser Effect). La intensidad de las señales debido al

NOE (*INOE*) guarda una relación inversa con la distancia de los núcleos  $r$  elevada a la sexta potencia

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

donde  $k$  es una constante de proporcionalidad y  $r_{AB}$  es la distancia entre el núcleo A y el núcleo B.

- Resonancia magnética nuclear de proteínas.

A partir de mediados de los años 80, debido a las múltiples mejoras instrumentales y al empleo de espectrómetros de 500 MHz o mayores se ha logrado el desarrollo de esta técnica para el análisis de biomoléculas.

Cuando se obtiene un espectro de RMN de una proteína, las señales se traslapan entre ellas provocando que los espectros monodimensionales de una proteína sean imposibles de interpretar. Sin embargo, los espectros monodimensionales son de gran importancia al proporcionarnos información sobre la existencia del plegamiento de una proteína.<sup>[31]</sup>

Para lograr la interpretación de los espectros de RMN de estas macromoléculas es requisito indispensable la obtención de espectros multidimensionales.

Una de las primeras observaciones importantes fue que el espectro de una proteína desnaturalizada es la suma de los espectros de los aminoácidos que la conforman.

### Resonancia Magnética Nuclear $^1\text{H}$

La mayoría de los constituyentes de una proteína son  $^1\text{H}$ . Cada espín nuclear aparecerá en una región específica en los espectros de  $^1\text{H}$ . Los espines de  $^1\text{H}$  del NH de amida de la cadena principal aparecen entre 9.5 y 6.5 ppm, los núcleos aromáticos de  $^1\text{H}$  se encuentran entre 8.0 y 6.5 ppm (con la excepción de los espines de  $^1\text{H}_\epsilon$  de Trp e His, cuyos desplazamientos químicos son de 10.2 y 8.1, respectivamente), los espines de los  $^1\text{H}_\alpha$  se localizan entre 5.0 y 3.5 ppm, los espines de metilos y metilenos alifáticos de cadena lateral resuenan entre 3.5 y 1.0 ppm y los espines de  $^1\text{H}$  de metilos (excepto por el  $^1\text{H}_\epsilon$  de Met, que se encuentra en 2.1 ppm) aparecen a desplazamientos químicos menores que 2.0 ppm. Las señales de  $^1\text{H}_\text{N}$  de amida de la cadena principal suelen ser el conjunto de señales mejor resueltas en el espectro de  $^1\text{H}$  de una proteína plegada debido a que al presentar plegamiento el ambiente químico de estos es bien definido.

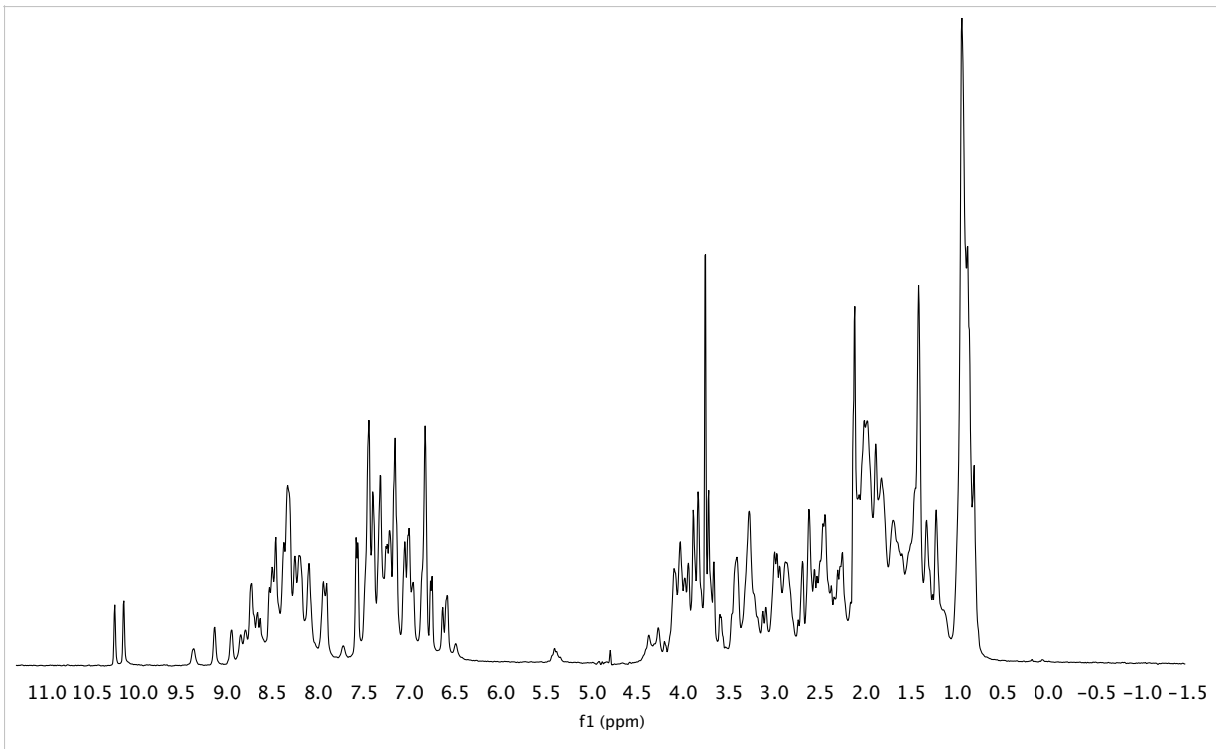


Figura 8. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de protón de una proteína. Se pueden observar la dispersión de señales de 6.5 a 9 ppm reflejando que la proteína a la cual corresponden este espectro presenta un plegamiento definido.

### Experimentos de RMN bidimensionales.<sup>[32]</sup>

Para proteínas pequeñas menores a 10kDa se puede obtener la estructura tridimensional mediante el uso de experimentos de RMN  $^1\text{H}$  bidimensionales. Los experimentos en dos dimensiones se clasifican en homonucleares y heteronucleares. Los experimentos de correlación homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  como lo son el COSY (Correlation Spectroscopy), TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) y NOESY (Nuclear Overhauser Spectroscopy) son de gran utilidad en la elucidación estructural.

### Experimento COSY

El experimento COSY pueden observarse las correlaciones a dos y a tres enlaces de distancia entre los núcleos que se acoplan escalarmente. Los experimentos homonucleares, como el COSY, muestran una serie de señales con las coordenadas iguales, a estas se le llama señales en la diagonal, las cuales corresponden a las señales del espectro monodimensional. Las señales que se localizan fuera de la diagonal son las que se interpretan. Las coordenadas de ellas son los desplazamientos químicos de los protones que se encuentran acoplados escalarmente a dos y a tres enlaces de distancia. Con esta información es posible asignar cada una de las señales de los protones en la molécula.

## Experimento TOCSY

La determinación de todos los núcleos que se acoplan entre ellos mismos es una función muy importante en la determinación de estructuras proteicas. Al conjunto de estos núcleos se les llama sistemas de espines. En una proteína, al menos hay tantos sistemas de espines como número de aminoácidos. El número de sistemas de espines es mayor, ya que en los aminoácidos aromáticos los protones de los anillos no se acoplan escalarmente a los protones alifáticos, generando así dos sistemas de espines.

TOCSY o HOHAHA (Homonuclear Hartman Hanh Experiment): En este experimento se muestra la correlación de todos los núcleos que se encuentran formando un determinado sistema de espines. El experimento TOCSY es fundamental para realizar las determinaciones estructurales.

Gracias a este experimento se pueden definir y encontrar los desplazamientos de los átomos de hidrogeno que constituyen a cada aminoácido de la proteína en estudio.

## Experimento NOESY

El NOESY es un experimento que muestra el efecto nuclear Overhauser entre dos protones. El experimento NOESY genera señales fuera de la diagonal cuando los núcleos se encuentran próximos, a no más de 5 Ångstroms de distancia. El experimento NOESY es de gran utilidad ya que la integral de la señal en tres dimensiones es proporcional a la distancia entre los núcleos. Así, se logra determinar protones que se encuentran alejados en la secuencia de los aminoácidos, pero cercanos debido a la estructura tridimensional que presenta la proteína. Este experimento también permite asignar a los protones de aminoácidos que se encuentran contiguos, llamada la asignación secuencial y la determinación de NOE's a larga distancia que definirán la estructura terciaria.

Los experimentos en dos dimensiones ayudan a interpretar muchas señales que se encuentran traslapadas; sin embargo, ello es posible sólo cuando la molécula no es muy grande. Muestras de proteínas constituidas por 50 aminoácidos son factibles de determinar sus estructuras con experimentos en dos dimensiones. Cuando la proteína es mayor, resulta muy complicada y compleja la interpretación de los espectros de RMN. Para solucionar este problema se emplean experimentos heteronucleares en dos y en tres dimensiones empleando proteínas marcadas con isótopos de  $^{13}\text{C}$  y/o  $^{15}\text{N}$ .

## Metodología

Durante el desarrollo experimental del siguiente trabajo se siguió la metodología general para purificación de proteínas.

Expresión de la proteína de fusión de la M2D1 en una cepa de *E. coli*.

Al inicio de esta investigación ya se contaba con el plásmido utilizado para la expresión de la M2D1. Es un derivado del plásmido comercial pET32(a) el cual presenta los sitios de restricción Bam H1 y Kpn 1 y contiene la secuencia de nucleótidos que al ser expresada resultará en la proteína de fusión de la M2D1.<sup>[33]</sup>

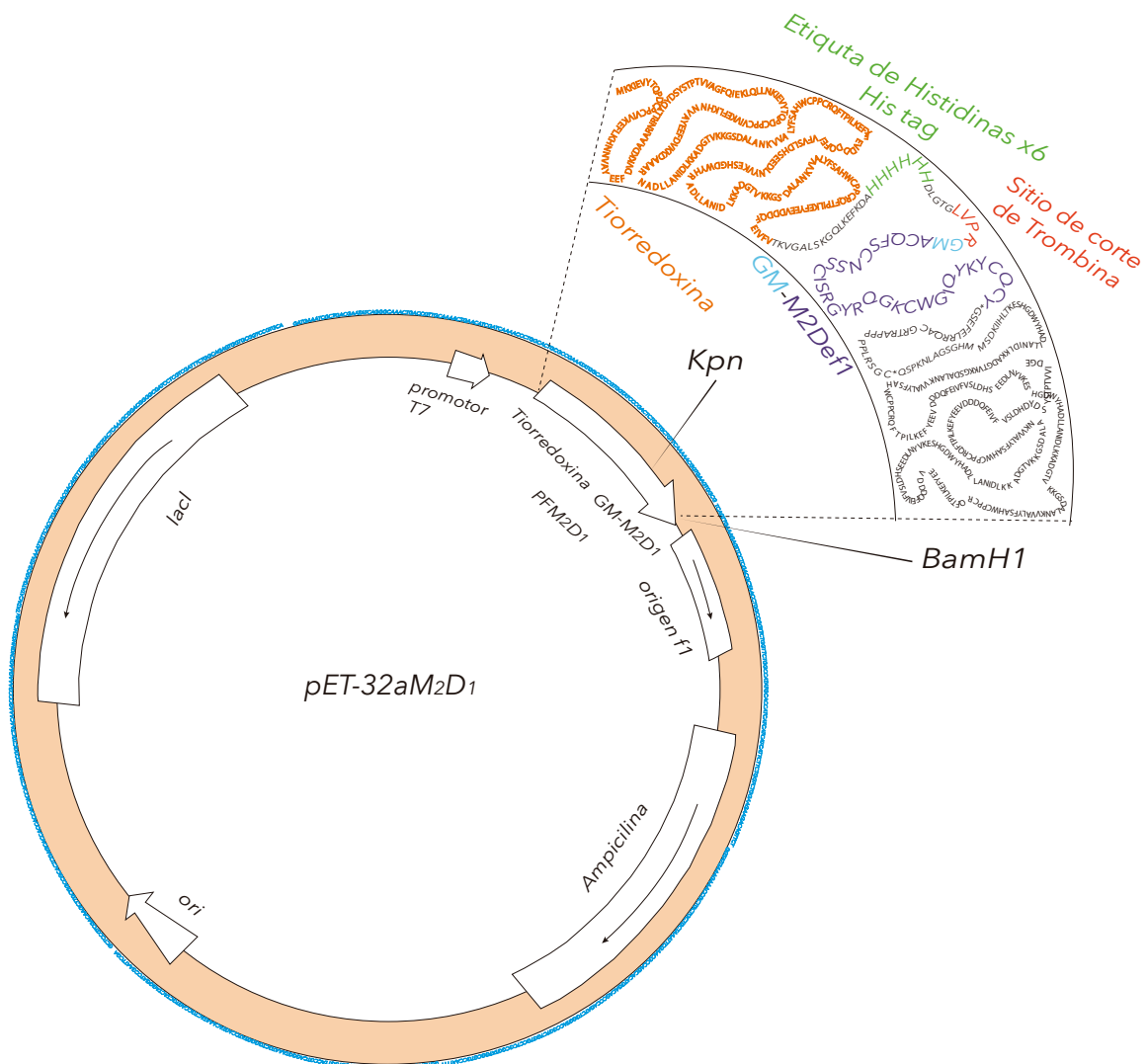


Figura 9. Diseño del plásmido pET-32a- M2D1.

Por su parte la proteína de fusión de la M2D1 está formada por la secuencia de la tiorredoxina, una proteína chaperona que tiene como objetivo favorecer la solubilidad y el plegamiento de la proteína de interés, una etiqueta de seis Histidinas cuya utilidad es facilitar la purificación de la M2D1, un sitio de reconocimiento de trombina para separar la mutante 2 del resto de la



proteína de fusión, la etiqueta de purificación GM- y la secuencia de la M2D1.

Se llevó a cabo la transformación con el plásmido pET32(a) M2D1 mediante choque térmico en células competentes de *E. coli* de las cepas de BL-21, *Tunner*, y Rosetta para determinar en cuál de ellas se obtenía una mejor sobreexpresión de la proteína de fusión de la M2D1 de manera soluble.

Se sembraron las células transformadas en medio LB agar que contenía los antibióticos a los que son resistentes las diferentes cepas y ampicilina al cuál confiere resistencia el plásmido.

Se realizaron los blancos positivo y negativo con el objetivo de monitorear que la transformación se halla dado de manera adecuada. Así mismo se sembraron células transformadas con el plásmido en una caja que contenían ampicilina.

Se dejó crecer un cultivo celular de cada cepa en 20 mL de medio LB estéril con los antibióticos correspondientes a 37 °C con agitación constante 200 rpm durante 16 horas. 1mL de este inóculo se puso en 20 mL de medio LB con antibiótico y estéril y se incubó a 37° C monitoreando su crecimiento. Cuando el cultivo bacteriano alcanzó la densidad óptica a 600 nm (OD<sub>600</sub>) entre 0.6 y 0.8 unidades de absorbancia, se indujo la expresión proteica con 0.5 mM de IPTG y se monitoreo la cinética de expresión en cada cepa cada 3 horas hasta cumplir 28 horas de crecimiento.

Las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm y resuspendidas en 60 µL de solución amortiguadora A. Se lisaron las células resuspendidas en solución amortiguadora de lisis, mediante choques sónicos, el lisado se centrifugó a 6,500 rpm recuperando la fracción soluble para el análisis de expresión mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 14 % en condiciones desnaturalizantes.

Los geles fueron corridos en una cámara de electroforesis con solución amortiguadora de tanque a un voltaje constante de 80 V durante 20 min , posteriormente, a un voltaje de 120 V por 60 min los geles fueron revelados con *blue silver*.

Analizando los resultados se determinó la cepa y el tiempo en la que la proteína de fusión de la M2Def1 tiene una mayor expresión.

A partir de este momento contando con las condiciones óptimas y la cepa seleccionada se realizó la expresión de la proteína de interés en 3 L de medio LB estéril.

Cumplido el tiempo de expresión se separaron las células del medio LB mediante centrifugación a 5,000 xg (7500 rpm) a 4°C durante 15 min.

El sobrenadante se desechó y las células fueron resuspendidas en 50 mL de solución amortiguadora de lisis colocadas en un baño de hielo y sometidas a choques sónicos por periodos de 20 s a 45 W con periodos de descanso de

40 s durante un tiempo efectivo de pulsaciones de 10 min.

Posteriormente, se separan los residuos celulares de la fracción soluble donde debe encontrarse la proteína de interés mediante centrifugación a 39,000 xg (16,500rpm).

Separación de la proteína de fusión del resto de proteínas solubles del lisado celular

Esta purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad metal quelato.

La fracción soluble se pasó por prefiltros de fibra de vidrio de 15, 20 y 25; posteriormente, a través de una membrana de 0.45µm. Se pasó la mezcla de proteínas filtrada por una columna HipTrap® previamente cargada con iones Ni<sup>2+</sup> y equilibrada con solución amortiguadora A, a un flujo de 5 mL/min. La proteína de fusión se retuvo dentro de la columna haciendo que está se torno color café debido a que la etiqueta de histidinas se coordina con el níquel.

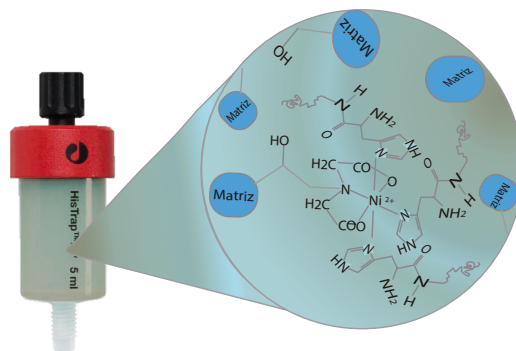


Figura 10. Esquema que ilustra la retención proteica en una columna de afinidad metal quelato.

Se realizaron lavados con tres volúmenes de columna con disoluciones compuestas por solución amortiguadora A, más diferentes concentraciones de imidazol, para determinar la concentración ideal en la que se eliminan de la columna algunas otras proteínas que no son de interés y presenten poca afinidad a los iones Ni<sup>2+</sup> pero sin eluir la proteína de fusión. Una vez realizado los lavados se eluyó de manera pura la proteína de fusión. Se utilizaron disoluciones con 10, 25, 50, 100, 200 y 500 mM de imidazol.

Los lavados se monitorearon mediante geles de poliacrilamida determinando la concentración ideal de imidazol para realizar los lavados y la elución de la proteína de fusión.

Desalado y cuantificación

Es importante para el paso de proteólisis enzimática (corte con trombina) en el cual se obtiene la M2D1 sin el residuo del corte, trabajar con la proteína de

fusión sin exceso de sales.

Se eliminó el imidazol de la proteína de fusión mediante cromatográfica de exclusión molecular empleando una columna PD-10. Posteriormente se midió la concentración de la proteína de fusión.

En el paso anterior, se eluyó la proteína de fusión con imidazol por lo que es necesario realizar el cambio de disolvente. Este proceso se llevó a cabo por diálisis de 10 mL de proteína utilizando una membrana de 10000 MW sumergida en 500 mL de disolución amortiguadora A. Se dejó en agitación durante 30 min, realizando 2 cambios de disolvente. Una vez desalada la proteína de fusión se mide la concentración de ésta y se ajusta hasta obtener una disolución de proteína de fusión de 1mg/mL.

Reacción de proteólisis enzimática.

En tubos Ependorf de 1.5 mL se colocaron 100  $\mu$ L de suspensión agarosa en la que se encuentra fija la trombina SIGMA®, 2 mM de  $\text{CaCl}_2$  y 1 mL de la disolución desalada de proteína de fusión cuya concentración es de 1 mg/mL.

Se realizaron pruebas para optimizar el corte enzimático variando la concentración de agente caotrópico además del seguimiento de la reacción a lo largo del tiempo para encontrar las condiciones óptimas de este proceso.

El avance de la reacción de corte enzimática fue monitoreado mediante geles de electroforesis en condiciones desnaturalizantes.

Una vez realizado el corte enzimático empleando las condiciones optimizadas para dicho proceso se prosiguió a separar el residuo de corte y la proteína de fusión sin reaccionar de la GM-M2Def1 mediante cromatografía de afinidad metal-quelato, siguiendo la misma metodología descrita anteriormente, sin embargo esta vez la proteína de interés eluyó de la columna sin presentar afinidad y la proteína de fusión no cortada y el residuo de corte los cuales mantenían la etiqueta de histidinas fueron retenidos en la columna.

La proteína que no presentó afinidad a la columna se sometió a extracción en fase sólida como preparación antes de la purificación mediante cromatografía de líquidos HPLC.

Para la extracción en fase sólida se ocupó una columna Strata® 3 mL, se trató la proteína de interés con TFA hasta disminuir su pH a aproximadamente 4 se hizo pasar la proteína por la columna Strata previamente hidratada y equilibrada con una disolución 15 % ACN + 0.05 % TFA. Se realizó un lavado de 6 mL con disolución 15 % ACN para posteriormente eluir la GM-M2D1 con una disolución 39% ACN. La columna fue lavada posteriormente con disolución 65 % ACN y con agua.

La proteína eluida con 39 % de ACN se congeló y liofilizó hasta obtener un sólido blanco o ligeramente rosa, este sólido blanco es la GM-M2D1.

Purificación mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia en fase reversa.

La proteína fue sometida a un último proceso de purificación mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia. Se utilizó como fase estacionaria una columna de fase reversa C18 Phenomenex<sup>®</sup> y como fase móvil agua y acetonitrilo ambos con ácido trifluoroacético (TFA) al 0.05 % v/v con un gradiente lineal de 15 al 65 % de ACN en 36 minutos a un flujo de trabajo de 1mL/min.

La adición de TFA en la fase móvil mejorara la separación de proteínas al neutralizar las cargas dentro de éstas, acrecentando así su hidrofobicidad con lo que se aumentará la interacción entre fase estacionaria y las proteínas a separar.

La corrida cromatográfica fue monitoreada mediante sistema de detección UV con lámpara de deuterio ajustada a 230nm, longitud de onda a la que absorbe radiación el enlace peptídico.

Debido al uso de la columna C18 se infiere que las proteínas que posean mayor superficie hidrofóbica tendrán una mayor interacción con la columna. La técnica es de gran utilidad para separar proteínas que tengan pesos moleculares idénticos y secuencias primarias iguales pero que difieran en el plegamiento. Los picos cromatográficos colectados se liofilizaron.

### Caracterización de GM-M2D1.

Se determinó la masa de los péptidos separados por HPLC obtenidos mediante espectrometría de masa MALDI-TOF utilizando una matriz ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico al 1 % de TFA en una relación 1:5. La determinación se llevó a cabo en un equipo MALDI-TOF Microflex Bruker Daltonics.

### Obtención de los espectros de RMN

Para la obtención de los espectros de RMN se preparó la muestra disolviendo la proteína en 150  $\mu$ L de agua con 5 %D<sub>2</sub>O. Los experimentos se realizaron en un equipo Varian Inova de 500 MHz en una sonda indirecta de tres núcleos de 3 mm a 298 K. Se obtuvieron los espectros de RMN H<sub>1</sub>, TOCSY, COSY y NOESY.

El experimento TOCSY fue obtenido con un tiempo de mezclado de 80 ms mientras que los espectros NOESY se adquirieron usando tiempos de mezclado de 150 y 300 ms. Durante la obtención de los diferentes espectros se usó la supresión de agua DPGSE.

### Procesamiento y análisis de los espectros

Los datos de los experimentos fueron procesados utilizando los programas computacionales NMRDraw y NMRpipe.

Para lograr la correcta asignación de los sistemas de espín de una proteína es necesario contar con la secuencia primaria de la proteína es decir,

conocer los aminoácidos que la conforman. Cada tipo de aminoácido posee un patrón característico de señales COSY y TOCSY conocido como sistema de espín, para la asignación de los sistemas de espín se empleó el programa CARRA 1.5 y la herramienta XEASY.

La primera etapa de asignación secuencial de las señales de RMN se identifica y asigna el sistema de espines de cada uno de los residuos de aminoácido que conforman la estructura primaria tomando como referencia los patrones de señales característicos para cada uno de ellos. (tabla anexo)

Una vez realizada la asignación secuencial de todos los sistemas de espín o la mayoría de ellos mediante la observación de las conectividades entre HN, H $\alpha$ , H $\beta$  de los residuos adyacentes. Se realiza la asignación de NOEs a larga distancia.

Con las restricciones obtenidas a partir del espectro NOE se realizaron cálculos de estructura en el programa CYANA 2.1 con y sin establecer los enlaces disulfuro. Seleccionando el conjunto de estructuras que cumplieran con el mayor número de restricciones NOEs.

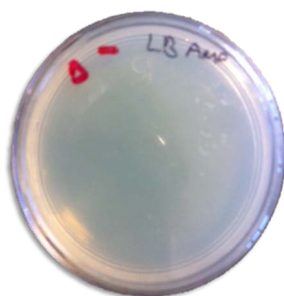
Se realizó finalmente un afinamiento por dinámica molecular de las 20 estructuras obtenidas anteriormente utilizando para ello el programa AMBER 9. El afinamiento tiene como objetivo encontrar el arreglo más estable con restricciones fisicoquímicas tomando en cuenta la interacción con el disolvente, en este caso agua. El cálculo consta de dos etapas: una simulación al vacío con minimización energética dos ciclos de recocido y una segunda minimización. La segunda etapa de afinamiento consiste en una minimización con disolvente explícito. Esta segunda etapa consistió en tres ciclos de calentamiento iniciando de 0 y hasta alcanzar una temperatura máxima de 300 K manteniendo el volumen constante. Posteriormente se realizaron dos ciclos a 300 K y presión de 1 atm, y tres ciclos a volumen constante y 300 K.

Posteriormente, se realizó una minimización de energía con disolvente explícito.

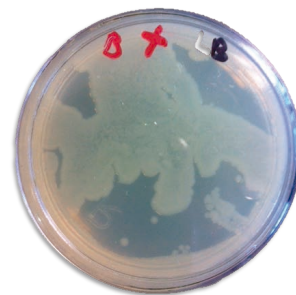
## Resultados y discusión

Se sembraron cajas Petri con las células transformadas en las diferentes cepas de *E. coli* en medio LB agar que contenían los antibióticos respectivos a los que cada cepa es resistente más ampicilina puesto que el plásmido pET32(a) confiere resistencia a este antibiótico.

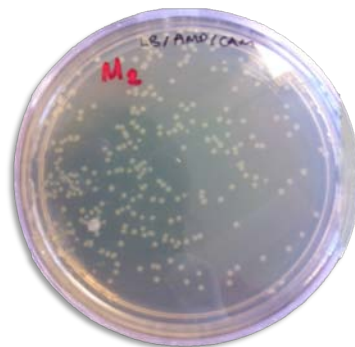
Debido a que en la caja del blanco positivo crecieron células y en el blanco negativo no crecieron células se confirma que a las células con que se trabajó se encuentran en buenas condiciones; que al asimilar el plásmido pET32(a) les confiere a las células resistencia a ampicilina por lo que la transformación de las células de *E. coli* se dio exitosamente.



a)



b)



c)

Figura 11. a) Blanco negativo cepa sin plásmido pET32 a-M2D1 sembrado en una caja con ampicilina b) Cepa con plásmido en una caja con ampicilina y cloranfenicol c) Blanco positivo cepa sin plásmido sembrada en una caja sin ampicilina.

Las pruebas de expresión arrojaron como resultado que la cepa Rosetta sobreexpresa de manera más eficiente la proteína de fusión. Se observa que a partir de las 3 horas posteriores a la inducción aparece una banda cuyo peso es alrededor de 21 kDa lo que concuerda con la masa de la proteína de fusión de la M2D1 que es 21,011 kDa.

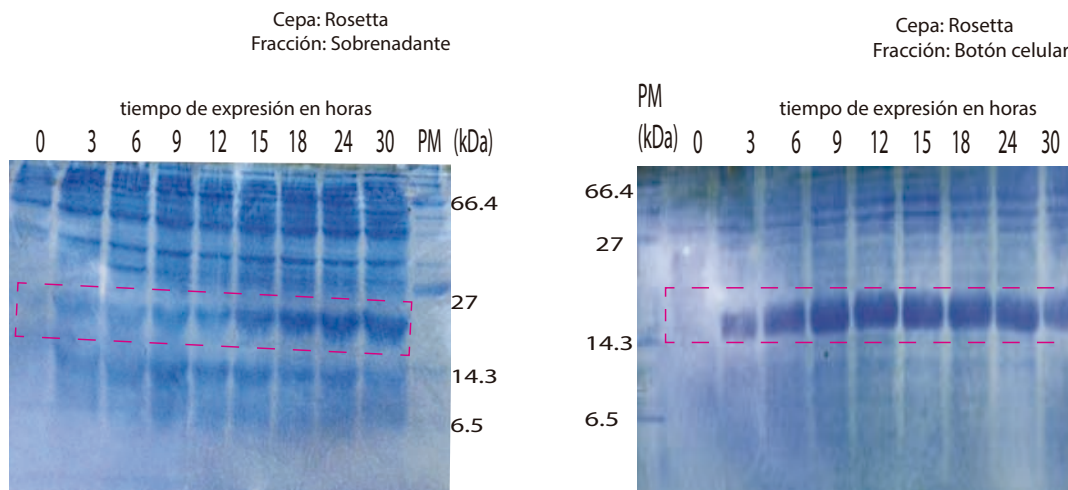


Figura 12. Monitoreo de expresión de la proteína GM-M2Def1 en geles 14% de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Se observa una banda intensa con peso aproximado de 21kDa que corresponde a la proteína de fusión de la M2D1 observando que al tiempo de 15 horas se llega al máximo de expresión .

Tanto en la fracción soluble como insoluble se obtiene un máximo de expresión las 15 horas posteriores a la inducción con IPTG.

Se seleccionó este tiempo de inducción ya que es el momento en que la expresión de la proteína de interés ha llegado a su máximo.

A pesar de obtener mayor expresión en la parte insoluble se decidió trabajar con la fracción soluble puesto que trabajar con la fracción insoluble involucra pasos de replegamiento.

El paquete celular obtenido después de 15 horas de expresión fue de 12 g por litro de cultivo.

Sin embargo, se obtuvo un bajo rendimiento de la proteína de fusión, por lo que se decide lisar con el programa anteriormente descrito adicionando a la disolución amortiguadora la cantidad necesaria de urea para llegar a una concentración 6 M para obtener mayor cantidad de proteína soluble.

Purificación de la proteína de fusión mediante cromatografía de afinidad metal quelato.

En la figura 17 se muestra el gel donde se monitorea los lavados de la proteína de fusión a distintas concentraciones de imidazol. Se observa que a partir de 50 mM de imidazol las proteínas poco afines a la columna comienzan a eluir sin que salga la proteína de fusión. Sin embargo 3 volúmenes de columna no son suficientes para purificar de manera eficiente la proteína a la concentración de 100 mM de imidazol. La proteína de fusión comienza a eluir a 200 mM de imidazol. Tres volúmenes de columna no son suficientes para eluir de manera completa la proteína de fusión, pues se observa que al incrementar la concentración a 500 mM de imidazol aun se puede eluir más.

En posteriores purificaciones al realizar los lavados con 50mM de imidazol pero incrementando el número de volúmenes que se hacían pasar a través de la columna a 5 se observaron mejores resultados al obtener la M2D1 de manera más pura por lo que a partir de este momento tanto los lavados como la elución se realizaron con 5 volúmenes de columna.

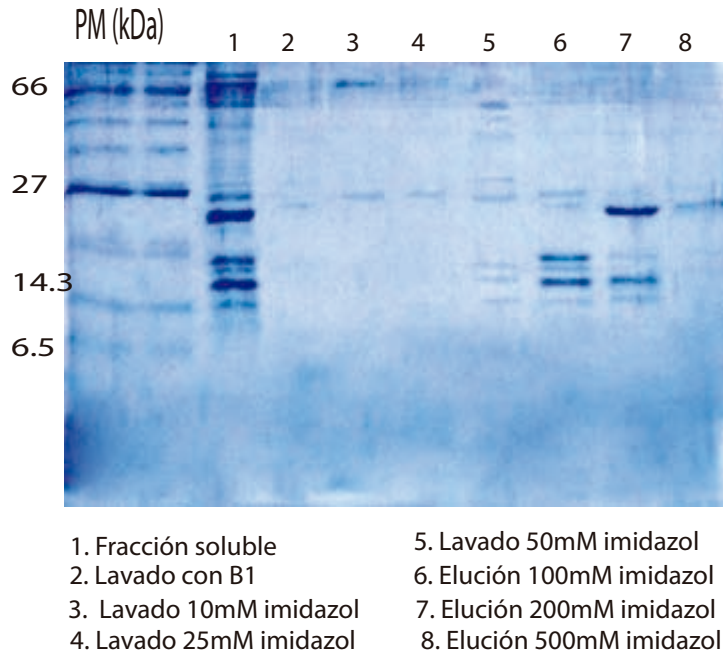


Figura 13. Purificación de la proteína de fusión mediante lavados con imidazol. En el carril uno se muestra la mezcla proteica obtenida en la fracción soluble a la cual se le realizaron lavados con distintas concentraciones de imidazol observado que a 50mM de imidazol (carril 5) la M2D1 es purificada de otras proteínas presentes en la fracción soluble que presentan afinidad media a la columna, a partir de 100mM se observa que la proteína de fusión de la M2D1 comienza a eluir de la columna (carril 6) si embargo la elución de la proteína de fusión M2D1 se realizó a 200mM de imidazol (carril 7).

Después de este paso, se lleva a cabo el desalado de la proteína de fusión, ya que el imidazol inhibe la reacción de corte enzimático.

Se observó que durante el corte enzimático la presencia de un agente caotrópico como la urea no mejora el rendimiento de la reacción de corte y al utilizar cloruro de guanidinio la proteína de fusión precipita desde el proceso de cambio de disolución amortiguadora.

La cinética de la reacción de corte enzimático muestra que a partir de las 3 horas la reacción de corte ha alcanzado el máximo rendimiento que es aproximadamente del 50 % y que a este tiempo presentan pocos fragmentos de degradación.



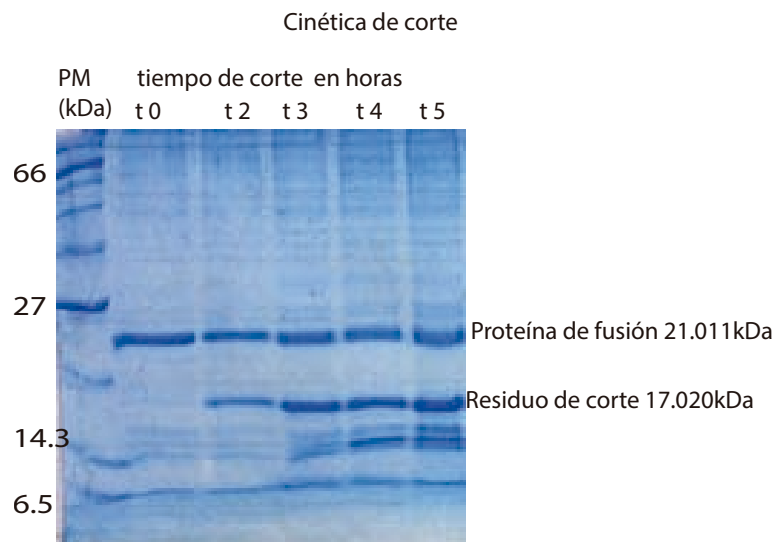


Figura 14. Monitoreo de la cinética de corte enzimático con trombina de la proteína de fusión de la M2D1. Se observa una banda de aproximadamente 21kDa correspondiente a la proteína de fusión de la M2D1 que disminuye ligeramente de intensidad a lo largo de la reacción; a partir de las 2 horas se observa la aparición de una banda de aproximadamente 17 kDa correspondiente al residuo de corte, lo cual nos indica que la reacción de corte se está llevando a cabo. A partir de la tercera hora de reacción aparecen bandas de menor peso molecular probablemente correspondientes a fragmentos de degradación. En este tiempo se observa que la reacción de corte se ha completado en un 50% y presenta pocos fragmentos de degradación por lo que se decide tomar este tiempo como el más conveniente para la reacción de corte.

Por lo que se decide en posteriores reacciones de corte enzimático suspender la reacción a las 3 horas.

Se realiza la separación mediante cromatografía de afinidad metal quelato del residuo de corte y la proteína de fusión de la proteína cortada debido a que la proteína ya cortada tiene un peso molecular de 4.009 kDa es muy complicado percibir esta banda en los gels de poliacrilamida puesto que la concentración de ésta es baja.

Se realizó la extracción en fase solida de la GM-M2D1 observando una tenue coloración rojiza en las columnas.

Al liofilizar la fracción eluida con 39 % de acetonitrilo se obtiene un sólido de color blanco o ligeramente rojizo.

Se realizó la purificación mediante cromatográfica de líquidos de alta eficiencia empleando el gradiente que se muestra a continuación.

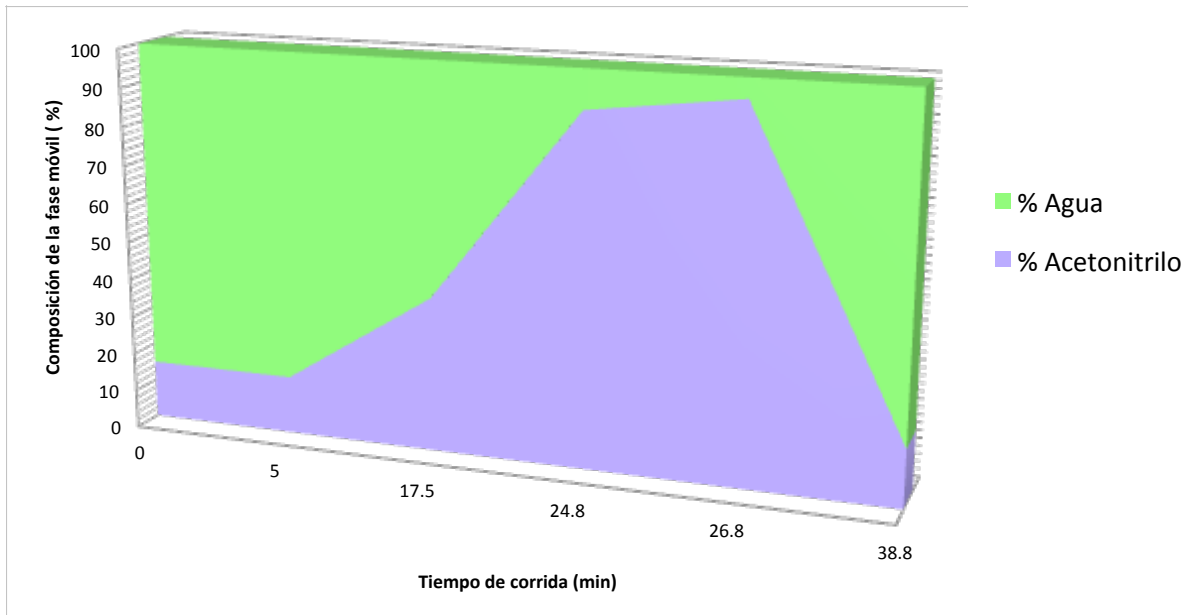


Figura 15. Gradiente de fase móvil empleado durante las corridas cromatográficas. El gradiente inicia en 15 % de acetonitrilo donde se espera eluyan las sales contenidas en la muestra hasta llegar gradualmente a un porcentaje máximo de 92% en un tiempo de 27 minutos para posteriormente regresar a 15 % de acetonitrilo.

En la figura 16 se muestra el cromatograma obtenido donde se observan dos picos cromatográficos a 17.8 s y 19 s de tiempo de retención.

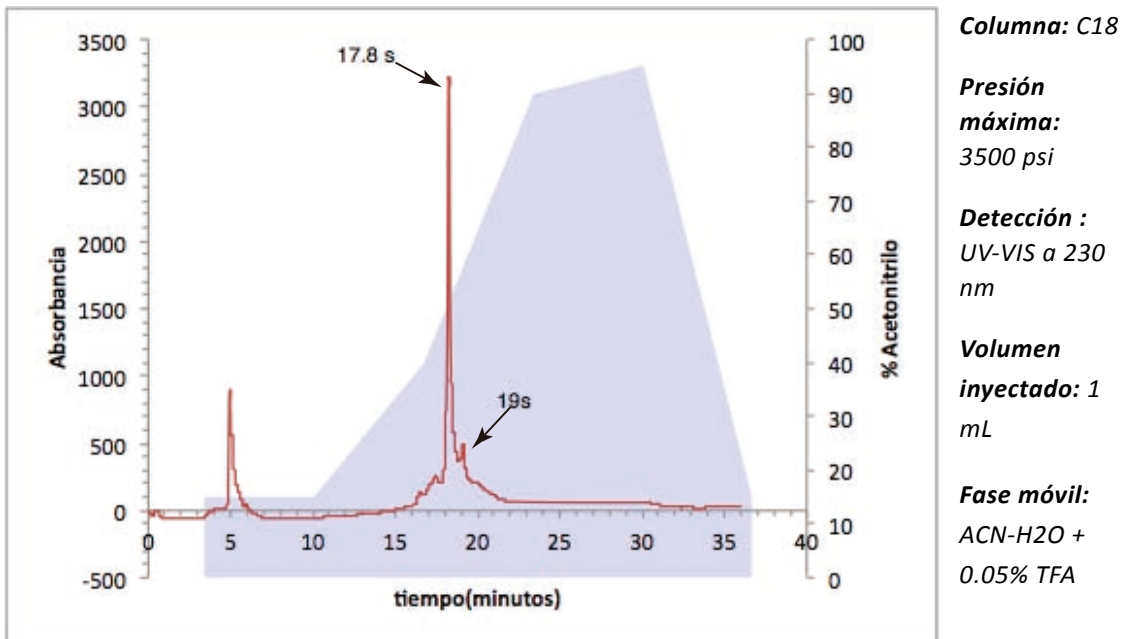


Figura 16. Purificación mediante HPLC del la GM-M2D1 en una columna C18 de fase reversa se colectaron los picos correspondientes a 17.8 y 19 minutos el pico cuyo tiempo de retención es 5 min corresponde a la elución de las sales en color lila se muestra el gradiente empleado durante la purificación.

Los cuales se caracterizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF obteniendo que el pico que eluye al minuto 17.8 tiene una masa de 4003.53 Da. Al tener 6 unidades de masa menor a la esperada para la GM-M2D1 que es de 4009 Da podríamos suponer que este pico se trata de la proteína

esperada y que el deficit de 6 unidades es un indicio de la formación de tres enlaces disulfuro.

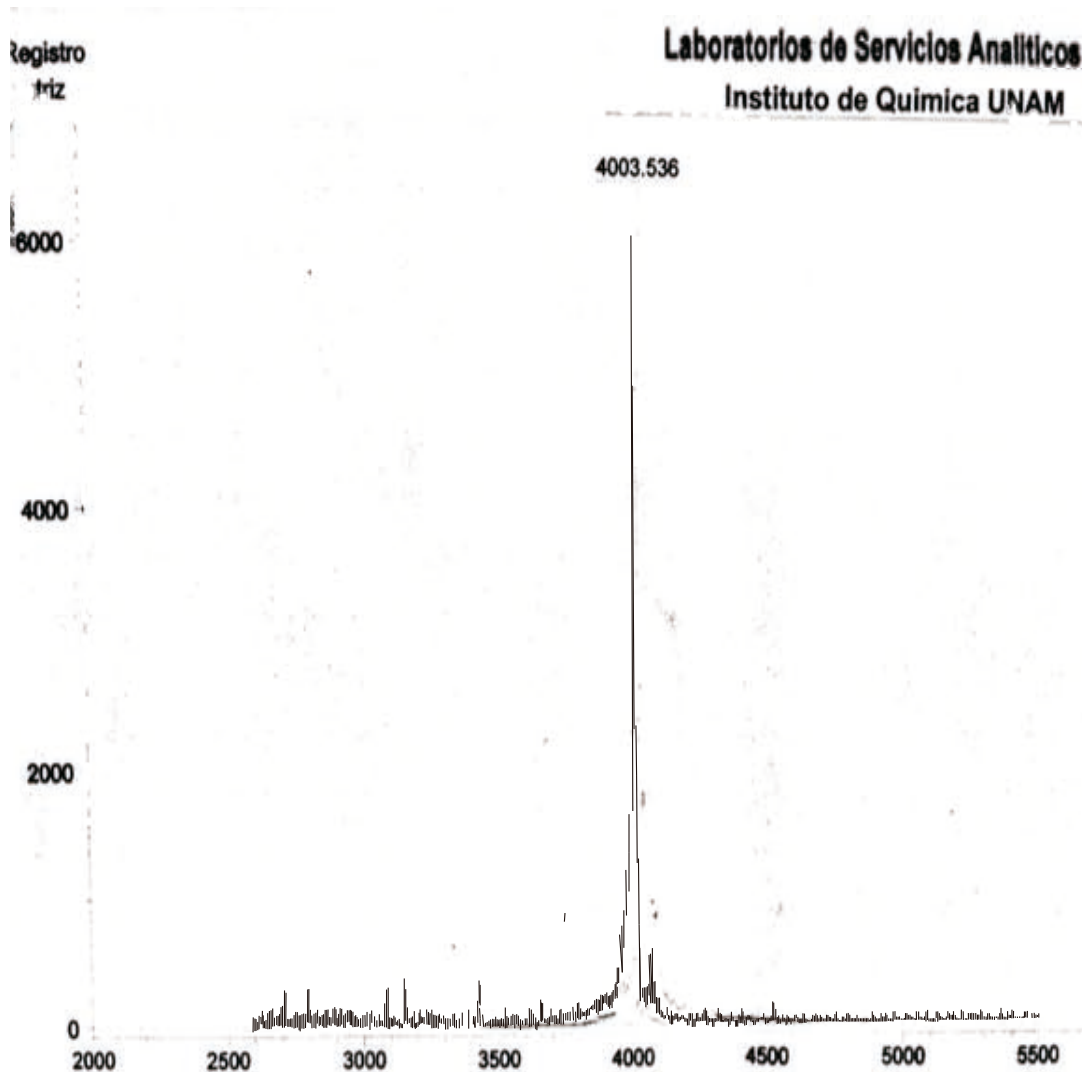


Figura 17. Caracterización mediante espectrometría de masas MALDI-TOF para el pico eluído a 17.8s el cual presenta una masa de 4003 kDa, puede suponerse que se trata del péptido de interés y que al presentar 6 unidades de masa menor que el esperado para la M2D1 nos da indicio de la formación de 3 enlaces disulfuro .

Se realizaron los experimentos de RMN de protón de ambos picos observando que el pico cuyo tiempo de retención son 17.8 s se trata de la proteína plegada y el pico cuyo tiempo de retención son 19 s también corresponde a la proteína GM-M2D1, pero con un plegamiento con regiones hidrofóbicas más expuestas; es por esto que interacciona en mayor medida con la columna lo que provoca que presente un mayor tiempo de retención.

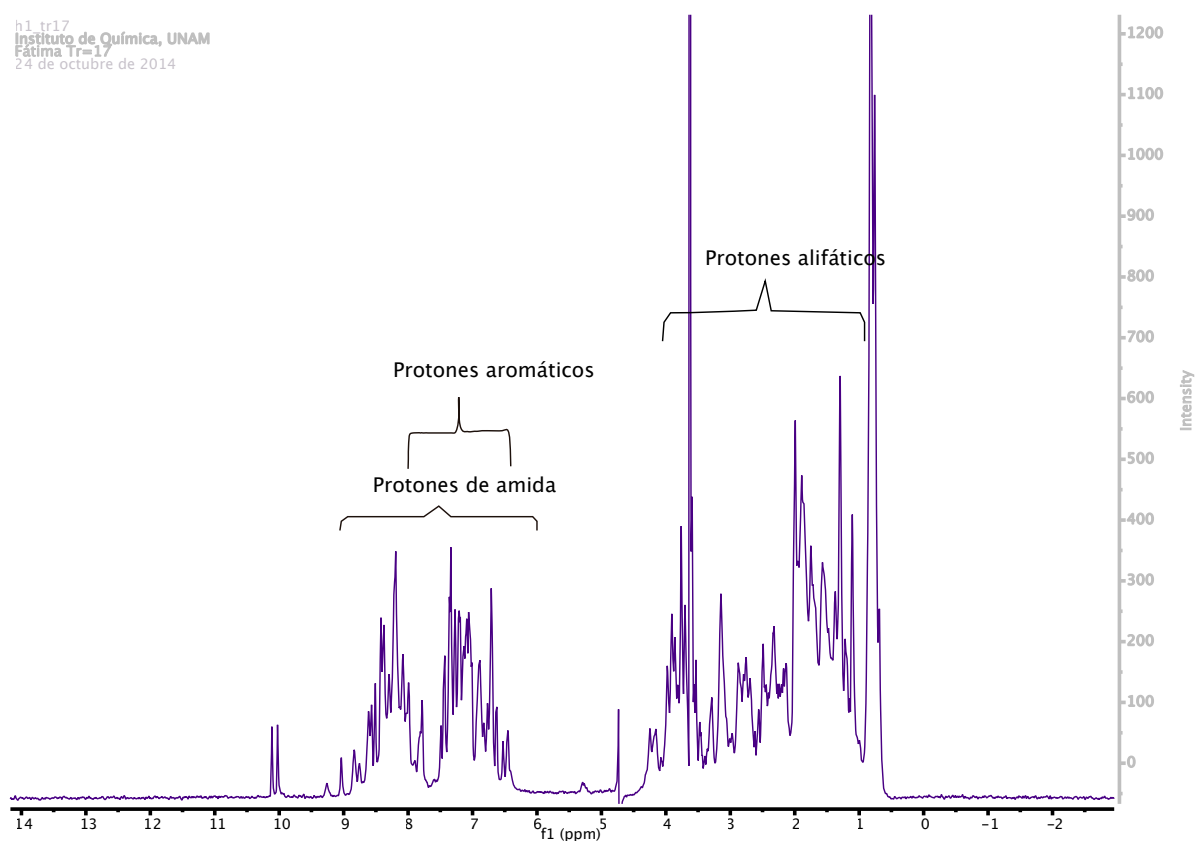


Figura 18. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Protón de la proteína GM-M2D1 correspondiente al pico cromatográfico de 17.8 s cuya masa es de 4003kDa. Es de destacarse la dispersión de las señales presentes entre 6.5 y 9 ppm característico de proteínas que presentan plegamiento definido.

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  se observa dispersión en las señales que aparecen de 6-9 ppm las cuales corresponden a los protones de amidas de la cadena principal, evidencia suficiente para corroborar que la GM-M2D1 se encuentra plegada. De no ser así, se observaría una acumulación de señales traslapadas en este rango de la ventana espectral, tal como aparece en la figura 18.1. Como se mencionó anteriormente la dispersión de señales se debe a que al tener un plegamiento definido los protones HN de los aminoácidos forman puentes de hidrógeno al generar una estructura secundaria, por lo que presentan interacciones diferentes entre ellos. Se observa asimismo señales entre 6.5-8 ppm correspondientes a protones aromáticos y en el rango de 1-4 ppm correspondientes a los protones alifáticos de las cadenas laterales.

h1\_muestra5\_1024  
Instituto de Química, UNAM  
Fátima muestra 5  
Supresión de agua DPGSE  
1024 transientes  
20 de junio de 2014

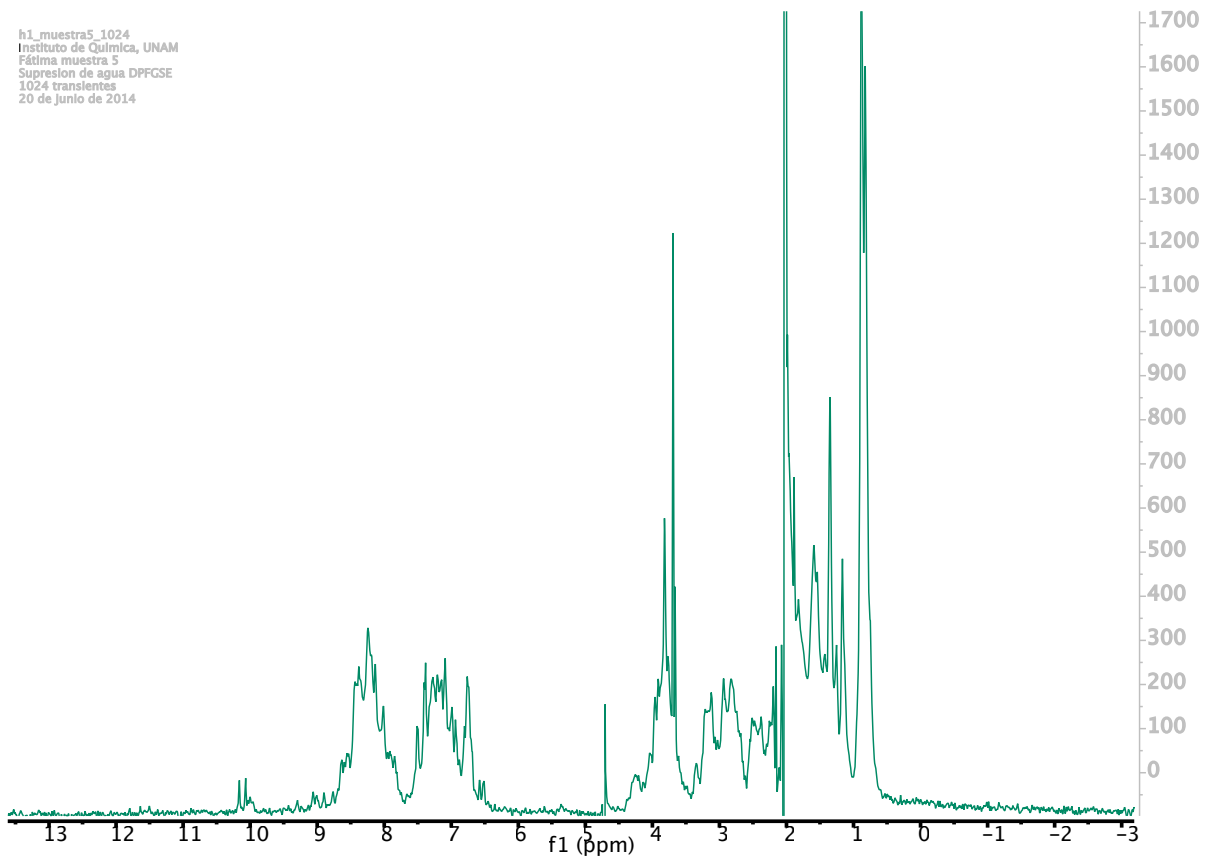


Figura 18.1. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de la proteína GM-M2D1 correspondiente al pico cromatográfico de 19 s. Donde se observa un traslape en las señales correspondientes de 6.5 a 9 ppm característico de proteínas sin un plegamiento definido.

Se obtuvieron los espectros de RMN bidimensionales TOCSY, COSY y NOESY. Se realizó la interpretación de 1075 señales pertenecientes a 32 de 34 sistemas de espín de los aminoácidos que conforman a la GM-M2D1, se asignaron 807 NOEs a corta, mediana y larga distancia.

cosy\_tr18  
Instituto de Química, UNAM  
Supresión de agua DFGSE  
Mutante 2 de la Der1  
25 de octubre de 2014

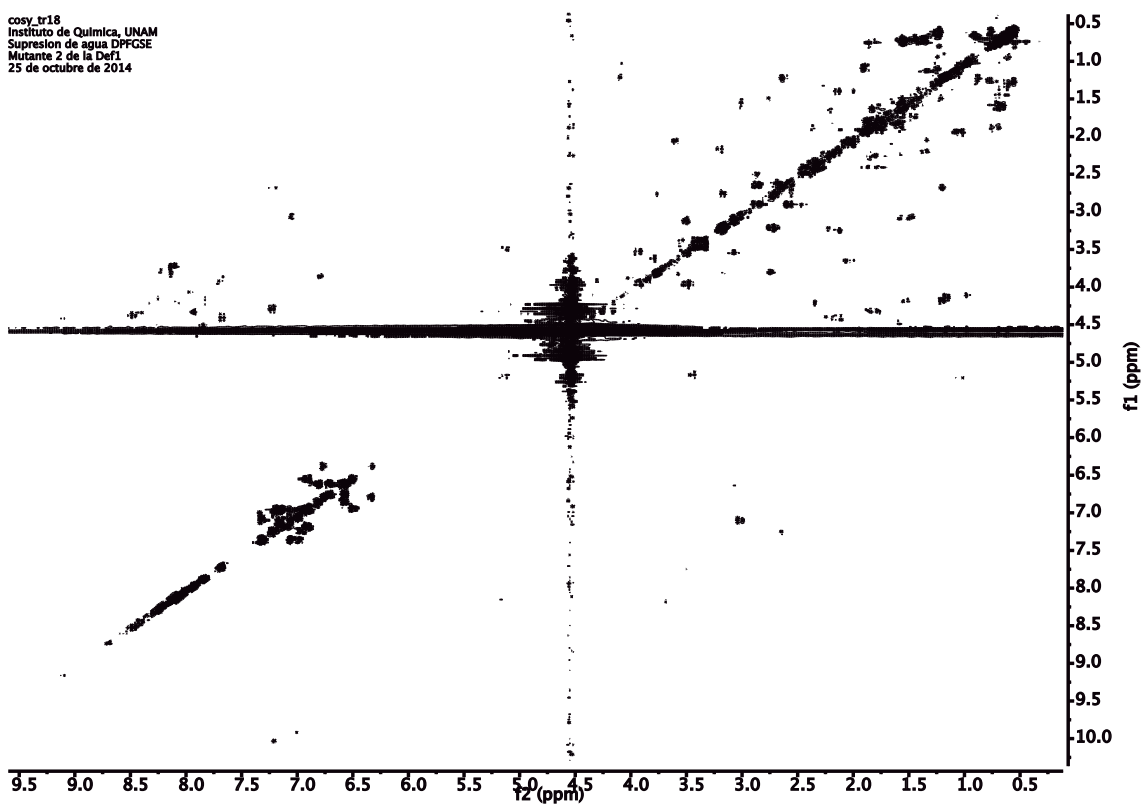


Figura 19. Espectro COSY de GM-M2D1.

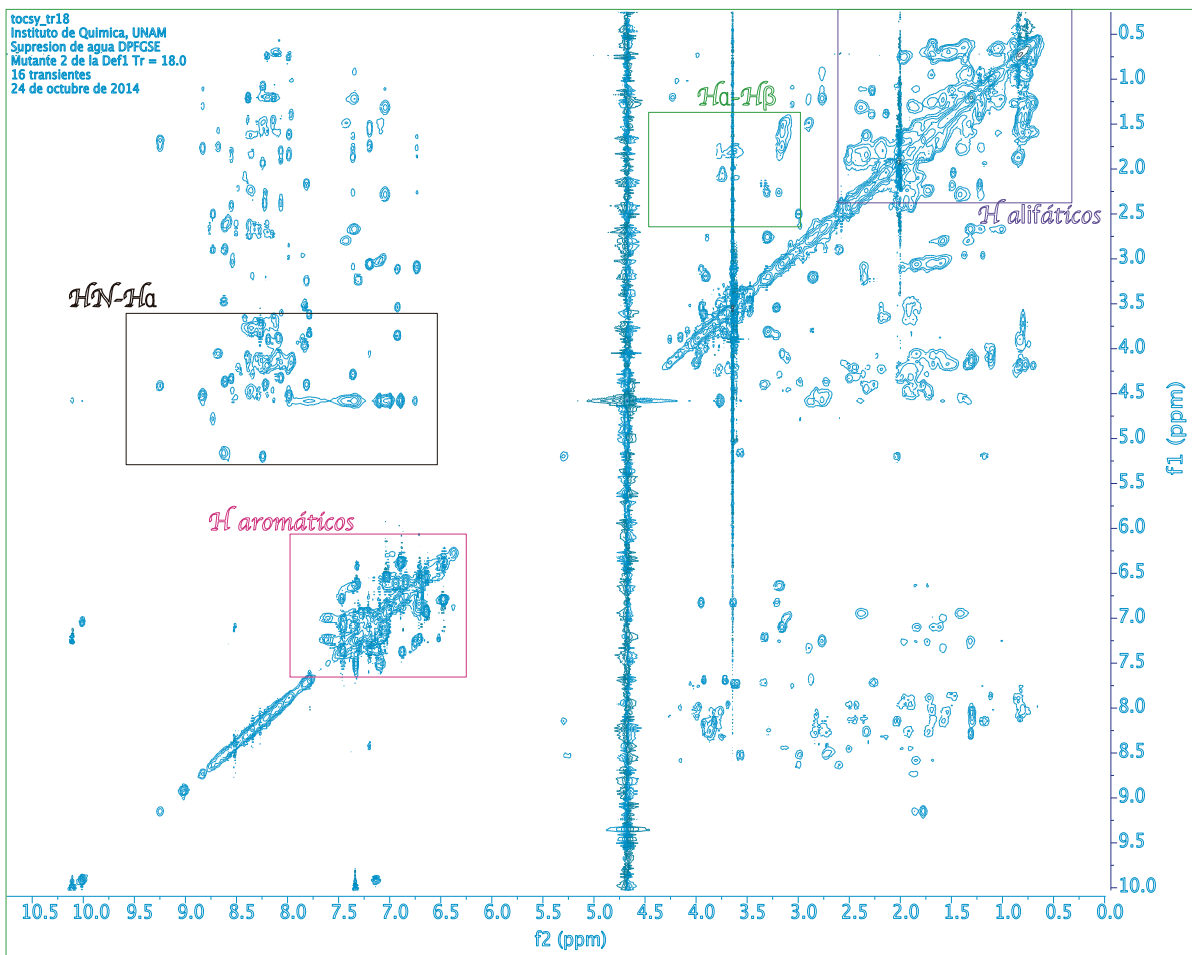
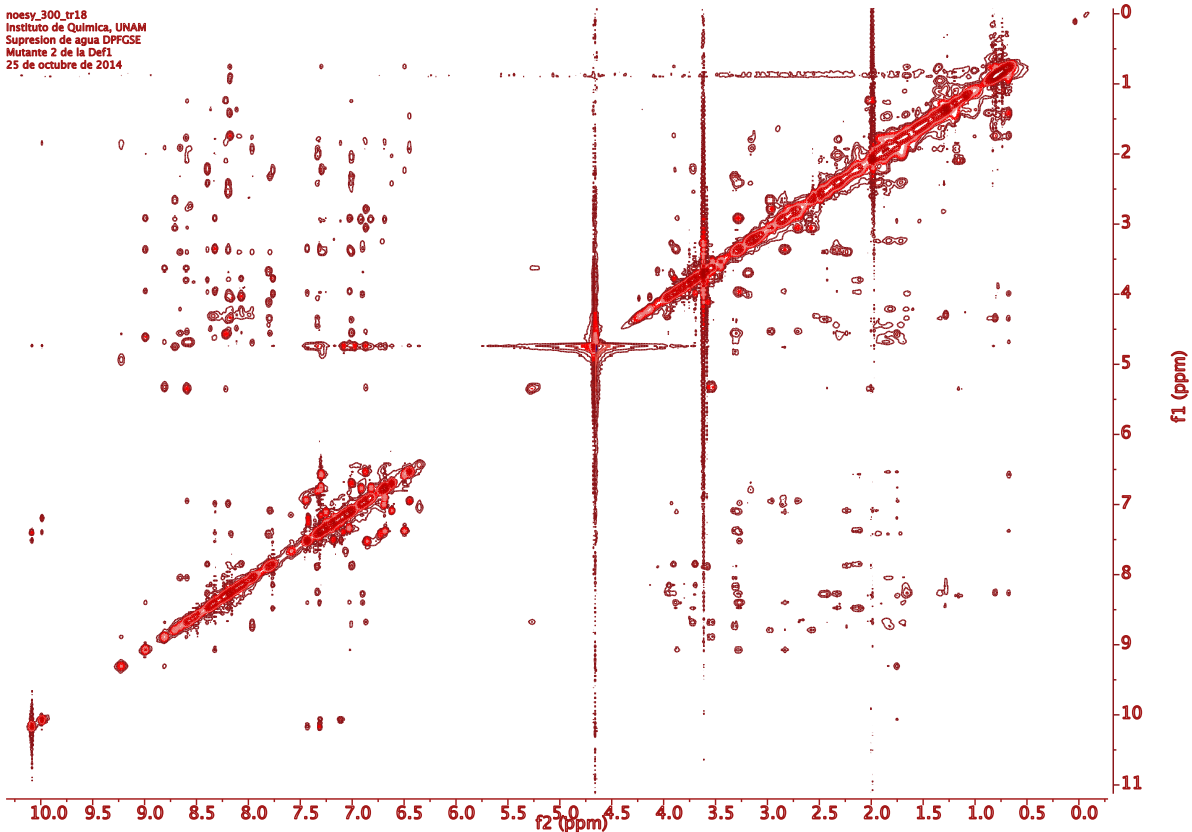


Figura 19.1. Espectro TOCSY de la GM-M2Def1 dónde se muestran las regiones del espectro. En el recuadro negro se observan las señales de correlación entre el protón de amida HN y el protón alfa  $H\alpha$  del mismo aminoácido. En la región marcada en rosa se encuentran las correlaciones entre protones aromáticos. En el recuadro verde se señalan las correlaciones entre los  $H\alpha$  y  $H\beta$  y en el recuadro lila la correlación entre los protones de las cadenas alifáticas.



19.2. Espectro NOESY de la GM-M2D1.

Con las restricciones obtenidas en el experimento NOESY y la secuencia primaria de aminoácidos se realizaron cálculos en el programa CYANA para obtener el arreglo tridimensional de la proteína en estudio. El programa realiza ciclos de cálculos. Cada ciclo toma como base el ciclo anterior hasta completar 7. En cada uno de ellos se generan 500 estructuras de las cuales se seleccionan 20 estructuras que mejor cumplan con las restricciones de distancia y de ángulos de torsión.

En la figura 20 se observan dos partes que no coinciden, las cuales significan regiones muy flexibles en la proteína. Esto se puede apreciar en el inicio de la cadena polipeptídica la cual corresponde a la etiqueta de purificación GM y en el asa formada entre las hebra beta en comparación, la parte que forma la hélice alfa se observa una mejor sobreposición debido a la rigidez del motivo estructural, que se estabiliza por la formación de puentes de hidrógeno.



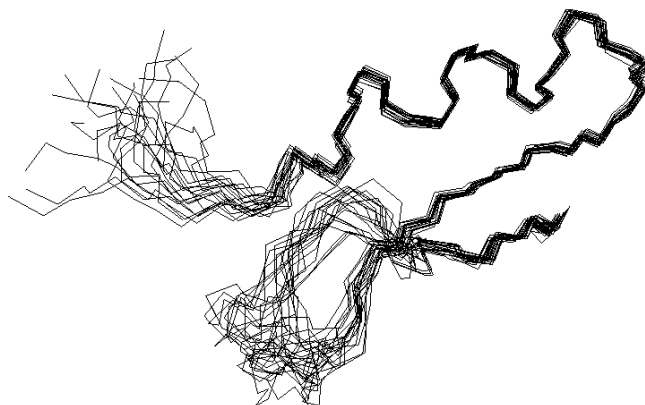


Figura 20. Superposición de las 20 estructuras con menor energía de la GM-M2D1 obtenidas con el programa Cyana .

El cálculo de la estructura se realizó de dos formas la primera indicando la conexión predicha de puentes disulfuro C1-C4, C2-C5, C3-C6. El segundo cálculo se realiza solamente tomando en cuenta las restricciones NOEs calculadas sin indicar la existencia de enlaces disulfuro. Los valores de RMSD calculados del aminoácido 3 al 32 para la estructura sin puentes es 1.81 Å y para la estructura con puentes es 0.66 Å. El valor de RMSD nos indica la divergencia de las coordenadas atómicas entre las 20 estructuras generadas en el cálculo del programa Cyana.

La figura 21 nos muestra que ambos cálculos convergen al mismo motivo estructural este resultado es de gran importancia ya que las restricciones NOE's que se tienen son suficientes para llegar a una estructura terciaria que nos da indicios de que los enlaces disulfuro predichos son correctos.

Sin embargo, la estructura con enlaces disulfuro presenta una mayor estabilidad y rigidez estructural. Las estructuras obtenidas en ambos cálculos se presentan son las siguientes:

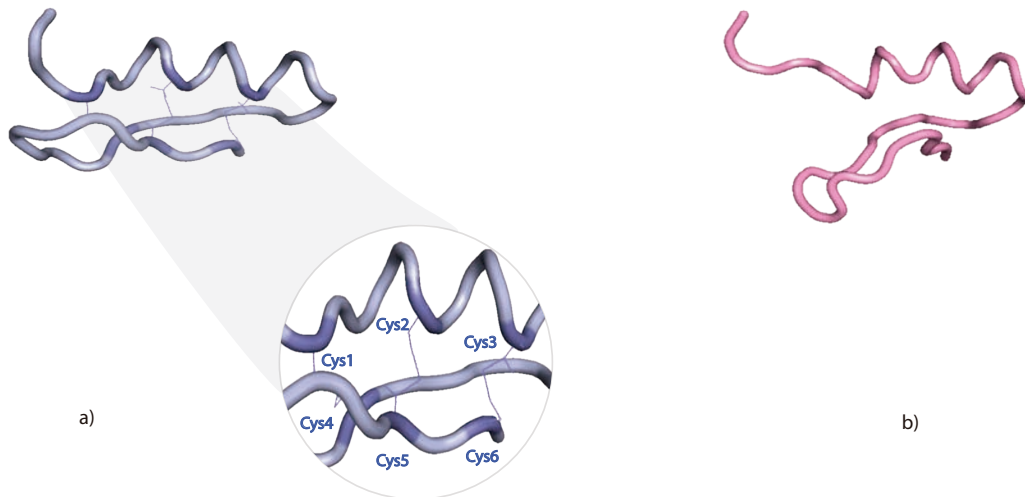
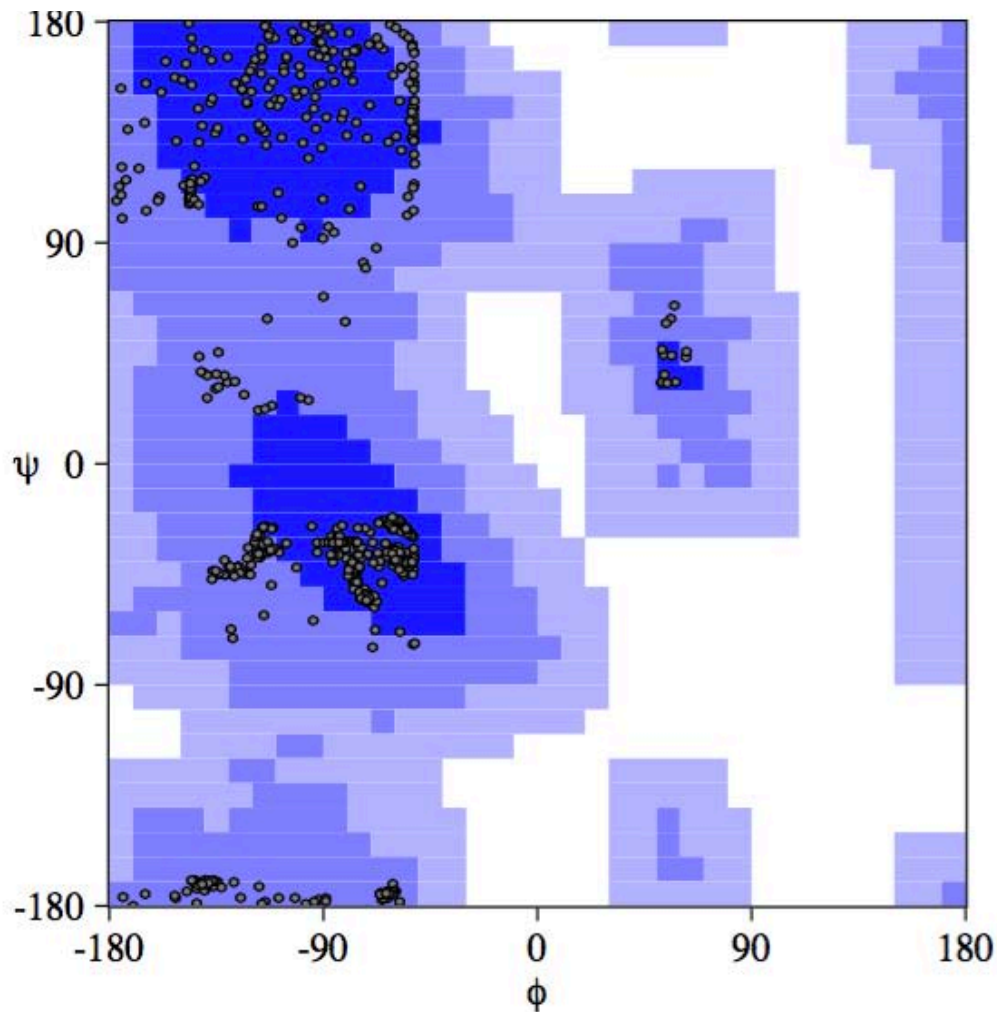


Figura 21. Estructuras del péptido GM-M2D1 calculadas en el programa Cyana con los datos obtenidos mediante la interpretación de los experimentos de RMN a) Estructura obtenida especificando los enlaces disulfuro entre cisteínas b) Estructura obtenida sin indicar la presencia de enlaces disulfuro.

En la figura 22 se presenta el gráfico de Ramachandra en el cual se muestran los ángulos de torsión del enlace peptídico  $\Psi$  y  $\Phi$  para las 20 estructuras generadas en el cálculo de CYANA en el cual 67.1 % se encuentran en regiones muy favorecidas, 32.9 % se encuentran en regiones permitidas y 0.0 % en regiones desfavorables.



67.1% in most favored regions  
 32.9% in additionally allowed regions  
 0.0% in generously allowed regions  
 0.0% in disallowed regions

Figura 22. Gráfico de Ramachandra obtenido para el conjunto de 20 estructuras de menor energía de la GMM2D1. se muestran los ángulos de torsión del enlace peptídico  $\Psi$  y  $\Phi$  para las 20 estructuras generadas en el cálculo de CYANA en el cual 67.1 % se encuentran en regiones muy favorecidas, 32.9 % se encuentran en regiones permitidas y 0.0 % en regiones desfavorables.

En Figura 23 se observan las interacciones NOEs por cada residuo de aminoácido del péptido GM-M2D1(i) para los protones  $1H_N$ ,  $1H_\alpha$  y  $1H_\beta$  con los aminoácidos secuenciales  $(i,i+1)$  y los sucesivos  $(i,i+2)$ ,  $(i,i+3)$  e  $(i,i+4)$  la intensidad de estas es proporcional al grosor de la línea.

Se corroboran las interacciones debidas al plegamiento y motivos estructurales presentes en el péptido analizado.

Por ejemplo en el caso de de la GM-M2D1 la hélice alfa comprende del aminoácido W7 al R16. Lo cual corresponde con interacciones observadas para  $d_{NN}(i,i+1)$ ,  $(i,i+2)$ ,  $d_{\alpha N}(i,i+3)$ ,  $(i,i+4)$ ,  $d_{\beta N}(i,i+1)$ ,  $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$ .



Figura 23. Se muestran las relaciones de las señales NOE's para  $1H\alpha$ ,  $1H\beta$  y  $1HN$  de cada residuo de aminoácido de la secuencia del péptido GM-M2D1.

En la figura 24 a) se muestran las restricciones

NOE's empleadas para la determinación de la estructura terciaria por rango de distancia. Se observa que a corta distancia hay mayor número de restricciones NOE's que a larga distancia. El gráfico b) muestra el número de restricciones a corta mediana y larga distancia por aminoácido. El color blanco indica interacciones NOE intrarresiduales ( $|i-j|=0$ ), el gris claro de corto alcance (entre protones de aminoácidos secuenciales,  $|i-j| = 1$ ), el gris oscuro de mediano alcance ( $1 < |i-j| < 5$ ) y el negro de largo alcance ( $|i-j| \geq 5$ )

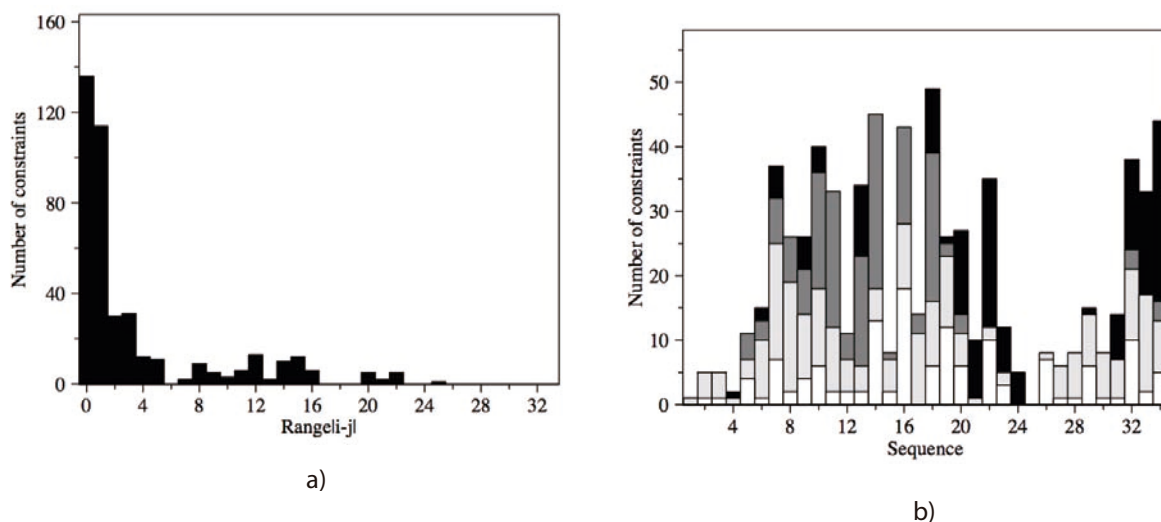


Figura 24 Número de restricciones NOE's empleadas por cada residuo de la secuencia del péptido GM-M2D1 para la obtención de su estructura terciaria.

La estructura de la GM-M2D1 muestra un motivo estructural CS  $\alpha/\beta$ , estabilizado por tres puentes disulfuro con conectividad convencional para las defensinas de insectos, C1-C4, C2-C5 y C3-C6.



Figura 25. Estructura terciaria de la GM-M2D1 muestra un motivo estructural CS  $\alpha/\beta$ , estabilizado por tres puentes disulfuro con conectividad C1-C4, C2-C5 y C3-C6.

En la figura 26. Se muestran los residuos de aminoácidos polares del péptido GM-M2D1 en azul, la mayoría de ellos se encuentran en la parte externa de la proteína, interactuando con moléculas del disolvente.

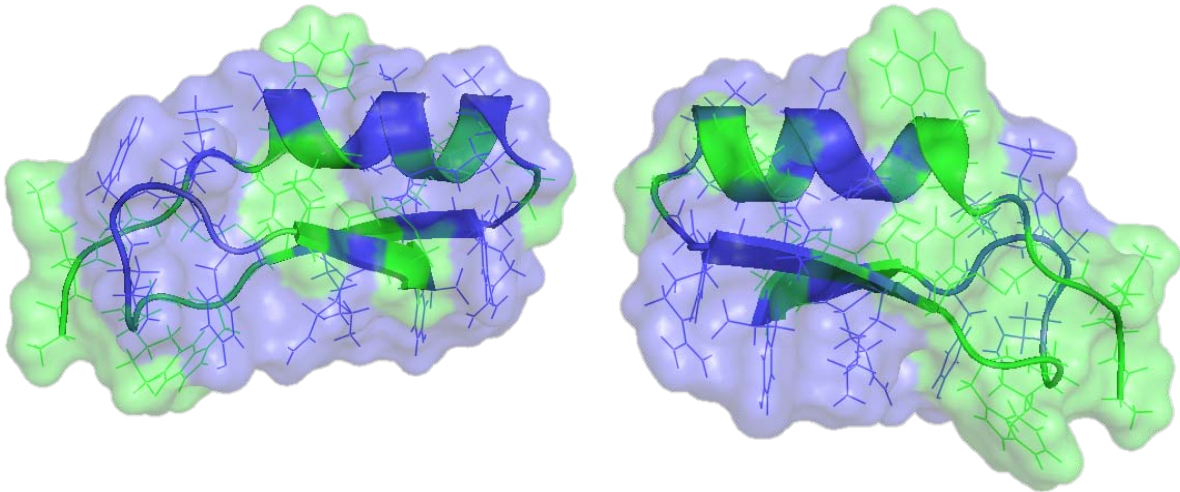


Figura 26. Estructura del péptido GM-M2D1 resaltando en color azul los aminoácidos hidrofílicos y en verde los hidrofóbicos.

El motivo estructural de la GM-M2D1 corrobora que las mutaciones realizadas sobre la GS-DEF1 no alteran la estructura secundaria, al conservar el motivo estructural que consta de una hélice alfa estabilizada mediante tres puentes disulfuro a una hoja beta antiparalela formada por dos hebras. La sobreposición de las estructuras de la GS-Def1, GM-M1D1, GM-M2D1 y GM-M3D1 se muestra en la ilustración 28.

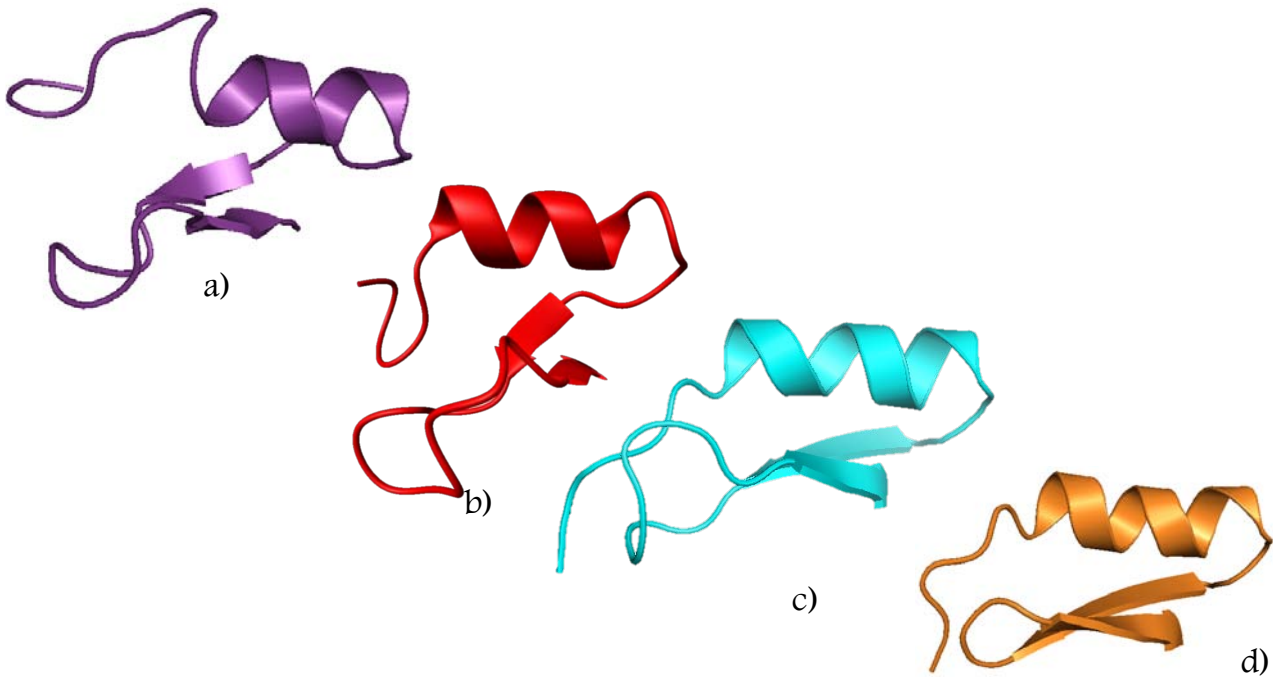


Figura 27. Estructuras terciarias de los péptidos tipo defensina GS-DEF1(a), GM-M1D1 (b), GM-M2D1(c) y la GM-M3D1d) donde se observa en las tres estructuras el motivo estructural CS- $\alpha/\beta$ .

En la figura 28 se muestra la comparación estructural entre los péptidos GS-Def1, GM-M2D1 y GM-M3D1. Se observa que en la estructura de la GM-M2D1 se encuentra mejor estabilizada la hélice alfa que en la estructura de la GS-Def1. Sin embargo, el asa es una región muy flexible que impide la correcta estabilización de las hebras beta de tal modo que al realizar las deleciones que dan origen a la GM-M3D1 se observa que la estructura adquiere mayor estabilidad permitiendo la correcta formación de la hoja beta.

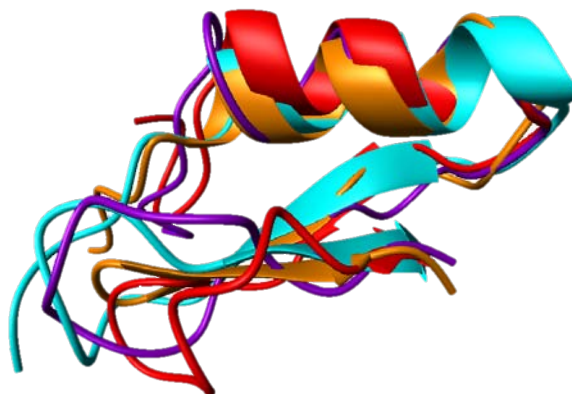


Figura 28. Comparación estructural entre la GS-Def 1 y las mutante GM-M2D1 y GM-M3D1. Se observa que las mutaciones realizadas sobre la defensina 1 no afectan su estructura terciaria.

La figura 29 muestra una comparación entre las superficies de potencial electrostático de a)GS-Def1 b) GM-M2D1 c) GM-M3D1

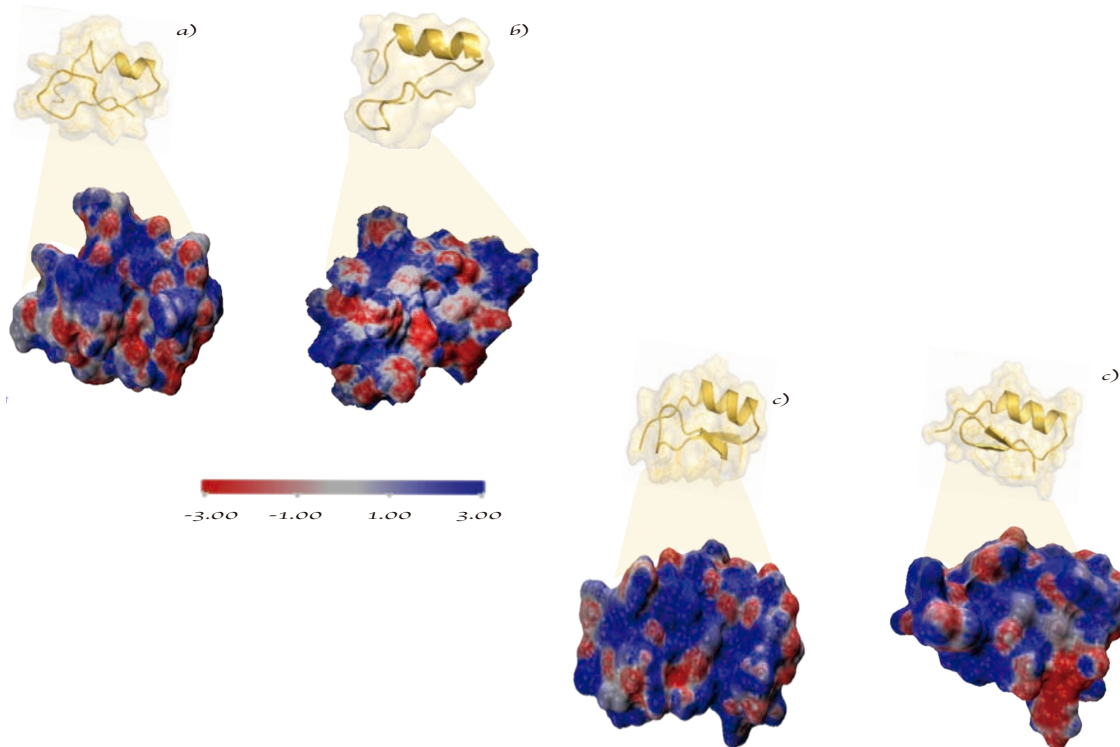


Figura 29. Comparación de las superficies de potencial electrostático para la defensina 1 y las tres mutantes de la misma. Los mapas de potencial fueron calculados en el programa APBS con las estructuras de menor energía en cada caso.

Se observa en la figura 29 que la c) GM-M2D1 presenta una superficie con mayor cantidad de regiones positivas comparada con la a) GS-Def1 y la b) GM-M1D1. La b) GM-M3D1 presenta una superficie negativa amplia. Debido a las diferencias encontradas en los potenciales electrostáticos en las tres proteínas se puede pensar que su actividad tendrá ligeras variaciones, sin embargo, es necesario realizar pruebas específicas con los tres péptidos sobre canales iónicos de potasio para poder corroborar la influencia de las mutaciones en la actividad biológica.

### Conclusiones

La estructura terciaria que presenta la GM-M2D1 está conformada por una hélice alfa estabilizada por tres puentes disulfuro a una hoja beta antiparalela, motivo estructural observado en defensinas de insectos y toxinas bloqueadoras de canales de potasio de la familia alfa-KTx.

Debido a que el motivo estructural exhibido en la GS-Def1 y GM-M3D1 se conserva en la GM-M2D1 se concluye, que las mutaciones y deleciones realizadas sobre la estructura primaria de la GS-Def1 no modifican su estructura terciaria.

### Perspectivas

Realizar corte con Bromuro de cianógeno para obtener la M2D1 libre de la etiqueta de purificación GM.

Realizar pruebas de actividad sobre canales iónicos de potasio, para analizar la influencia de las mutaciones sobre la actividad y corroborar con esto si existe una relación filogenética evolutiva entre defensinas y toxinas bloqueadoras de canales de potasio presentes en el alacrán.



## Bibliografía

[\*]Proteína recombinante M1D1 purificada por el maestro en ciencias químicas David Flores Solis y elucidada estructuralmente por Fátima Carolina Escobedo González.

1. Hernández-Aponte C., Sanchez Jesus s.,Quintero-Hernández V. Vejovine, a new antibiotic from the scorpion venom of *Vaejovis mexicanus* *Toxicon* 2011 57 pp.84–92

2 Cao L. ,Chao D. , Zhongjie L. . Antibacterial Activity and Mechanism of a Scorpion Venom Peptide Derivative In Vitro and In Vivo *PLoS ONE* 2012. 7(7)

3. Ganz T., Defensins: Antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology* 2003 3 pp 710-720

4. Rodríguez de la Vega R. Antimicrobial peptide induction in the haemolymph of the Mexican scorpion *Centruroides limpidus limpidus* in response to septic injury. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2004, 61 pp1507–1519

5. Cociancich S. Purification and characterization of a scorpion defensin a 4 kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insect defensins and scorpion toxins, *Biochemical and biophysical research communications* ,1993 194 pp17-22

6. Zhu S. Experimental Conversion of a Defensin into a Neurotoxin: Implications for Origin of Toxic Function *Molecular Biology and Evolution*. 201431, 3 pp546–559 7. Lehninger. *Principios de Bioquímica* 4ªEd.

8. Voet,Voet *Bioquímica*. Editorial panamericana 3ª Ed

9. Blanco A. *Química Biológica* ed. el ateneo 8ª Ed

10. Creighton, T. *Proteins structures and molecular properties*. W. H. Freeman and Company 1993.

11. Whitford, D., *Proteins structure and function*. John Wiley & Sons 2005.

12. Ganz T., *Defensins: Pharmacology & therapeutics* 1995 66, pp. 191-205,

13.Lehrer R, Ganz T. Defensins of vertebrate animals *Current Opinion in Immunology* 2002, Vol.14 pp 96–102

14. Gutiérrez P. Péptidos Antimicrobianos: Estructura, Función Y Aplicaciones *Actual Biochemical and biophysical research communications* 2003 Vol.25 (78): pp. 5-15,1

15. Castañeda-Casimiro J. Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones . *Alergia asma e inmunología pediátricas* 2009 Vol. 18, Núm. 1 pp 16-29

16. van Dijk A. Avian defensins *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2008 Vol.124 pp 1–18

17. White S. Structure, function, and membrane integration of defensins *Current Opinion*

in Structural Biology 169

18. Corzo Gerardo A selective blocker of Kv1.2 and Kv1.3 potassium channels from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus* biochemical pharmacology 2008 Vol. 76 1142–1154

19. Franco-Bodek, D. Diseño, expresión, purificación y replegamiento para la caracterización por resonancia magnética nuclear de la defensina 1. Tesis de maestría, UNAM (2011)

20 Rodríguez Solano L. Biosíntesis, purificación, replegamiento y caracterización por RMN de una mutante de Def1, con posible actividad bloqueadora de canales de potasio. Tesis de maestría, UNAM (2014)

21. Legros C. Evidence for a new class of scorpion toxins active against K channels *Toxicon* pp1998 375-380

22. Rodríguez de la Vega R. Novel interactions between K<sup>+</sup> channels and scorpion toxins *Trends in Pharmacological Sciences* 2003 Vol.24

23. Cologna C. Investigation of the relationship between the structure and function of Ts2, a neurotoxin from *Tityus serrulatus* venom *Comparative Biochemistry and Physiology Biochemistry and Molecular Biology* 279 (2012) 1495–1504

24. Sørensen H. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli* *Journal of Biotechnology* 115 (2005) 113–128

25. Luque J. *Biología Molecular e ingeniería genética conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud* Harcourt 2006

26. Brondyk WH. *Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein*. 1st ed. Elsevier Inc. 2009:131-47

27. Alberts B. Bruce D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts K.; Watson, J. *Biología Molecular de la Célula*. Tercera Edición en español. s.l. : Omega.

28. Herriot, R *Comparative Biochemistry and Physiology Biochemistry and Molecular Biology*. 46, 642

29. Keeler J. *Understanding NMR spectroscopy*. Segunda edición 2010, Wiley, pp. 181-186, 190-196, 221-226, 241-242.

30. Del Rio-Portilla, F. *Determinación de la Estructura de Proteínas por Resonancia Magnética Nuclear*. Mensaje Bioquímico XXVII, pp. 65–83 (2003).

31. Horst F. *Basic one- and two-dimensional NMR spectroscopy*. Cuarta edición 2005, Wiley-VCH, pp. 1-9, 14-18, 22, 23, 43, 231-236, 246-247, 273- 280.

32. Amber Reference Manual. at <http://ambermd.org/doc12/>. Visitado enero 2014

33. Novagen pET System Manual [en línea, citado el 20 de junio de 2012.] [http://pef.aibn.uq.edu.au/support/material/download/Novagen\\_pET\\_system\\_manual\\_2003.pdf](http://pef.aibn.uq.edu.au/support/material/download/Novagen_pET_system_manual_2003.pdf)

## Anexo

Disolución amortiguadora A: NaCl 150 mM, Tris/HCl 50 mM, pH= 8.

Disolución amortiguadora de lisis: NaCl 150 mM, Tris/HCl 50 mM, Urea 6M pH= 8.

Disolución amortiguadora de elución: NaCl 150 mM, Tris/HCl 50 mM, Imidazol 200mM, pH= 8.

Disolución amortiguadora de corte: NaCl 150 mM, Tris/HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 10mM pH= 8.

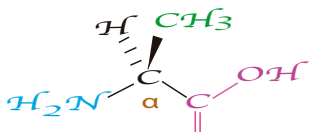
Disolución amortiguadora de tanque. Tris base 25 mM, glicina 0.2 M y SDS 0.1%.

Disolución amortiguadora de carga Tris 50 mM, SDS 2% w/v, Glicerol 10% w/w,  $\beta$ -Mercaptoetanol 12.5 mM, Azul de Bromofenol 0.02% w/v

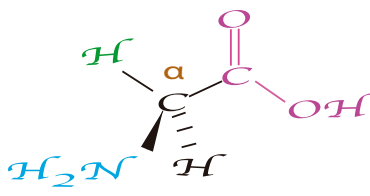
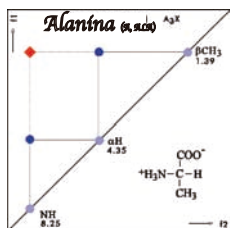
Medio Luria Bertani (LB). NaCl 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y Triptona 10 g/L pH=7.0.

*Silver Blue*. Azul de coomasie G-250 0.025%, ácido fosfórico 10%, metanol 20% y sulfato de amonio 10 %.

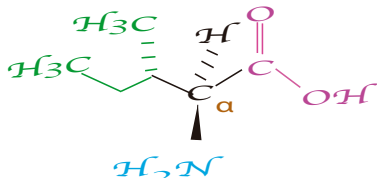
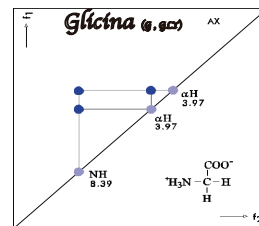
Estructura, clasificación y sistema de espines de los aminoácidos proteicos.  
 Aminoácidos con cadenas laterales alifáticas no polares



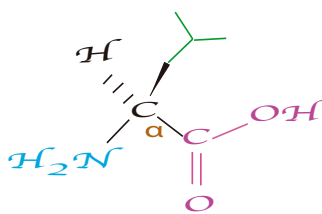
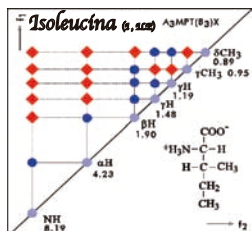
Alanina  
 A  
 ALA



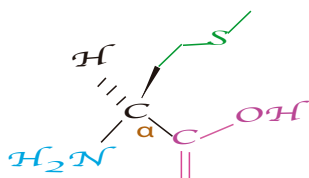
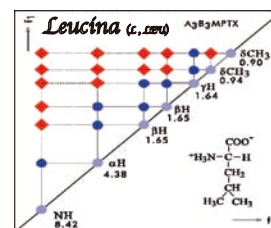
Glicina  
 G  
 GLY



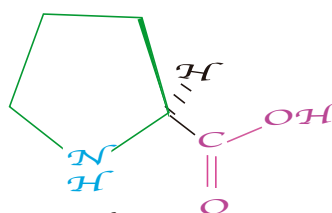
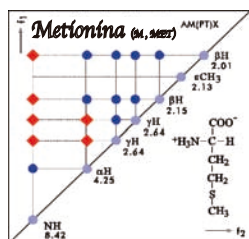
Isoleucina  
 I  
 ILE



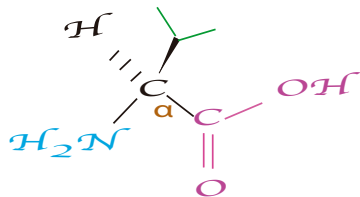
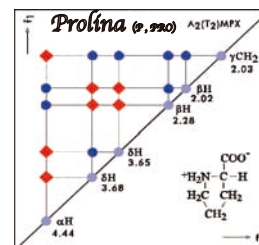
Leucina  
 L  
 LEU



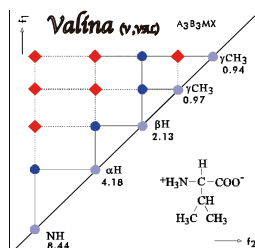
Metionina  
 M  
 MET



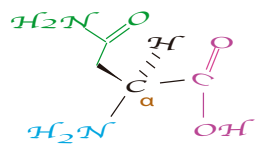
Prolina  
 P  
 PRO



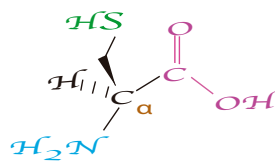
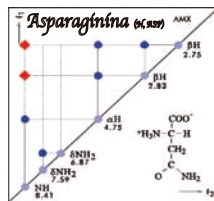
Valina  
 V  
 VAL



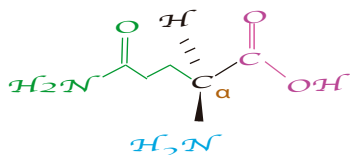
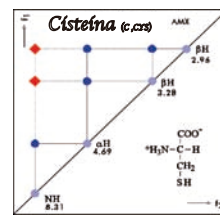
Aminoácidos con cadenas laterales polares sin carga



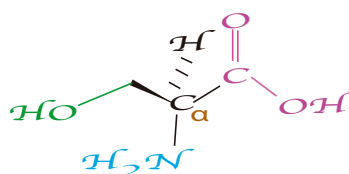
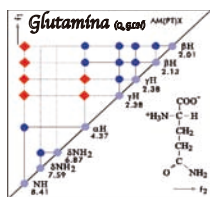
Asparaginina  
N  
ASN



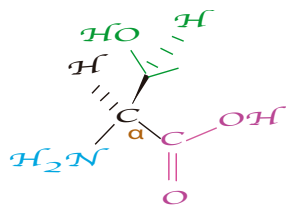
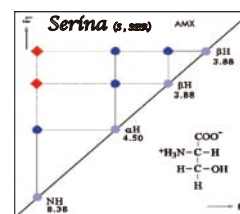
Cisteína  
C  
CYS



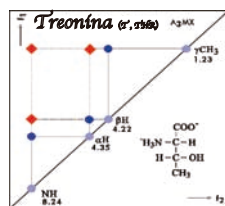
Glutamina  
Q  
GLN



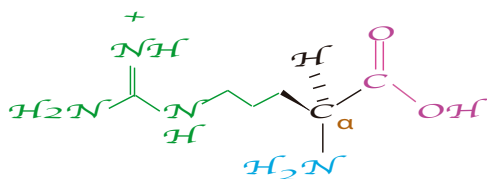
Serina  
S  
SER



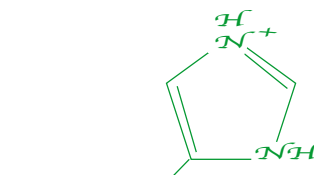
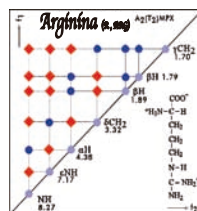
Treonina  
T  
THR



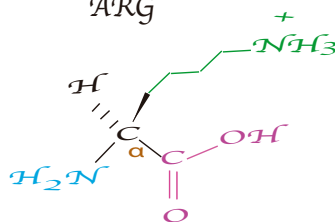
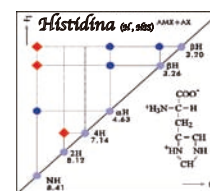
Aminoácidos con cadenas laterales polares con carga +



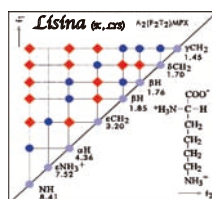
Arginina  
R  
ARG



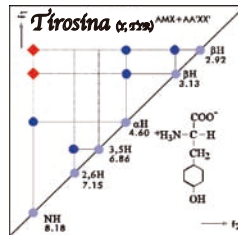
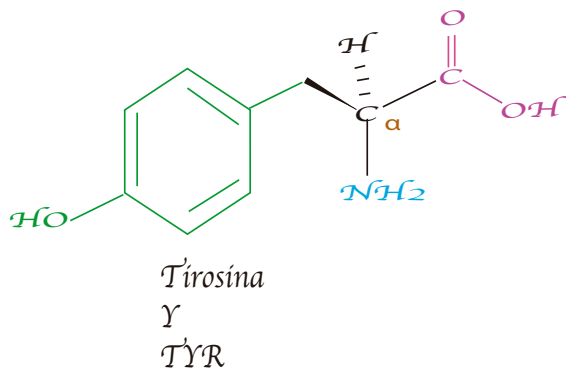
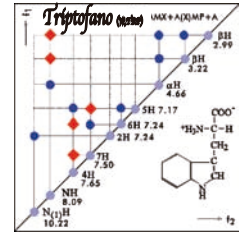
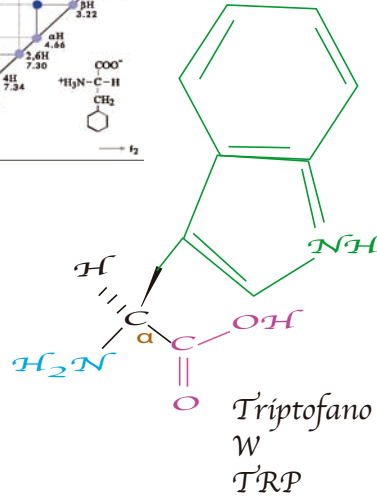
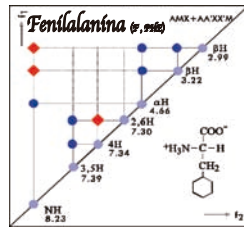
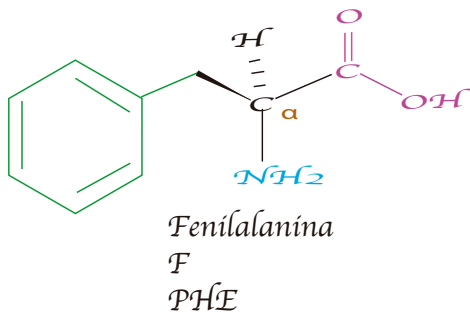
Histidina  
H  
HIS



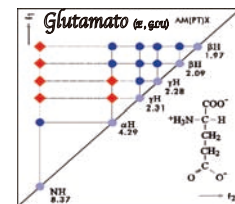
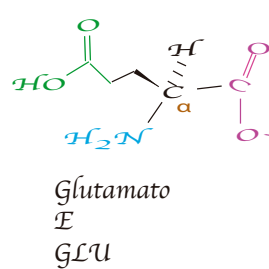
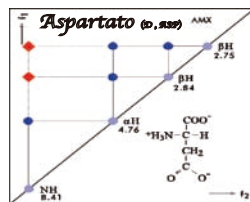
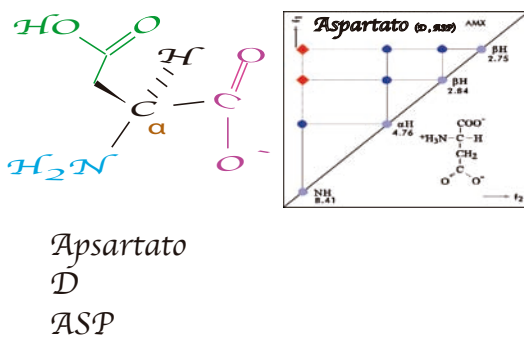
Lisina  
K  
LYS



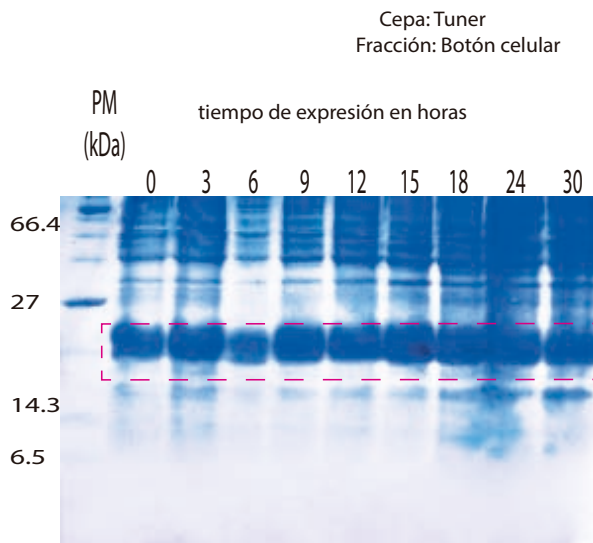
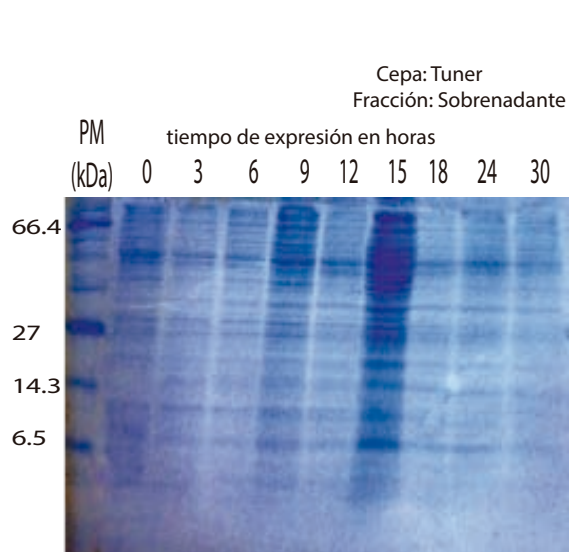
Aminoácidos con cadenas laterales aromáticas



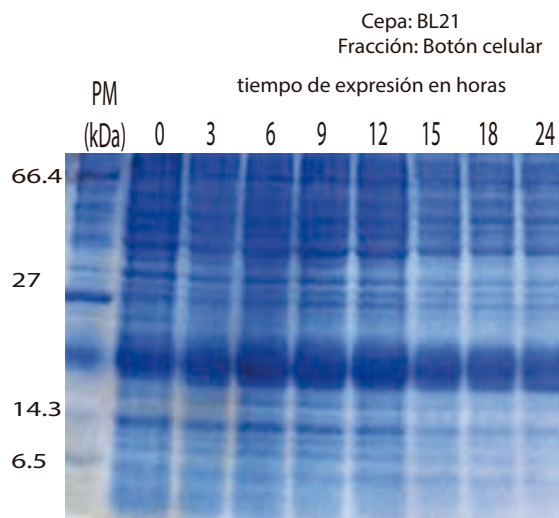
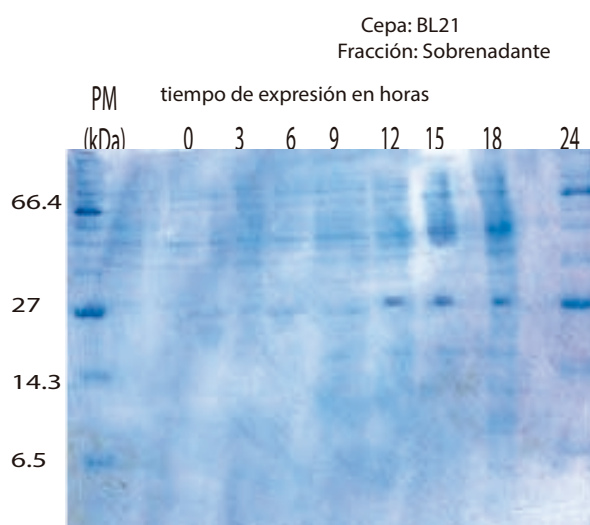
Aminoácidos con cadenas polares con carga -



*Geles de cinéticas de expresión*



Cinética de expresión de la proteína de fusión de la M2D1 en la cepa Tuner a la izquierda la fracción sobrenadante y a la derecha en el botón celular.



Cinética de expresión de la proteína de fusión de la M2D1 en la cepa BL21 a la izquierda la fracción sobrenadante y a la derecha en el botón celular.

## Características de las proteínas de fusión GS-Def1, GM-M1D1, GM-M2D1 y GM-M3D1

	PF Def1	GS-Def1	PF M1D1	GM-M1D1	PF M2D1	GM-M2D1	PF M3D1	GM-M3D1
Número de aminoácidos	193	34	193	34	193	34	190	31
pI teórico	6.53	8.65	6.78	8.9	6.78	8.89	6.78	9.02
Fórmula	C926H142 9N259O27 7S14	C170H243 N49O50S6	C925H143 6N260O27 5S15	C169H250 N50O48S7	C932H1443 N259O275S 14	C173H251 N49O48S7	C912H141 5N255O27 0S14	C156H229 N45O43S6
Total de átomos	2905	518	2911	524	2923	528	2866	479
Peso molecular	21070.9	3965.4	21080	3974.5	21125.1	4009.6	20720.6	3615.1
Coefficiente de extinción molar a 280 nm ( $M^{-1} cm^{-1}$ )	30940	16960	29950	15845	30940	16960	29450	15470
Mutación realizada	-	-	S2M,Y20K		Q32Y		$\Delta$ IQY24-26	