
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS

BIOSÍNTESIS, PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL POR RMN DE LA TOXINA DE ALACRÁN Ts16

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. DAVID FLORES SOLÍS

TUTOR

DR. JOSÉ FEDERICO DEL RÍO PORTILLA

AÑO

2012



Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo y solemnemente agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México. Gracias a la estoica y noble UNAM por todas esas cosas de inconmensurable valor que a todos sus alumnos y a México nos continúa otorgado.

El siguiente agradecimiento es para el Dr. José Federico del Río Portilla, mi tutor en esta maestría. Durante el tiempo que he estudiado bajo la supervisión del Dr. Federico he tenido la fortuna de observar y disfrutar de la gran paciencia, inteligencia, liderazgo y, sobre todo, el gran humanismo que posee. Gracias Federico por todo el empeño y dedicación en mi formación; toda mi admiración y agradecimiento para ti.

Agradezco el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del programa de becas para estudios de posgrado (becario N° **240052**).

Le agradezco a la Dra. Patricia Cano Sánchez (técnico académico a cargo del laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Química UNAM) por todas sus valiosas aportaciones a este trabajo y por todos sus consejos.

A cada uno de los sinodales les agradezco infinitamente todo el tiempo y esfuerzo invertido en la revisión de esta tesis de maestría: Dra. Adela Rodríguez Romero, Dr. Rogelio Rodríguez Sotres, Dr. Armando Ariza Castolo, Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros y Dr. Luis Fernando Olguín Contreras.

Parte de este proyecto no podría haberse realizado sin el apoyo económico brindado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) a través del proyecto **IN2051110**. Agradezco todo el apoyo proporcionado a este trabajo de investigación.

Agradezco nuevamente al CONACyT por el soporte económico a través del proyecto de investigación número **59297**.

Por mi raza hablará el espíritu
Q. David Flores Solís
Ciudad Universitaria, México D. F.
06 de Enero de 2012

Lugar de trabajo, publicación y exposiciones

Este trabajo se realizó en el Instituto de Química UNAM en los siguientes laboratorios:

- Química de Biomacromoléculas1
- Biología Molecular.

Los resultados de esta tesis forman parte del artículo “New tricks of an old pattern: structural versatility of scorpion toxins with common cysteine spacing”. En prensa, aceptado para su publicación en la revista “The Journal of Biological Chemistry” el 23 de diciembre de 2011.

Los avances y resultados de este trabajo fueron presentados en:

- QuimiUNAM 2011. En la modalidad de cartel: “Determinación estructural por RMN de la proteína Ts16”.
- Simposio Interno 2011 del Instituto de Química UNAM. En la modalidad de exposición oral: “Expresión, purificación, caracterización y determinación estructural de la toxina de alacrán T16”.

Contenido

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	VII	3.2 Purificación	15
<hr/>		3.2.1 Aislamiento del extracto celular	15
LISTA DE FIGURAS	IX	3.2.2 Corte con trombina	15
<hr/>		3.2.3 Cromatografía líquida de alta eficiencia	15
LISTA DE TABLAS	X	3.3 Caracterización	16
<hr/>		3.3.1 Determinación del peso molecular y presencia de puentes disulfuro	16
1 RESUMEN	1	3.4 Determinación estructural por resonancia magnética nuclear	16
<hr/>		3.4.1 Asignación secuencial de los sistemas de espín	16
2 ANTECEDENTES	3	3.4.2 Cálculo de ángulos de torsión	18
<hr/>		3.4.3 Refinamiento de la estructura por dinámica molecular	18
2.1 Toxinas de alacrán y toxinas bloqueadoras de canales iónicos	3	4 RESULTADOS	19
2.2 La toxina κ-BUTX-Tt2b	4	<hr/>	
2.3 La proteína Ts16 del alacrán <i>Tityus serrulatus</i>	5	4.1 Obtención del gen Ts16-pET32a	19
2.4 Producción de proteínas recombinantes	6	4.2 Expresión en <i>Escherichia coli</i>	19
2.4.1 La reacción en cadena de la polimerasa	6	4.3 Purificación	21
2.4.2 Transformación y expresión de proteínas recombinantes	7	4.3.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia	23
2.5 Técnicas para la purificación de proteínas	7	4.4 Caracterización	24
2.5.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia para proteínas	8	4.4.1 Espectrometría de masas MALDI-TOF	24
2.6 Caracterización de proteínas recombinantes	8	4.5 Determinación estructural por resonancia magnética nuclear	26
2.7 Determinación estructural de proteínas por resonancia magnética nuclear	9	4.5.1 Refinamiento de la estructura	29
2.7.1 La utilidad de las propiedades nucleares en las proteínas	9	5 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	32
2.7.2 Refinamiento por dinámica molecular de estructuras de proteína	11	<hr/>	
2.8 Superficie de potencial electrostático	11	5.1 Biosíntesis de Ts16	32
2.9 Hipótesis	11	5.2 Purificación	32
2.10 Objetivos	11	5.3 Caracterización	33
3 DISEÑO EXPERIMENTAL	13	5.4 Determinación estructural por RMN	34
<hr/>		5.4.1 Una nueva familia de KTx	41
3.1 Biosíntesis de Ts16	13	6 CONCLUSIÓN	42
3.1.1 Obtención del plásmido Ts16-pET32a	13	<hr/>	
3.1.2 Producción de Ts16 en <i>Escherichia coli</i>	14	7 BIBLIOGRAFÍA	43
		<hr/>	

APÉNDICE	46
<hr/>	
A.1. Medios de cultivo y disoluciones	46
A.2. Datos complementarios de la determinación estructural por RMN de la proteína Ts16	46

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Abreviatura	Significado
^1H	Hidrógeno
^{13}C	Carbono trece
^{15}N	Nitrógeno quince
$^1\text{H}^\alpha$	Protón de alfa de un aminoácido.
$^1\text{H}^\beta$	Protón beta en la cadena lateral de un aminoácido.
$^1\text{H}^\text{N}$	Protón de amida de un aminoácido.
^2H ó D	Deuterio
ADN	Ácido DesoxirriboNucleico
ARN	Ácido RiboNucleico
PCR	Polimerase Chain Reaction
PDB	Protein Data Bank
BLI-III	Buffer de Lisis I-III
BMRB	Biological Magnetic Resonance Bank
CAMQ	Cromatografía de Afinidad Metal Quelato
COSY	COrelated SpectroscopY
C_n	Numeración relativa de las cisteínas en una proteína. Las “n” cisteínas se enumeran en orden creciente del extremo amino al carboxilo, sin importar el número de residuo que ocupan en la secuencia de la proteína: $\text{C}_1, \text{C}_2, \dots, \text{C}_n$. La letra C hace referencia al código de una letra para las cisteínas.
CS- α/α	Cysteine Stabilized alpha-alpha motif
CS- α/β	Cysteine Stabilized alpha-beta motif
δ	Desplazamiento químico.
D^c	Receptividad referenciada a carbono trece

Abreviaturas y acrónimos

DPFGCE	Double Pulsed Field Gradient Spin Echo
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
KTx	Toxina bloqueadora de canales iónicos de potasio. O bien, cuando es presidido por una letra griega, familia de toxinas bloqueadoras de canales iónicos de potasio.
KTx's	Toxinas bloqueadora de canales iónicos de potasio
LB	Luria Bertani
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight
Mhz	Mega Hertz
nOe	nuclear Overhauser effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
PMSF	PhenylMethylSulfonyl Fluoride
ppm	partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMSD	Root Mean Square Deviation
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrilamide Gel Electrophoresis
TCEP	Tris (2-CarboxyEthyl) Phosphine
TFA	TriFluoroacetic Acid
TOCSY	TOfal Correlated Spectroscopy

LISTA DE FIGURAS

Figura	página
Figura 2.1	5
Figura 2.2	5
Figura 2.3	10
Figura 3.1	14
Figura 4.1	20
Figura 4.2	20
Figura 4.3	22
Figura 4.4	22
Figura 4.5	23
Figura 4.6	24
Figura 4.7	25
Figura 4.8	26
Figura 4.9	27
Figura 4.10	28
Figura 4.11	31
Figura 4.12	31
Figura 5.1	36
Figura 5.2	37
Figura 5.3	37
Figura 5.4	38
Figura 5.5	39
Figura 5.6	40

LISTA DE TABLAS

Tabla	página
Tabla 3.1	14
Tabla 4.1	26
Tabla 4.2	29
Tabla 4.3	30
Tabla A.1	46

1 RESUMEN

En la naturaleza es posible encontrar una gran variedad de organismos que son capaces de sintetizar compuestos químicos cuya finalidad es ser utilizados en contra de otros seres vivos. Estas sustancias sintetizadas de forma natural reciben el nombre de toxinas. La evolución ha orillado a algunos organismos a la utilización de estas sustancias, al grado que algunos de ellos han perfeccionado su capacidad de síntesis para producir y utilizar toxinas sumamente eficaces en la captura o aniquilación de sus presas⁽¹⁾. En contraste, existen también organismos que utilizan las toxinas que producen para defenderse de sus enemigos naturales^(2; 3). A través de la observación de estos acontecimientos en la naturaleza, nace el interés por estudiar las características de las sustancias tóxicas que provocan disturbios en los organismos que entran en contacto con ellas. De toda la variedad de toxinas existentes, las provenientes del veneno de los alacranes causan especial interés en la comunidad científica⁽⁴⁾.

Los alacranes son uno de los organismos que utilizan de manera formidable las toxinas que ellos mismo sintetizan, ocupándolas principalmente para la depredación⁽¹⁾. El veneno de los alacranes es la fuente principal donde se pueden encontrar las toxinas que este organismo utiliza. Las toxinas que se han logrado aislar del veneno de alacrán han demostrado ser altamente específicas y afines a alguno(s) de los canales iónicos que modulan las respuestas fisiológicas en mamíferos^(5; 6; 7). De estos hechos se desprende el interés de la comunidad científica por estudiar este tipo de toxinas, debido a la posibilidad de desarrollar aplicaciones biotecnológicas a partir del conocimiento y comprensión de estas moléculas^(4; 7). Para estos fines, el estudio estructural de las toxinas es un aspecto fundamental para identificar y describir la estrecha relación que existe entre la estructura tridimensional de una proteína y las propiedades químicas responsables de modular la actividad biológica.

El objetivo primordial del trabajo descrito en esta tesis fue la determinación estructural, por resonancia magnética nuclear (RMN), de la proteína Ts16 recombinante; descubierta en el veneno del alacrán Brasileño *Tityusserrulatus*⁽⁸⁾. Comparativamente, la proteína Ts16 posee un alto grado de homología (86.0 % de identidad) con la toxina κ -BUTX-Tt2b^(9; 10) aislada originalmente del veneno del alacrán argentino *Tityustrivittatus*. Esta última proteína presenta una estructura tridimensional interesante, ya que su conformación es distinta al tipo de plegamiento comúnmente observado en las toxinas bloqueadoras de canales iónicos de

potasio (KTx's*) con 6 cisteínas⁽¹¹⁾. La toxina κ -BUTX-Tt2b presenta un motivo estructural formado por dos segmentos de hélice alfa interconectándose por un asa, además de ser estabilizado por puentes disulfuro. A lo anterior se le conoce como un motivo estructural alfa-alfa estabilizado por puentes disulfuro (en inglés "Cysteine Stabilized alpha - alpha motif"; abreviado CS- α/α). Por este motivo, se planteó comprobar por RMN la posibilidad de hallar similitud estructural entre Ts16 recombinante y la toxina κ -BUTX-Tt2b. Al corroborar la existencia del motivo estructural CS- α/α en ambas KTx's se podría llegar a plantear la existencia de una nueva familia de KTx's aisladas del veneno de alacrán.

* Para referirse a una sola "toxina bloqueadora de canales iónicos de potasio", en este trabajo se utilizará la abreviatura KTx para el singular y cuando se utilice para especificar una familia, la abreviatura siempre vendrá prescindida por una letra griega.

2 ANTECEDENTES

2.1 Toxinas de alacrán y toxinas bloqueadoras de canales iónicos

Los venenos de alacrán son mezclas complejas de sustancias tóxicas que afectan de forma nociva, y en ocasiones letal, a los organismos que entran en contacto con estas sustancias. Las toxinas aisladas y caracterizadas del veneno de los alacranes son toxinas de naturaleza proteica y se especializan en afectar selectivamente a alguno de los canales iónicos de K^+ , Na^+ , Ca^{2+} y Cl^- ⁽¹⁾. En concreto, el veneno de los alacranes es una fuente rica de toxinas cuyo blanco de acción son los canales de K^+ y en menor proporción los canales iónicos de Na^+ ⁽⁶⁾. Según su mecanismo de acción, estas toxinas se denominan bloqueadoras de canales iónicos, ya que inhiben el paso de los iones respectivos a través de la membrana celular.

De forma general, las proteínas identificadas del veneno de alacrán como toxinas bloqueadoras de canales iónicos de Na^+ , son proteínas desde 58 hasta 76 aminoácidos que contienen de 3 a 4 puentes disulfuro que interconectan los principales elementos de estructura secundaria⁽¹²⁾. Por otro lado, las toxinas bloqueadoras de canales iónicos de K^+ (KTx) se clasifican en 4 familias^(13; 14): alfa-KTx (α -KTx), beta-KTx (β -KTx), gamma-KTx (γ -KTx) y kappa-KTx (κ -KTx).

Las α -KTx son proteínas de 23 a 43 aminoácidos cuya estructura cuenta con la presencia de 2 a 4 puentes disulfuro, de los cuales 2 de ellos unen al segmento de hélice alfa con una de las hebras de la hoja β presente en la estructura tridimensional de esta familia. La conformación espacial anterior es mejor conocida como un motivo estructural alfa beta estabilizado por cisteínas (CS- α/β) y es el motivo estructural más recurrente en las KTx producidas por los alacranes^(14; 15).

La familia de β -KTx está formada por proteínas de aproximadamente 60 aminoácidos y son conocidas como toxinas “de cadena larga”. En esta familia se han determinado los puentes disulfuro presentes en las toxinas con motivo estructural CS- α/β . A la fecha de la escritura de este trabajo (noviembre de 2011) no se cuenta con el reporte de la estructura tridimensional de algún miembro de esta familia⁽¹⁶⁾.

Las γ -KTx son toxinas bloqueadoras de los canales de potasio hERG⁽¹⁵⁾. Se componen de 36 a 46 aminoácidos con la presencia de 3 ó 4 puentes disulfuro. Las proteínas de esta familia de KTx's, al igual que la primer familia descrita, adoptan el motivo estructural CS- α/β .

Por último, la κ -KTx es la familia de toxinas bloqueadoras de canales iónicos de K^+ de más reciente descubrimiento y por ello la menos conocida^(17; 18; 19; 20). Las proteínas de esta familia muestran la presencia de dos hélices alfa como elementos de estructura secundaria. Esta disposición espacial hélice alfa – asa – hélice alfa estabilizado por cisteínas, es mejor conocida como un motivo estructural CS- α/α . Antes de la determinación estructural de la κ -BUTX-Tt2b (con 3 puentes disulfuro), las proteínas conocidas dentro de esta familia contenían únicamente 2 puentes disulfuro. Los únicos miembros conocidos de esta familia provenían de alacranes del género *Heterometrus*⁽¹⁸⁾ y *Opisthacanthus*^(19; 20). Las κ -KTx han probado tener una actividad relativamente pobre en los blancos de acción^(19; 20), a pesar de contar con la diada funcional tirosina y lisina característica en otras toxinas activas contra los canales de K^+ ⁽²¹⁾. Sobre esta familia se sabe poco hasta el momento, siendo aún una incógnita la relación que guarda su estructura tridimensional y la función biológica de esta última familia de proteínas.

Es importante hacer énfasis sobre la variedad de plegamientos identificados en las KTx aisladas de los venenos de alacrán. Tal variedad estructural parece parcialmente inalterable debido a la presencia y configuración de los puentes disulfuro. A pesar de esta característica estructural, cada κ -KTx posee una gran especificidad en lo que a su actividad biológica se refiere⁽⁴⁾.

2.2 La toxina κ -BUTX-Tt2b

La toxina κ -BUTX-Tt2b fue identificada por primera ocasión en el veneno del alacrán de Argentina *Tityustrivittatus*⁽¹¹⁾. Esta proteína compuesta por 29 aminoácidos fue clasificada dentro de la subfamilia 20 de α -KTx⁽²²⁾. Su actividad bloqueadora contra los canales de K^+ ha sido medida con la toxina nativa (aislada del veneno), teniendo un efecto bloqueador sobre los canales Shaker-IR y hKv1.2⁽¹¹⁾. La estructura de la toxina κ -BUTX-Tt2b, resuelta por RMN, exhibe el motivo estructural CS- α/α con la siguiente conectividad de puentes disulfuro: C_1 - C_5 , C_2 - C_4 y C_3 - C_6^\dagger (Figura 2.1). La conformación de la toxina resulta estructuralmente peculiar y sumamente contrastante al compararla con el motivo estructural hélice alfa – asa – hebra beta estabilizado por puentes disulfuro (en inglés “Cysteine Stabilized alpha - beta motif”; abreviado CS- α/β), adoptado por la mayoría de las toxinas bloqueadoras de K^+ producidas por los alacranes⁽⁴⁾.

[†] La letra mayúscula **C** hace una referencia al código de una letra para el aminoácido cisteína. El subíndice es relativo al número de cisteína dentro de la secuencia de aminoácidos en la proteína referida. De este modo C_3 - C_6 describe la conectividad, mediante un puente disulfuro, entre la tercera y sexta cisteína dentro de la secuencia de aminoácidos en la proteína a la cual se hace referencia.

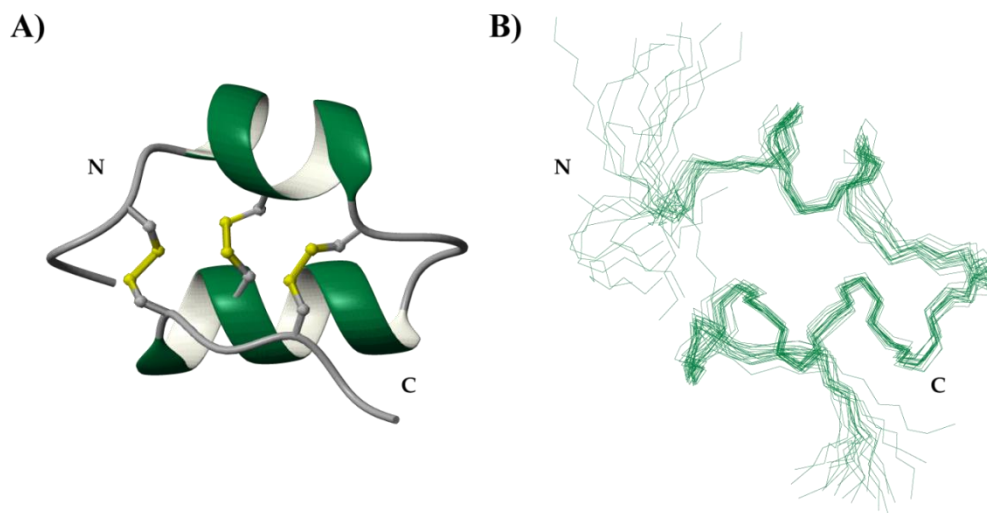


Figura 2.1. Estructura de la toxina κ -BUTX-Tt2b resuelta por RMN⁽¹¹⁾. **(A)** Representación de listones de la estructura de menor energía de las 20 estructuras de RMN. **(B)** Sobre posición de las 20 estructuras determinadas por RMN y reportadas en el Protein Data Bank. En ambos incisos el extremo amino terminal se representa con la letra “N”, mientras que el carboxilo terminal es señalado con la letra “C”. En el inciso **A**, en amarillo se señalan los enlaces disulfuro que estabilizan la estructura de la toxina.

Previo a la determinación de la κ -BUTX-Tt2b, los motivos estructurales CS- α/β parecían estar dictados por la configuración y disposición espacial de los puentes disulfuro dentro de las toxinas^(4; 23). Sin embargo, la determinación estructural de la κ -BUTX-Tt2b aporta evidencia experimental para debatir si la disposición de las cisteínas y los puentes disulfuro son la fuerza directriz del plegamiento de las KTx’s aisladas del veneno de los alacranes⁽¹¹⁾.

2.3 La proteína Ts16 del alacrán *Tityusserrulatus*

La proteína Ts16 es uno de los componentes del veneno del alacrán Brasileño *Tityusserrulatus*⁽⁸⁾. La Ts16 se compone por 29 aminoácidos y presenta el 86.0 % de identidad con la toxina κ -BUTX-Tt2b⁽⁹⁾. La estructura de la Ts16, así como su configuración de puentes disulfuro, ha sido estimada por homologías llegando a proponerse que pertenece al grupo de toxinas con un motivo estructural CS- α/β y la configuración clásica⁽⁸⁾ para de los pares de cisteínas: C₁-C₄, C₂-C₅ y C₃-C₆.

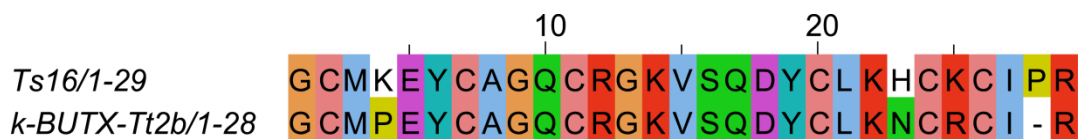


Figura 2.2. Alineamiento (MAFFT⁽²⁴⁾) de las secuencias primarias de Ts16 y la toxina κ -BUTX-Tt2b. La identidad entre las proteínas alineadas es del 86.0 %.

En el alineamiento entre las secuencias primarias de la κ -BUTX-Tt2b y la Ts16, mostrado en la Figura 2.2, se resalta la similitud entre ellas, así como las 4 diferencias importantes. Los cambios de κ -BUTX-Tt2b a Ts16 son: En el sitio 4 del alineamiento se intercambia prolina por lisina; en el sitio número 23, la asparagina es sustituida por una histidina; la arginina del sitio número 25 se sustituye por lisina y la última diferencia es la presencia de una prolina dentro de la secuencia de Ts16, inexistente en la κ -BUTX-Tt2b.

Por la alta similitud en las secuencias de aminoácidos, la Ts16 se puede emplear para corroborar si otra proteína posee el mismo plegamiento de la κ -BUTX-Tt2b. Para este fin, la confirmación del plegamiento puede verificarse con la obtención de proteína del organismo productor o mediante la producción de la proteína recombinante Ts16.

2.4 Producción de proteínas recombinantes

Las proteínas obtenidas por la expresión de genes producto de un proceso de recombinación genética, son llamadas proteínas recombinantes. En biología molecular, se utiliza la ingeniería genética para generar material genético que puede usarse en la producción de proteínas^(25; 26), además de otras aplicaciones.

La biosíntesis de proteínas recombinantes es una de las estrategias más recurrentes para la producción de proteínas cuya finalidad, entre otras, es el estudio estructural. Esta estrategia implica la manipulación e introducción del material genético de los microorganismos productores, subsecuentemente induciendo en ellos la expresión de los genes insertados, específicos de las proteínas de interés científico o biotecnológico^(25; 26).

2.4.1 La reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (**Polymerase Chain Reaction; PCR**) es la metodología más usada para amplificar fragmentos de ADN. Con algunas variaciones, esta metodología se puede usar para modificar (mutar) regiones específicas de ADN. Esta reacción permite aprovechar la replicación del material genético catalizada por una ADN polimerasa termoestable. Con base en esta reacción controlada por la temperatura, se ha diseñado la metodología para replicar cadenas de ADN utilizando ciclos térmicos para la activación y desactivación de la actividad catalítica de la polimerasa, así como para el alineamiento y apareamiento de las bases complementarias en la doble hebra del ADN^(25; 26).

Un ciclo convencional de PCR consta de los siguientes 3 pasos: 1) desnaturalización (ruptura de los puentes de hidrógeno responsables del apareamiento de las hebras del ADN); 2) alineamiento (restablecimiento de los puentes de hidrógeno entre las bases

complementarias de dos hebras de ADN) y 3) extensión (replicación de la cadena de ADN a la temperatura en la cual la ADN polimerasa posee actividad catalítica⁽²⁷⁾).

Usando la técnica de PCR una molécula de ADN puede modificarse (mutarse) premeditadamente en regiones específicas. Las mutaciones específicas se logran con el uso de un fragmento de ADN denominado cebador (“primer” en inglés), que contiene en la parte central de la secuencia de los nucleótidos la mutación deseada y en los extremos 5’ y 3’ regiones específicas del ADN sin mutación que sirve de molde. Previa desnaturalización del ADN molde, los extremos de las hebras del fragmento de ADN mutado se adhieren al ADN molde a la temperatura de alineamiento, insertando de este modo la mutación. Después de este paso, entra en acción la ADN polimerasa, replicando el resto de las bases construyendo una hebra mutada complementaria a la hebra molde. Así es posible modificar la secuencia de nucleótidos dentro de una molécula de ADN⁽²⁷⁾.

2.4.2 Transformación y expresión de proteínas recombinantes

La transformación es la alteración genética de una célula bacteriana resultado de la introducción y expresión de material genético libre⁽²⁶⁾. Para que esto sea posible, es necesario que las células se encuentren en un estado que permita la incorporación de ADN libre en el ambiente exógeno. Por lo anterior, la obtención de células competentes es un proceso importante en la transformación y la subsecuente obtención de proteínas recombinantes. La gran mayoría de las células no son competentes de forma natural. Este estado se induce regularmente colocando células en “estrés” con disoluciones de CaCl₂, entre otras. El “estrés” al cual es sometida la célula estimula mecanismos de recombinación y el paso del material genético al interior de la célula. Posteriormente, con la expresión del material genético introducido al interior de la célula se completa la transformación genética⁽²⁶⁾.

2.5 Técnicas para la purificación de proteínas

En la actualidad, existen técnicas eficientes para la purificación de mezclas complejas de proteínas como las provenientes de extractos celulares. Las técnicas de mayor eficiencia son regularmente cromatográficas. Este último tipo de técnicas permite la purificación de péptidos y proteínas aprovechando sus características fisicoquímicas. Dos ejemplos son la cromatografía de afinidad metal quelato (CAMQ) y la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), la cual cuenta con un gran poder de resolución. Esta última técnica se utiliza como método de separación aprovechando las características químicas de las moléculas en una mezcla. Ejemplos de esto son el intercambio iónico y la fase reversa.

Una de las grandes ventajas de la utilización de la tecnología recombinante es que las proteínas pueden ser diseñadas con secuencias de aminoácidos específicas que facilitan su purificación e identificación, estas secuencias son conocidas como etiquetas. Una de las etiquetas más utilizadas es una secuencia de 6 histidinas que permite la purificación de proteínas mediante cromatografía de afinidad metal quelato, aprovechando la coordinación entre los grupos imidazólicos presentes en las histidinas y los cationes metálicos tales como Cu^{2+} y Ni^{2+} . Al pasar una mezcla de proteínas por una columna activa la mezcla se fracciona gracias al efecto de coordinación. El incremento de la concentración de imidazol en disolución desplaza a los grupos previamente coordinados al metal fijado en la fase estacionaria. La afinidad de las histidinas al metal fijado también puede ser modulada por el pH alterando el grado de ionización de grupos cargados en el ligando o en la proteína. Esta cromatografía es generalmente utilizada como primer paso de purificación, ya que por esta metodología resulta difícil obtener fracciones con una solo tipo de proteína.

2.5.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia para proteínas

La purificación con esta técnica consigue la mayor pureza de una mezcla de proteínas. Algunas proteínas de bajo peso molecular en esta técnica se purifican con columnas de fase reversa C18 y en ciertos casos C12. En estas columnas la retención es proporcional al carácter polar de las moléculas que atraviesan por la columna[‡], siendo las partículas menos polares las más afines a la columna. Si la elución comienza con un disolvente polar como H_2O , las sustancias que abandonarían primero la columna serán las más polares, es decir, las que casi no interactúan con la columna. Para la elución total de todas las sustancias introducidas a la columna se utilizan una fase móvil menos polar, por ejemplo, acetonitrilo. Estos disolventes son comúnmente utilizados en la separación de proteínas por HPLC en fase reversa. Regularmente, a estos solventes se les agrega ácido trifluoroacético (TFA) que ayuda con la neutralización de grupos silano libres en la columna, además de neutralizar las cargas en la proteína (en los aminoácidos cargados) lo que mejora la interacción con la fase estacionaria y por ende la separación cromatográfica⁽²⁸⁾.

2.6 Caracterización de proteínas recombinantes

Las principales pruebas de caracterización de una proteína recombinante es la verificación de la masa molecular correcta, lo que puede hacerse por espectrometría de masas. Con esta técnica analítica, además del peso molecular, se pueden encontrar la cantidad

[‡] El tamaño y forma de una proteína modifica la distribución de las cargas en la molécula, lo cual se traduce en una modulación del carácter polar.

de puentes disulfuro formados haciendo cálculos entre el valor esperado de la proteína con y sin puentes disulfuro (grupos tiol de las cisteínas oxidados o reducidos respectivamente).

Unas de las técnicas más especializadas para la caracterización de una proteína son las utilizadas para la determinación de su estructura tridimensional: difracción de rayos X y RMN. La técnica más utilizada es la difracción de rayos X. En esta técnica es necesario contar un cristal de la proteína bajo estudio, el cual debe de ser capaz de difractar los rayos X que inciden sobre él. En ocasiones, el proceso de cristalización de algunas proteínas (en particular, proteínas de bajo peso molecular) resulta ser infructuoso, limitando el estudio estructural por difracción de rayos x. En estos casos la alternativa es realizar el estudio estructural por resonancia magnética nuclear.

2.7 Determinación estructural de proteínas por resonancia magnética nuclear

A partir del descubrimiento e implementación de la RMN como técnica espectroscópica para el análisis de la materia^(29; 30), esta se ha convertido gradualmente en una extraordinaria herramienta para su estudio. En la actualidad la RMN es utilizada para determinar algunas de las estructuras moleculares de mayor complejidad como los polisacáridos, moléculas de ADN y proteínas^(31; 32; 33), entre otros.

2.7.1 La utilidad de la propiedades nucleares en las proteínas

En la RMN se aprovecha la propiedad atómica del espín nuclear⁽³⁴⁾. Mediante la aplicación de campos magnéticos y secuencias de pulsos es posible obtener información que, mediante su correcta interpretación, hace posible el estudio de la materia a nivel atómico. La aplicación de un campo magnético externo a los núcleos susceptibles (espín nuclear distinto de cero) separa los estados energéticos degenerados. La separación es proporcional a la intensidad del campo magnético, entre mayor sea separación de los estados es más fácil detectar las transiciones energéticas, lo cual se traduce en una mejora sustancial en la recolección de la información. Dicha información es extraída mediante la aplicación de secuencias de pulsos⁽³⁴⁾.

Los núcleos activos de mayor importancia en la RMN aplicada a proteínas son los isótopos de ^1H , ^{13}C y ^{15}N ; lo cuales poseen un espín nuclear igual a $\frac{1}{2}$, así como el ^2H que tiene espín uno. Estos núcleos atómicos están presentes en las proteínas en distintas proporciones. Para conocer la factibilidad de obtener señales en RMN correspondientes a un núcleo "X" se utiliza el parámetro de la receptividad relativa respecto a un núcleo de referencia "Y" (D^r). Este parámetro considera la abundancia isotópica, la constante giromagnética y el espín nuclear

del átomo “X”. En estos términos, la receptividad referenciada a ^{13}C del isotopo de hidrogeno ^1H , es $D^c = 5.87 \times 10^3$. En contraste, los isotopos de ^{13}C y ^{15}N poseen valores de D^c de 1.00 y 2.25×10^{-2} , respectivamente. Lo anterior refleja una fuerte limitación para efectuar experimentos en RMN de ^{13}C y ^{15}N en proteínas.

En ocasiones, para llevar a cabo los estudios estructurales de proteínas por RMN, es necesaria la incorporación a la molécula de los isotopos ^{13}C y ^{15}N para aumentar la extracción de la mayor información posible para la determinación estructural, interacción intermolecular, etcétera. Sin embargo, bajo ciertas circunstancias (poco traslape de las señales), puede realizarse la determinación estructural de proteínas sin la necesidad de incorporar los isotopos de ^{13}C y ^{15}N . En este escenario, la proteína estudiada es sometida a distintos experimentos de ^1H -RMN para obtener la información suficiente que lleve a la obtención de la estructura tridimensional. El proceso global para la determinación de la estructura de una proteína por RMN se resume gráficamente en la Figura 2.3.

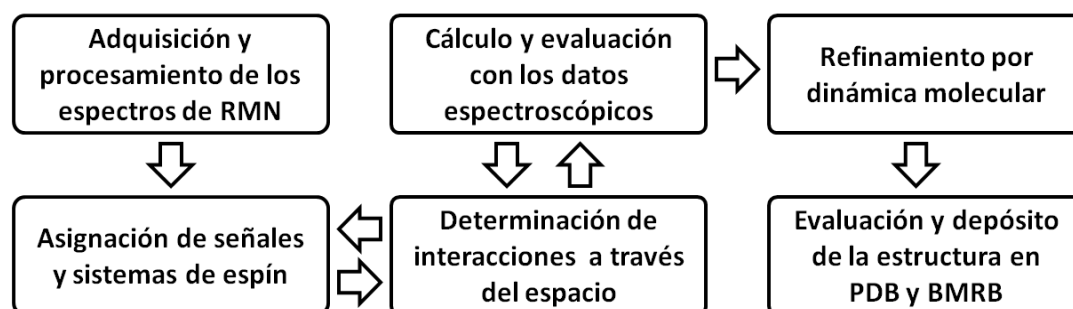


Figura 2.3. Esquema general para la determinación de estructuras de proteínas por RMN. Las flechas en contrasentido representan un proceso iterativo entre los recuadros que señalados por ambas flechas. El proceso iterativo es controlado por el criterio del interpretador.

Los experimentos de RMN que normalmente se hacen con una proteína sin enriquecimiento isotópico son los experimentos en dos dimensiones ^1H , ^1H TOCSY; ^1H , ^1H COSY y ^1H , ^1H NOESY. Para la correcta interpretación de estos espectros es importante conocer la secuencia de aminoácidos, pues de no conocerla el proceso de asignación se convierte en un procedimiento ambiguo susceptible a una enorme cantidad de errores⁽³¹⁾.

Algunos especialistas en la determinación de estructuras de proteínas por RMN reportan sus estructuras en el PDB sin pasar por el proceso de refinamiento de dinámica molecular (Figura 2.3). No obstante, la estrategia para la determinación estructural de una proteína puede contemplar la inclusión del refinamiento por dinámica molecular⁽³⁵⁾; cuya eficacia estará totalmente sujeta a la forma a la calidad de los parámetros incluidos en el campo de fuerza utilizado.

2.7.2 Refinamiento por dinámica molecular de estructuras de proteína

En las estructuras de proteína determinadas por RMN, regularmente existen regiones que no pueden ser definidas en la estructura, debido principalmente, a la gran movilidad de estas regiones⁽³⁶⁾. Estos grados de libertad en la estructura son intrínsecos a la naturaleza de la estructura. Para tratar de observar las conformaciones más estables de dichas regiones, en caso de existir, se pueden utilizar los cálculos de dinámica molecular de proteínas⁽³⁵⁾. Mediante estos cálculos de refinamiento las estructuras determinadas por RMN son sometidas a condiciones simuladas de la forma más realista posible, esto es, con la inclusión de restricciones fisicoquímicas dentro de los cálculos de dinámica molecular⁽³⁵⁾(potenciales electrostáticos, constantes dieléctricas, disolventes, pH, temperatura, etc.). Estos cálculos suelen tener un alto precio computacional (tiempo para completar el cálculo) debido al tamaño de los sistemas estudiados.

2.8 Superficie de potencial electrostático

El potencial electrostático es una propiedad física intrínseca de las partículas eléctricas. Esta propiedad es consecuencia de las interacciones coulómbicas entre dos partículas cargadas a través del espacio. El cálculo de esta propiedad es una excelente forma de explicar algunas interacciones intermoleculares, especialmente entre moléculas biológicas⁽³⁷⁾.

Un mapa del potencial electrostático de una proteína permite visualizar de una manera fácil las zonas donde se concentra el potencial eléctrico y donde es nulo. Para calcular el potencial de macromoléculas como proteínas, ADN, ARN, entre otras, se han implementado recientemente métodos numéricos para resolver computacionalmente la ecuación de Poisson-Boltzmann⁽³⁷⁾. Esta ecuación calcula el potencial eléctrico del soluto en función de las propiedades dieléctricas del soluto y del disolvente, además de la fuerza iónica de la disolución y la accesibilidad de los iones al seno del soluto⁽³⁷⁾.

2.9 Hipótesis

Dada la gran identidad entre las secuencias de la toxina κ -BUTX-Tt2b y la proteína Ts16, la estructura de la proteína recombinante GS-Ts16 debe de presentar el motivo estructural CS- α/α comprobando la existencia de un nuevo tipo estructural de KTx's con 6 cisteínas.

2.10 Objetivos

- Obtener la cantidad suficiente de proteína recombinante GS-Ts16 para los estudios por resonancia magnética nuclear.

- Determinar la estructura tridimensional de la GS-Ts16 por resonancia magnética nuclear.
- Comparar la estructura tridimensional de la GS-Ts16 con la κ -BUTX-Tt2b.

3 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para conocer la conformación tridimensional por RMN de la proteína Ts16 fue necesario plantear la obtención de forma recombinante. El diseño experimental para la obtención, purificación y elucidación estructural de la proteína Ts16 consistió en la construcción del plásmido para la expresión en *E. coli*. Seguido de la biosíntesis, se plantearon las estrategias cromatográficas y la reacción enzimática para finalmente purificar la proteína GS-Ts16. Una vez obtenida y purificada se planeó la caracterización de la proteína recombinante utilizando espectrometría de masas. Finalmente, el punto medular del trabajo experimental se abordó con la obtención e interpretación de los espectros de RMN de la proteína Ts16.

3.1 Biosíntesis de Ts16

Se planteó obtener Ts16 recombinante utilizando las cepas de *E. coli* Rosetta™ y Tuner™, esperando que una de estas cepas produjera cuantitativamente proteína de fusión. Para tales fines fue necesaria la construcción del plásmido Ts16-pET32a, que fue construido a partir del plásmido κ -BUTX-Tt2b-pET32a, haciendo las mutaciones específicas y una inserción con el diseño de los oligonucleótidos necesarios, corroborando cada mutación por secuenciación hasta la obtención del plásmido correcto.

3.1.1 Obtención del plásmido Ts16-pET32a

A partir del plásmido para sintetizar toxina κ -BUTX-Tt2b se diseñaron 6 oligonucleótidos para realizar las mutaciones específicas mediante PCR. El alineamiento de secuencias de aminoácidos de la Figura 2.2 (p.5) muestra las diferencias entre las secuencias primarias de ambas proteínas. De acuerdo a estas diferencias se ordenó la síntesis de los 6 oligonucleótidos presentados en la Tabla 3.1. Las mutaciones al plásmido original fueron planeadas para realizarse de forma sucesiva. Los primeros 2 oligonucleótidos de la Tabla 3.1 (TS16-1-FWD y TS16-1-RVS) se diseñaron para modificar los codones de la prolina número 4 en la secuencia de aminoácidos de κ -BUTX-Tt2b, codificando para lisina en el plásmido mutado. El segundo par de oligonucleótidos (TS16-2-FWD y TS16-2-RVS) se diseñó con los codones necesarios para el cambio simultáneo a histidina y lisina en las posiciones 23 y 25, respectivamente, en el plásmido previamente mutado. El último par de oligonucleótidos (TS16-3-FWD y TS16-3-RVS) fue diseñado para insertar los codones de prolina en la posición 28 de la secuencia de κ -BUTX-Tt2b, desplazando a la arginina a la última posición en la proteína Ts16. Con la confirmación de la última mutación, se obtiene el plásmido Ts16-pET32a el cual contiene la

información necesaria para la expresión de la proteína de fusión, representada en la Figura 3.1.

Tabla 3.1. Oligonucleótidos utilizados en la obtención del plásmido Ts16-pET32a a partir del plásmido κ -BUTX-Tt2b-pET32a.

Clave	5' → 3'
TS16-1-FWD	ggttctggttgatgaaggagtactgtgcaggt
TS16-1-RVS	acctgcacagtactccttcatacaaccagaacc
TS16-2-FWD	gattattgcctgaagcactgcaagtgcacccgtaagga
TS16-2-RVS	tccttaacggatgcacttgactgcttcaggcaataatc
TS16-3-FWD	cactgcaagtgcacccacgtaaggatccgaa
TS16-3-RVS	ttcggatccttaacgtgggatgcacttgactg



Figura 3.1. Representación de la proteína de fusión. En la figura se representan las regiones que constituyen a dicha proteína: el dominio de tiorredoxina, la secuencia de 6 histidinas consecutivas, el sitio de corte con trombina y la secuencia de aminoácidos de la proteína Ts16.

3.1.2 Producción de Ts16 en *Escherichia coli*

Después de obtener el material genético para la biosíntesis de Ts16, el paso siguiente es la inserción del material genético en las bacterias productoras mediante la transformación de células competentes de las cepas Rosetta™ y Tuner™ de *E. coli*. Para inducir la expresión del material genético, ya introducido en las bacterias, es necesaria la adición de isopropil β -tiogalactopiranososa (IPTG) cuando estas se encuentran en la fase logarítmica del crecimiento bacteriano (densidad óptica a 600 nm igual a 0.700 unidades de absorción). La expresión de la proteína de fusión (Figura 3.1) debe monitorearse en ambas cepas para determinar el tiempo de máxima expresión a 30°C y cantidad de proteína de fusión producida.

Una vez que se conoce la cinética de expresión de la proteína de fusión, es posible inducir la producción de proteína de fusión a mayor escala. Con ello se logra conseguir la obtención de suficiente muestra para los estudios de RMN. Luego de la biosíntesis de proteína de fusión se debe extraer del microorganismo para posteriormente purificar Ts16. Para ello, las células productoras se pueden colectar por centrifugación a 5'000 x g, 4°C, por 10 minutos. Después de la colecta, es necesario resuspender al paquete celular en *BLI* (Apéndice A.1 p. 46) para realizar la lisis celular por golpes sónicos. El extracto celular obtenido de la lisis se fracciona en parte soluble e insoluble por centrifugación a 39'000 x g, 4°C, por 30 minutos. La parte soluble se puede purificar con las técnicas y estrategias a continuación descritas.

3.2 Purificación

La purificación de la proteína recombinante Ts16 se diseñó en 3 pasos de acuerdo a las características de la proteína de fusión: aislamiento de la proteína de fusión del extracto celular, corte de la proteína de fusión con trombina y purificación de GS-Ts16 por cromatografía líquida de alta eficiencia de fase reversa.

3.2.1 Aislamiento del extracto celular

La mezcla de proteínas en el extracto celular puede fraccionarse con la utilización de una columna de afinidad metal quelato. En este tipo de columnas, las proteínas que poseen aminoácidos cuyas cadenas laterales son capaces de coordinar iones metálicos, son retenidas por los iones fijos en la fase estacionaria de la columna. La proteína de fusión posee la característica anterior, ayudando a purificarla del extracto celular por medio de esta técnica. Después de pasar el extracto celular, se lava la columna con BLI para eliminar la mayor cantidad posible de las proteínas retenidas con baja afinidad. Una vez lavada la columna las proteínas retenidas se desplazan saturando los sitios de coordinación con imidazol. Esta última fracción contiene mayoritariamente proteína de fusión.

3.2.2 Corte con trombina

Una vez aislada del extracto celular, la proteína de fusión es necesario el corte para obtener GS-Ts16. Previo al corte, la proteína debe ser dializada para eliminar la alta concentración de imidazol, ya que es un obstáculo para la reacción enzimática.

La estrategia es utilizar el sitio de corte específico para la proteasa trombina, con el cual fue concebida la proteína de fusión (Figura 3.1). Esta enzima reconoce la secuencia de aminoácidos en la proteína de fusión L-V-P-R-G-S hidrolizando el enlace peptídico entre los aminoácidos R y G. El sitio de corte fue colocado inmediatamente antes de la secuencia de aminoácidos de la proteína Ts16 para que al momento de cortar la proteína de fusión, la GS-Ts16 fuese separada. Esta proteína se aísla del dominio de tiorredoxina (residuo de corte) nuevamente por cromatografía de afinidad metal quelato y después por cromatografía líquida de alta eficiencia.

3.2.3 Cromatografía líquida de alta eficiencia

La proteína Ts16 obtenida de la reacción del corte con trombina de la proteína de fusión, debe de ser separadas de aditivos, impurezas y de otras proteínas para caracterizarla adecuadamente. Una manera de hacer la purificación de proteínas es por cromatografía

líquida de alta eficiencia de fase reversa, utilizando columnas C18 y en ocasiones C12. La técnica para la purificación de GS-Ts16 utiliza gradientes de H₂O y acetonitrilo, ambos con TFA al 0.05% v/v para neutralizar las cargas dentro de la proteína. Esta técnica es el paso final de la purificación. Antes de caracterizar e introducir la muestra de proteína al equipo de RMN, es necesario liofilizar por completo la fracción con la proteína objetivo para retirar el agua y acetonitrilo con TFA.

3.3 Caracterización

3.3.1 Determinación del peso molecular y presencia de puentes disulfuro

La técnica elegida para determinar tanto el peso molecular así como la presencia de puentes disulfuro es la espectrometría de masas por MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight). Con esta técnica de alta resolución y con una buena calibración, se pueden llegar a observar diferencias de hasta una unidad de masa entre los compuestos analizados. Por esta característica, esta técnica espectroscópica es apropiada y confiable para determinar la masa de una proteína, además de determinar la presencia de cisteínas, oxidadas o reducidas, o cualquier otra modificación en dicha molécula.

La determinación de la cantidad de puentes disulfuro en una proteína se puede hacer mediante la obtención de los espectros correspondientes a la proteína con los puentes disulfuro formados y de la especie reducida, únicamente en los grupos tiol de las cisteínas. Observando las diferencias de los pesos moleculares se puede llegar a inferir la presencia o ausencia de puentes disulfuro en la muestra de proteína analizada de la siguiente forma: para cada puente disulfuro presente en una proteína la diferencia en el valor de la relación masa/carga entre la especie oxidada (puente disulfuro) y la reducida (ausencia de puente) debería ser de 2 unidades exactamente, las cuales corresponden a la reducción de los dos grupos tiol involucrados en un puente disulfuro.

3.4 Determinación estructural por resonancia magnética nuclear

Finalmente, después de obtener la cantidad suficiente de proteína recombinante, es necesario preparar 300 µL de una disolución 1.0 mM de proteína en 95.0 % H₂O/ 5.0 % D₂O. Con esta disolución se pueden obtener y procesar los espectros ¹H; ¹H, ¹H TOCSY; ¹H, ¹H COSY y ¹H, ¹H NOESY; los cuales sirven para determinar por RMN la estructura tridimensional.

3.4.1 Asignación secuencial de los sistemas de espín

Para logra la correcta identificación de los sistemas de espín de una proteína es necesario conocer la secuencia de aminoácidos que la conforman. Cada tipo de aminoácido posee un

patrón característico de señales COSY y TOCSY⁽³¹⁾ mejor conocido como sistema de espín. La identificación de cada uno de los sistemas de espín de los aminoácidos dentro de una proteína permite la asignación secuencial utilizando de acuerdo a la metodología establecida por Kurt Wüthrich^(31; 32) para la determinación estructural de proteínas por RMN.

Debido a la cercanía espacial entre los protones de amida ($^1\text{H}^{\text{N}}$), los protones unidos al carbono alfa ($^1\text{H}^{\alpha}$) y los protones β de la cadena lateral ($^1\text{H}^{\beta}$) se puede realizar el siguiente proceso para determinar la conexión e identificación de los sistemas de espín secuenciales: en el desplazamiento químico del protón $^1\text{H}^{\text{N}}$ del sistema de espín del aminoácido **n**, se pueden identificar en el espectro NOESY las señales correspondientes a los protones $^1\text{H}^{\alpha}$ y $^1\text{H}^{\beta}$ del aminoácido **n-1**. De este modo y con la secuencia de los aminoácidos en la proteína, pueden asignarse secuencialmente los sistemas de espín de los aminoácidos presentes en una proteína (cuando no hay demasiado traslape de señales).

Con la identificación de los sistemas de espín completa, el resto de señales nOe sin asignación son correlacionadas con las asignaciones de otros sistemas de espín. Por ejemplo, la interacción a través del espacio entre los protones de la cadena principal $^1\text{H}^{\text{N}}$ y $^1\text{H}^{\alpha}$ de los aminoácidos **n** y **n+5**, respectivamente, se ve reflejada en el espectro NOESY con la presencia de una señal cuyos desplazamientos químicos corresponden al de $^1\text{H}^{\text{N}}$ del aminoácido **n** en una de las dimensiones y al de $^1\text{H}^{\alpha}$ del aminoácido **n+5** en la dimensión restante. Este procedimiento logra encontrar las señales que proporcionarán más adelante las restricciones de distancia en la estructura bajo análisis.

Cuando la asignación del espectro NOESY es completada, el siguiente paso es la determinación cuantitativa de las restricciones de distancia. Para este fin, es necesario integrar correspondiente a cada una de las señales del espectro NOESY y determinar las distancias en función del valor de la integral de cada señal nOe. Después, mediante la ecuación 3.1 se establecen cada una de las distancias r_i dentro de la estructura, tomando en cuenta una distancia de referencia r_{ref} , el valor de la integral en el espectro correspondiente a la integral de la referencia S_{ref} y el valor de la integral de la distancia que se debe establecer S_i . Una vez completado este paso, se procede a la evaluación de la asignación comparando el valor de los desplazamientos químicos de cada señal con los valores estándar para el tipo de átomo asignado, seguido del cálculo de la estructura en función de los ángulos de torsión dentro de la proteína.

$$r_i = r_{ref} \left(\frac{S_{ref}}{S_i} \right)^{1/6} \quad (3.1)$$

3.4.2 Cálculo de ángulos de torsión

El cálculo de ángulos y evaluación de la asignación (Figura 2.3 p.10) se realiza tomando en cuenta cada una de las asignaciones y restricciones de distancia del espectro NOESY. Estos cálculos se realizan con la ayuda de programas computacionales capaces de hacer una estadística de los desplazamientos químicos de cada átomo asignado dentro de la estructura proteica, comparando los resultados con los valores reportados para cada tipo de átomo. Esta comparación en programas como CYANA 2.0 ayuda a evaluar la asignación y sugiere la modificación de las asignaciones que no concuerdan con los valores de la base de datos utilizada para la comparación.

Una vez que se cuenta con una evaluación favorable de la asignación, la estructura de la proteína debe calcularse respetando las restricciones encontradas por RMN, minimizando el valor de los ángulos diedros cuyo valor aun no ha sido determinado. Esta es la única modificación implementada en el algoritmo de CYANA 2.0, ya que las distancias atómicas de los grupos unidos covalentemente, así como los ángulos de enlace y la quiralidad de algunos grupos atómicos, permanecen invariantes durante todo el proceso de cálculo. Los ángulos diedros son modificados iterativamente hasta llevarlos a los valores que mejoran la conformación de la proteína. Con las estructuras resultantes de este tipo de cálculo se conforma un ensamble con las 20 mejores estructuras.

3.4.3 Refinamiento de la estructura por dinámica molecular

Finalmente, las 20 estructuras seleccionadas en el programa CYANA 2.0 son sometidas a un refinamiento por dinámica molecular de acuerdo a la metodología propuesto por Bin Xia y coautores⁽³⁵⁾ en el programa AMBER 9. Esto tiene como finalidad encontrar las conformaciones con la menor energía posible minimizando los grados de libertad dentro de la estructura de la proteína, además de estimar la estructura de la forma más realista posible con la inclusión de moléculas de disolvente.

4 RESULTADOS

4.1 Obtención del gen Ts16-pET32a

El gen codificante para la biosíntesis de Ts16 se obtuvo al mutar consecutivamente 3 regiones del gen utilizado para la obtención de κ -BUTX-Tt2b. Al final y entre cada mutación el producto de PCR fue amplificado, purificado y, posteriormente, secuenciado para corroborar los resultados de cada mutación.

La primera mutación sobre la secuencia de κ -BUTX-Tt2b se realizó en el aminoácido número cuatro. Mediante PCR se mutó prolina por lisina utilizando los oligonucleótidos diseñados para este fin. Sobre el producto obtenido y con la secuencia de nucleótidos confirmada se realizó la siguiente mutación.

En la segunda mutación se modificaron los codones de la asparagina en la posición 23 para sustituirla por histidina y los codones de la arginina en la posición 25 para cambiarlos por el triplete de lisina. Ambas modificaciones fueron realizadas en una misma reacción de PCR utilizando un solo oligonucleótido para la doble mutación. El producto de esta reacción fue amplificado, secuenciado y tomado como el punto de partida para la última modificación.

La tercera y última mutación corresponde a la inserción de los codones de prolina en el sitio número 28 de la secuencia de aminoácidos de la toxina κ -BUTX-Tt2b. Con esta última modificación y confirmación de la secuencia de aminoácidos se obtuvo el gen (plásmido) de la proteína de fusión de la Ts16, el cual se nombró Ts16-pET32a.

4.2 Expresión en Escherichia coli

El plásmido Ts16-pET32a se introdujo en cepas de Escherichia coli transformando células competentes de las cepas Rosetta™ y Tuner™. Cada cepa transformada se inoculó en 200 mL de medio cultivo Luria Bertani (LB) con los antibióticos apropiados. Los 200 mL se incubaron por 16 horas, a 37°C. Se transfirieron cincuenta mililitros del inoculó de 16 horas a un matraz Fernbach de 2.8 L conteniendo 1.5 L de medio LB y antibióticos (ampicilina 100 μ g/mL para Tuner™; para Rosetta™ ampicilina 100 μ g/mL y cloranfenicol 34 μ g/mL). El matraz Fernbach inoculado se incubó a 37°C monitoreando a 600 nm el valor de densidad óptica del cultivo bacteriano. Cuando el valor de la densidad óptica fue de 0.700, la temperatura de incubación se fijó en 30°C y la inducción de la expresión regulada por el sistema T7 se realizó con la adición de IPTG 1.0 M, hasta que se alcanzó una concentración de 0.5 mM de este reactivo en

el cultivo bacteriano. Después de la inducción la expresión de ambas cepas se monitoreó tomando en intervalos constantes de tiempo un mililitro de cultivo bacteriano, centrifugando para coleccionar el paquete celular, resuspendiendo las células en 60 μ L de *BLI*, extrayendo las proteínas por lisis celular y analizando por electroforesis desnaturalizante la producción de proteína en función del tiempo.

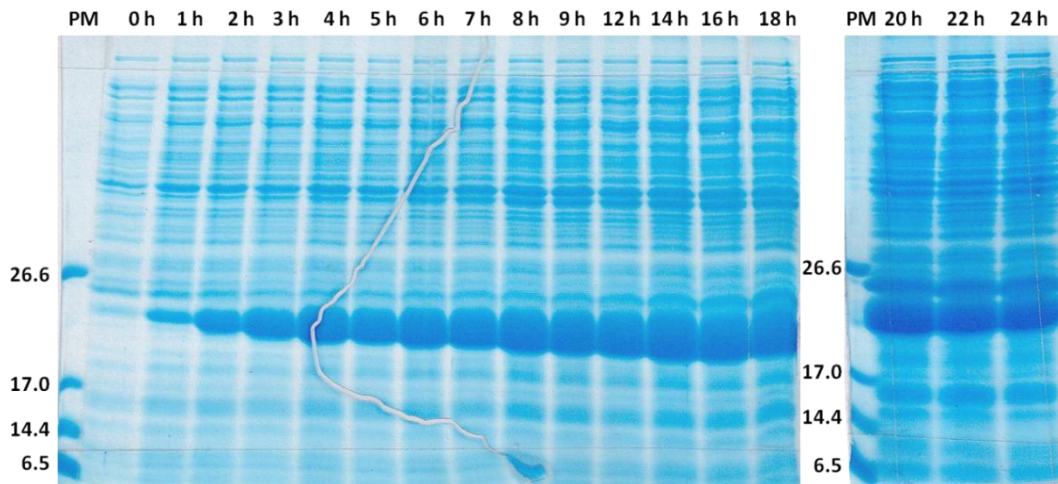


Figura 4.1. Cinética de expresión de la proteína de fusión en la cepa de *E. coli* Rosetta™. El peso de la proteína de fusión de 21'000 Da concuerda con la banda cuya intensidad es creciente, en los carriles de izquierda a derecha. El tiempo de inducción se fijó en 16 hrs de acuerdo a los resultados presentados en este gel de electroforesis (SDS desnaturalizante).

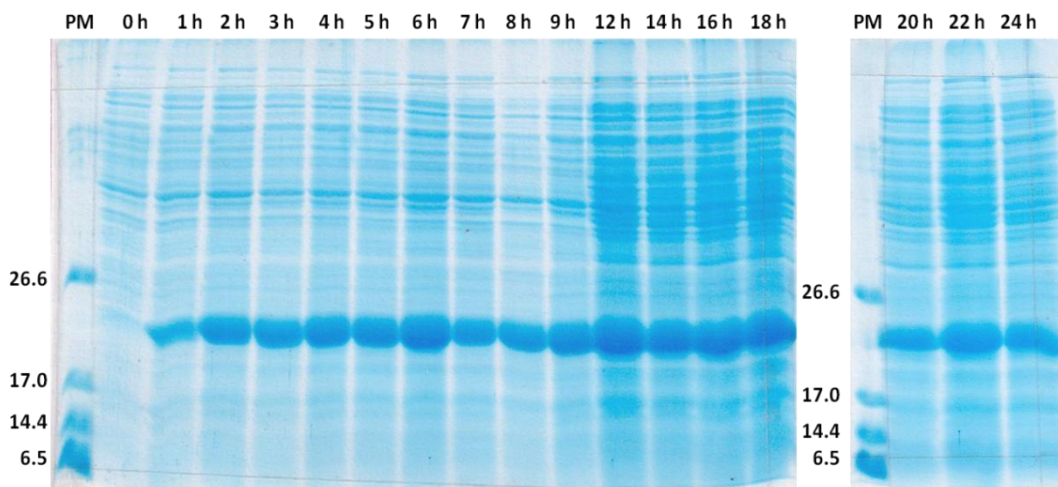


Figura 4.2. Cinética de expresión de la proteína de fusión en la cepa de *E. coli* Tuner™. El peso de la proteína de fusión de 21'000 Da concuerda con la banda cuya intensidad es creciente, en los carriles de izquierda a derecha. El tiempo de inducción con esta cepa se puede establecer de 12 a 16 hrs de acuerdo a los resultados presentados en el gel de electroforesis (SDS desnaturalizante).

Ambas cepas presentaron un comportamiento similar en la producción de proteína de fusión. El punto de máxima producción en ambas cepas se alcanza a las 16 horas después de inducir con IPTG. Se optó por utilizar Rosetta™ como cepa productora por la notable facilidad para ser lisada respecto a la cepa Tuner™. El tiempo de inducción se fijó en 16 horas con una concentración 0.5 mM de IPTG y una temperatura de incubación de 30°C.

Con la finalidad de obtener la cantidad suficiente de proteína para los estudios estructurales y de caracterización se inocularon, incubaron e indujeron con las condiciones óptimas un total de 12 litros de LB. Después de alcanzar el punto de máxima producción se colectó el paquete celular centrifugando el cultivo bacteriano a 6'500 x g por 20 minutos a una temperatura de 4°C. El rendimiento promedio de paquete celular por litro de cultivo fue de 2.13 g/L. Seguido de la colecta de células, las bacterias fueron resuspendidas en la disolución amortiguada *BLI* adicionada con fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1.0 mM, de acuerdo a la siguiente relación:

$$\frac{1g_{\text{pellet}}}{25mL_{BLI}} \quad (4.1)$$

El paquete celular resuspendido fue sometido a lisis mediante golpes sónicos. Cada golpe aplicado fue equivalente a 40 Watts de potencia con una duración de 15 segundos. Los golpes fueron repetidos hasta completar 10 minutos de proceso de lisis, con intervalos de descanso de 30 segundos, entre cada golpe. Del extracto resultante de la lisis celular la proteína de fusión fue inmediatamente aislada.

4.3 Purificación

El extracto celular fue centrifugado a 39'000 x g durante 30 minutos para luego separar las fases de la disolución. La fase líquida fue filtrada con membranas de 0.22 µm de tamaño de poro. El extracto filtrado se pasó a través de 2 columnas HiTrap de 5 mL conectadas en serie[§]. El extracto que ya había pasado a través de las columnas fue recirculado para incrementar la cantidad de proteína de fusión retenida por las columnas. Seguido del proceso de carga, se lavaron las columnas pasando a través de ellas 75.0 mL de *BLI* (7.5 volúmenes de columna total), de este modo se eliminaron proteínas retenidas con baja afinidad a la fase estacionaria. Posteriormente, las proteínas retenidas fueron desplazadas por imidazol al pasar por las columnas *BLII* (Apéndice A.1.p. 46). Esta última fracción fue colectada por ser la fracción enriquecida con la proteína de fusión.

[§] El proceso entero de cromatografía de afinidad metal quelato se realizó con un flujo de 5 mL/min.

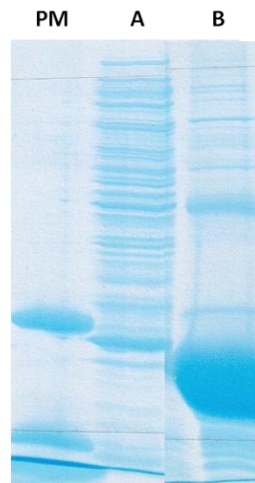


Figura 4.3. Purificación de la proteína de fusión. (PM) Marcadores de pesos moleculares. (A) Extracto celular lisado. (B) Elución de la proteína de fusión con la disolución amortiguadora BLI. La fracción B fue colectada y, posteriormente, dializada contra BLI.

La fracción rica en proteína de fusión fue dializada contra BLI para retirar el exceso de imidazol. La diálisis se realizó con tres cambios de disolución amortiguadora, renovando la disolución a los 30, 90 y 180 minutos. Después de equilibrar por diálisis la proteína de fusión en BLI se cuantificó la cantidad de proteína utilizando el método de Bradford. El rendimiento promedio de la fracción enriquecida en proteína de fusión se estimó en doce miligramos de proteína total por litro de cultivo (12 mg/L). Seguido de la determinación de la concentración se establecieron las condiciones del corte con trombina, para tal fin se efectuó el monitoreo del corte de la proteína de fusión. Se analizaron distintas condiciones de corte para adecuar y elegir las condiciones experimentales más favorables, ver Figura4.4.

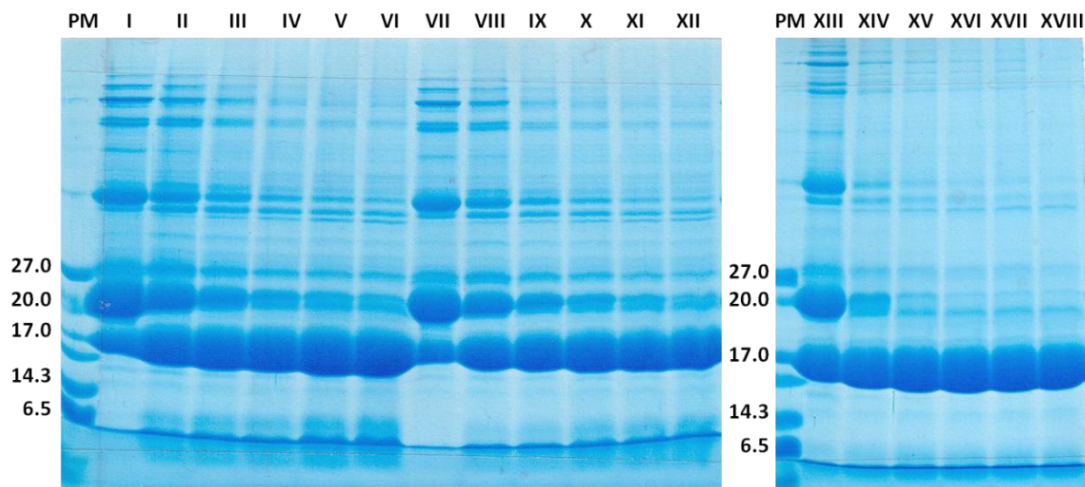


Figura4.4. Monitoreo del corte de la proteína de fusión utilizando trombina. (I) Tiempo cero corte en BLI. (II) 1 hrs BLI. (III) 2 hrs BLI. (IV) 3 hrs BLI. (V) 4 hrs BLI. (VI) 6 hrs BLI. (VII) Tiempo cero corte en BLI. (VIII) 1 hrs BLI. (IX) 2 hrs BLI. (X) 3 hrs BLI. (XI) 4 hrs BLI. (XII) 6 hrs BLI. (XIII) Tiempo cero corte en Tris 50 mM pH 8.0. (XIV) 1 hrs en Tris 50 mM pH 8.0. (XV) 2 hrs en Tris 50 mM pH 8.0. (XVI) 3 hrs en Tris 50 mM pH 8.0. (XVII) 4 hrs en Tris 50 mM pH 8.0. (XVIII) 6 hrs en Tris 50 mM pH 8.0. Concentración de proteína de fusión: (I-VI) = 3.0 mg/mL; (VII-XII) = 2.0 mg/mL; (XIII-XIX) = 3.0 mg/mL.

Las mejores condiciones que se probaron para el corte de la proteína de fusión, fueron con una concentración de proteína de fusión de 3 mg/mL utilizando *BLI* como disolución amortiguadora adicionada con 2 mM de CaCl₂. Transcurrido el tiempo necesario para el corte (4 horas), la reacción de corte se filtró (por membranas cuyo tamaño de poro fue de 0.22 μm) y fue nuevamente pasada por una columna de afinidad metal quelato de 5 mL para retirar el residuo del corte. La fracción con GS-Ts16 se colectó lavando la columna de afinidad con 5 volúmenes de columna (25 mL) de disolución amortiguadora *BLI*.

4.3.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia

La fracción fue nuevamente filtrada para purificar GS-Ts16 utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Para la separación cromatográfica se utilizó una columna analítica Phenomenex Júpiter Proteo (C12, 4μm de tamaño de partícula, 90 Å de tamaño de poro y 250 mm de largo x 4.6 mm de diámetro interno) en un cromatógrafo de líquidos Varian® ProStar. Se utilizó agua desionizada y acetonitrilo como disolventes, los cuales fueron previamente acondicionados con la adición de ácido trifluoroacético (Concentración final de TFA en cada disolvente = 0.05 % v/v). La corrida cromatográfica se monitoreó a 230 nm.

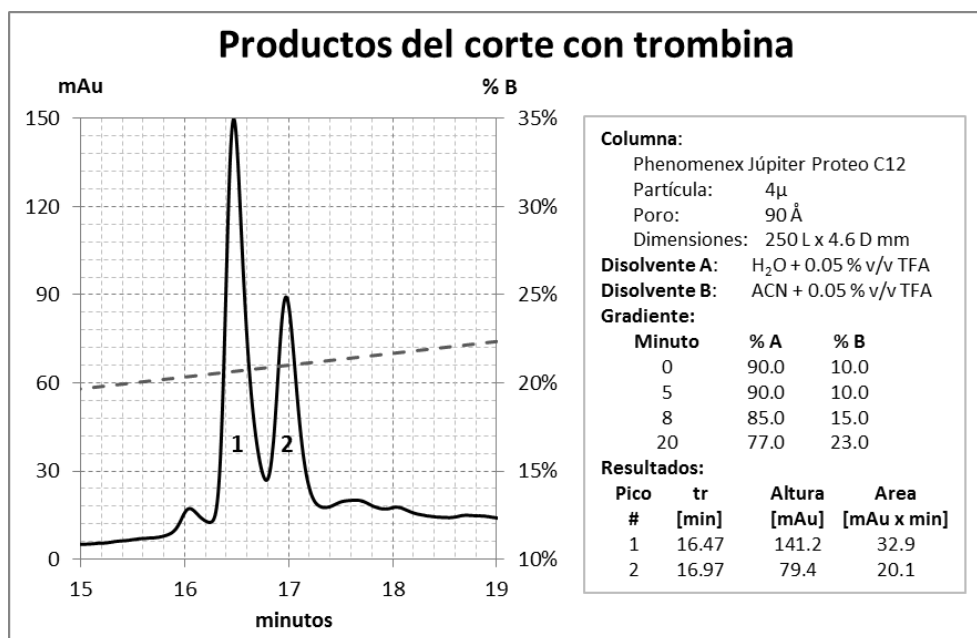


Figura 4.5. Cromatograma de la purificación de Ts16. En la imagen se muestra la separación de los productos del corte de la proteína de fusión con la proteasa trombina. En la imagen, también pueden observarse los detalles de la metodología empleada en la separación utilizando un cromatógrafo de líquidos Varian® ProStar.

Como puede observarse en la Figura 4.5 la purificación por HPLC de los productos del corte con trombina de la proteína de fusión no separa al 100.0 % los productos generados. Para lograr la correcta separación se colectaron las fracciones correspondientes a cada pico de la Figura 4.5, se liofilizaron y se volvió a purificar el pico número 1 con el mismo gradiente. Los resultados se muestran en la Figura 4.6.

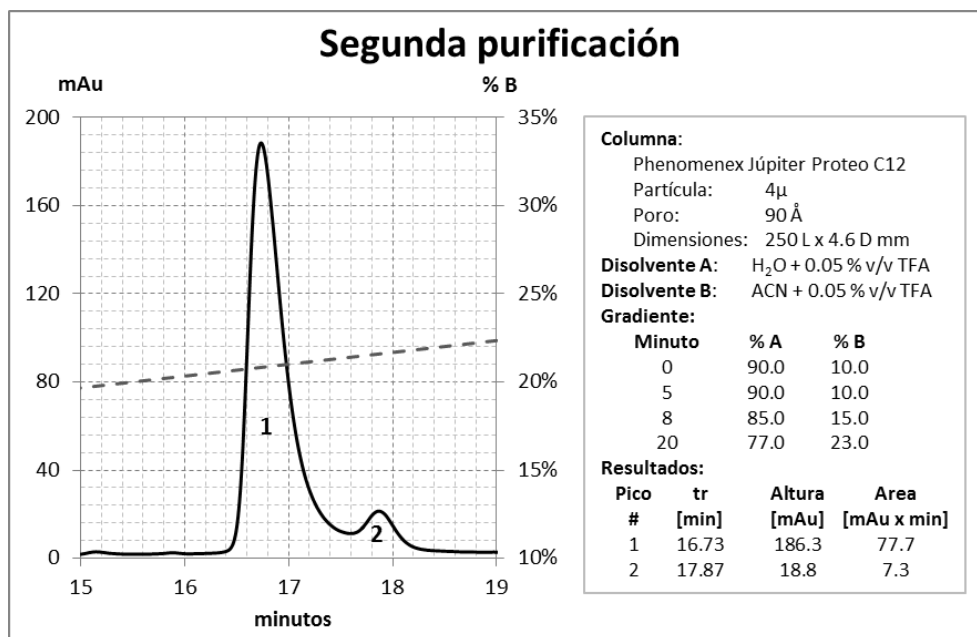


Figura 4.6. Cromatograma de la segunda purificación del pico número uno de la Figura 4.5. En esta imagen es posible observar una mejor separación. La fracción del pico uno de esta imagen fue la fracción colectada y a la que se le efectuó la caracterización y determinación estructural por RMN.

Las fracciones de la Figura 4.6 fueron colectadas y liofilizadas para la caracterización por espectrometría de masas. Las condiciones y metodología obtenidas para la separación en la columna analítica se escalaron a una columna preparativa Phenomenex Júpiter Proteo C12 de 4 μ m de tamaño de partícula, 90 Å de tamaño de poro y 100 mm de largo x 21.2 mm de diámetro interno. Las fracciones de la purificación en la columna preparativa fueron liofilizadas y, posteriormente, el polvo obtenido fue pesado para obtener el rendimiento de GS-Ts16, obteniéndose 0.56 miligramos de proteína GS-Ts16 por litro de cultivo bacteriano.

4.4 Caracterización

4.4.1 Espectrometría de masas MALDI-TOF

Para corroborar la obtención de GS-Ts16 se realizó el análisis por espectrometría de masas de los picos purificados por HPLC. El estudio analítico fue hecho con un espectrómetro

de masas Bruker Daltonics MALDI-TOF en el laboratorio de servicios analíticos del Instituto de Química UNAM. En el inciso **A** la Figura 4.7 se encontró un pico correspondiente a 3'447.98 unidades de relación masa/carga. Al hacer los cálculos para determinar el peso molecular de la especie correspondiente a este pico, se encontró que el valor era congruente con el valor esperado para la GS-Ts16 oxidada (formación de puentes disulfuro); ver Tabla 4.1. El inciso **B** de la Figura 4.7 se muestra un pico cuyo centro fue localizado en 3'454.03 unidades de relación masa/carga. Previamente, esta muestra de proteína fue sometida a una de reducción de los puentes disulfuro utilizando un buffer de citratos a pH 3.0 y como agente reductor el clorhidrato de tris-(2-carboxietil) fosfina (abreviado en inglés como TCEP).

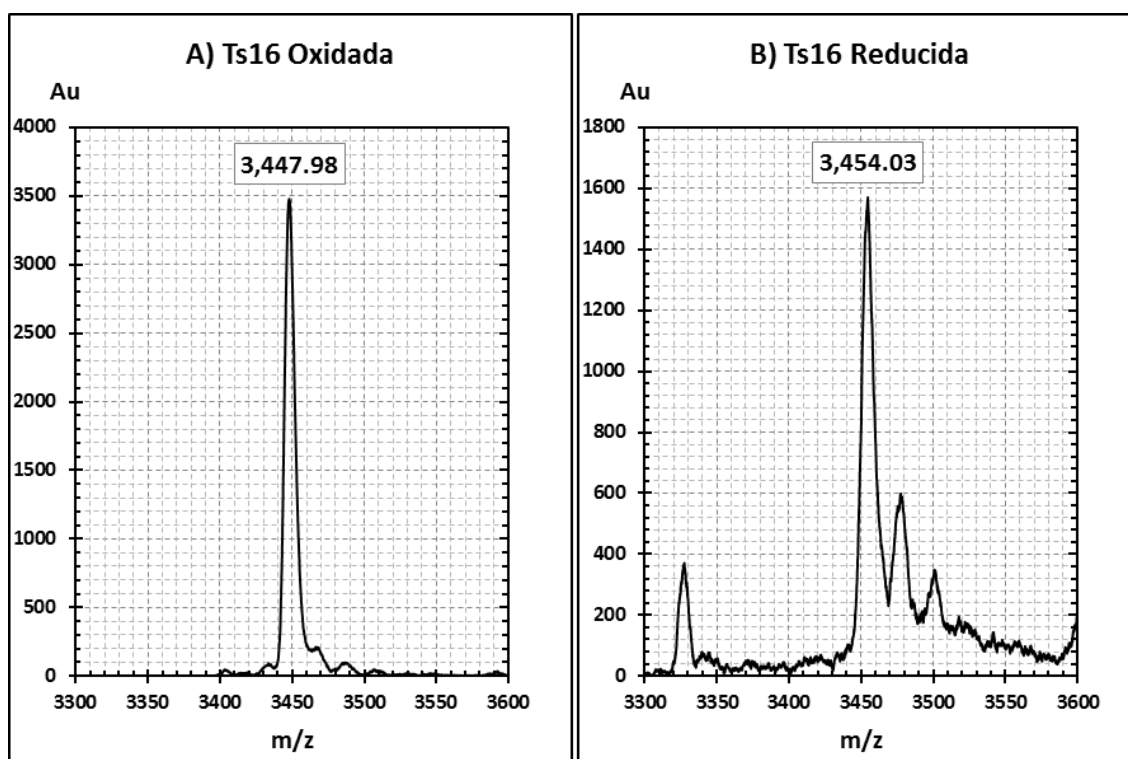


Figura 4.7. Espectro de masas MALDI-TOF del pico 1 purificado por HPLC. En el inciso **A** la masa es congruente con el peso molecular calculado para la GS-Ts16 oxidada (con puentes disulfuro). En **B** se muestra a la proteína GS-Ts16 después de someterla a una reducción de grupos tiol de las cisteínas. Estos resultados confirman la presencia de 3 enlaces disulfuro en la proteína Ts16.

La diferencia entre las masas determinadas en los espectros de la Figura 4.7 se resume en la Tabla 4.1. La diferencia entre la proteína Ts16 con los residuos de cisteína oxidados (Ts16 Oxidada) y la proteína sometida a la reacción de reducción, demuestran una diferencia congruente con la presencia de 3 puentes disulfuro en la proteína recombinante GS-Ts16.

Tabla 4.1. Resultados para la verificación de la presencia de puentes disulfuro en la proteína Ts16.

Espectro	Relación masa/carga (m/z)	PM* MALDI-TOF (g/mol)	PM* Calculado (g/mol)	Diferencia $ Ts16_{Oxidada} - Ts16_{Reducida} $
Ts16 Oxidada	3,447.98	3,446.97	3,447.08	6.06
Ts16 Reducida	3,454.10	3,453.03	3,453.08	

*Peso molecular (PM).

4.5 Determinación estructural por resonancia magnética nuclear

En la Figura 4.8 se muestra el espectro de RMN 1H de una disolución 3.0 mM de GS-Ts16 (pH 4.5 en mezcla de H_2O y D_2O al 95:5). El espectro se obtuvo en un equipo Varian® Innova de 500 MHz. En el espectro mostrado en la Figura 4.8 se pueden observar en la región de 7.0 a 11.0 ppm señales correspondientes a los protones de amida de la cadena principal. La dispersión de las señales en la región mencionada indica la existencia de estructura terciaria** en la proteína analizada.

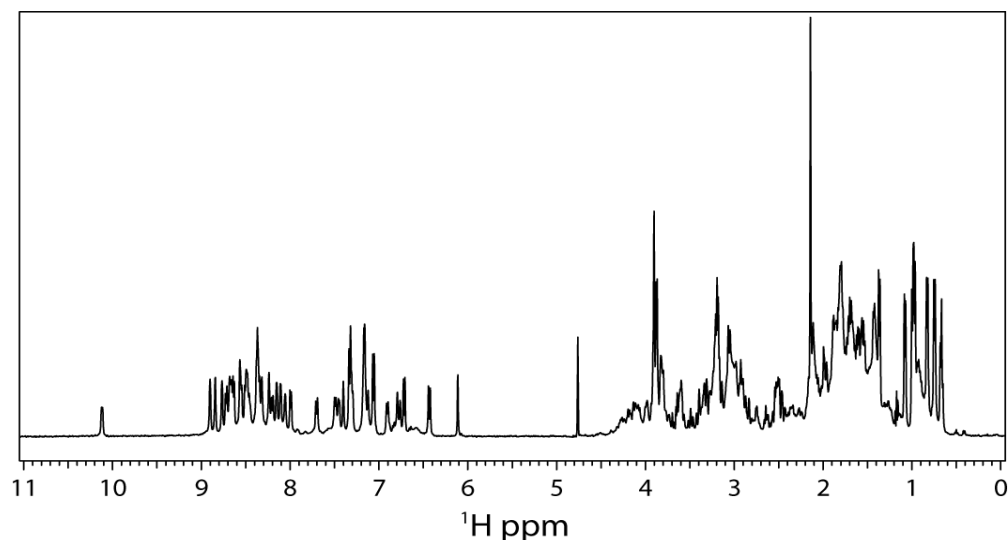


Figura 4.8. Espectro 1H de la proteína GS-Ts16. En el espectro se muestra las señales de RMN propias de la proteína GS-Ts16. En la región de 6.0 a 10.2 ppm del espectro ilustrado se observan las señales de los protones de amida. La dispersión de las señales de protones de amida indica la presencia de distintos microambientes para cada protón de amida, esto sugiere fuertemente la presencia de estructura terciaria en la proteína.

Para determinar la estructura tridimensional de la proteína Ts16 se obtuvieron los espectros bidimensionales 1H , 1H TOCSY; 1H , 1H COSY y 1H , 1H NOESY. La supresión de la señal

** Distinta a estructura aleatoria.

de agua se efectuó con la secuencia de pulsos “excitation sculpting” (Double Pulsed Field Gradient Spin Echo; DPGFSE). Después de la obtención, el procesamiento de los datos se realizó en nmrPipe. En los espectros ^1H , ^1H TOCSY y ^1H , ^1H COSY se identificaron y asignaron todos los sistemas de espín de la GS-Ts16 con ayuda del programa XEASY (incluido en el software Cara 1.5.8). A la par, se determinaron las interacciones a través asignando las señales del espectro ^1H , ^1H NOESY (Figura 4.9).

Algunas de las correlaciones más importantes que se encontraron en el espectro ^1H , ^1H NOESY fueron las correlaciones utilizadas para determinar la interconexión de los puentes disulfuro. Se logró identificar las señales que establecen la correlación a través del espacio entre los protones beta de la cisteína en la cuarta posición, de la secuencia de aminoácido, y la cisteína en la posición número 26; la primera y quinta cisteína, respectivamente, presentes en la secuencia de la GS-Ts16; (C_1 - C_5). De la misma forma, se asignaron señales para establecer la interacción entre las cisteínas en las posiciones 9 y 22; esto es, la segunda y cuarta cisteína, respectivamente, en la secuencia de la GS-Ts16 (C_2 - C_4). No se hallaron señales para establecer la hipotética interacción espacial entre los protones beta de las cisteínas en las posiciones número 13 y 28 (C_3 - C_6). De este modo, se llegó a determinar espectroscópicamente la configuración de los puentes disulfuro entre las cisteínas C_1 - C_5 y C_2 - C_4 . La conexión entre la tercera y sexta cisteína, presentes en la secuencia de aminoácidos (C_3 - C_6), se infirió por eliminación a partir de los resultados de la espectrometría de masas, en donde, se determinó la presencia de 3 puentes disulfuro en la proteína analizada; ver Figura 4.10.

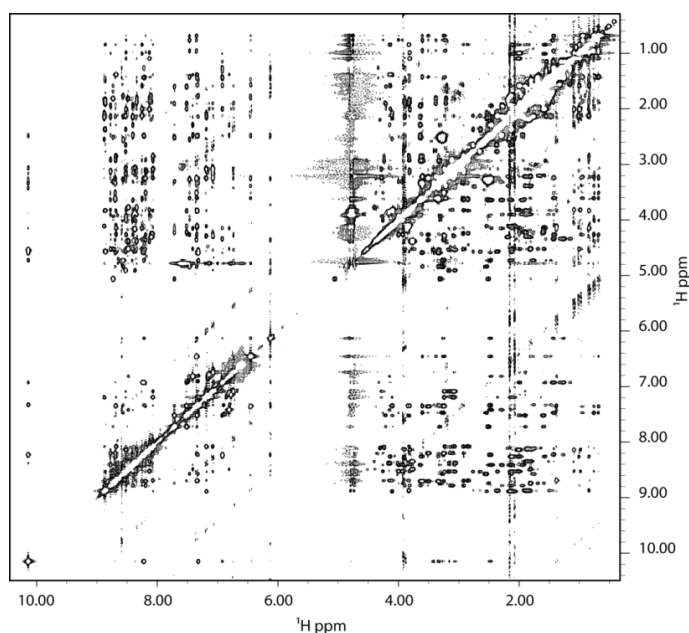


Figura 4.9. Espectro NOESY de la proteína recombinante GS-Ts16.

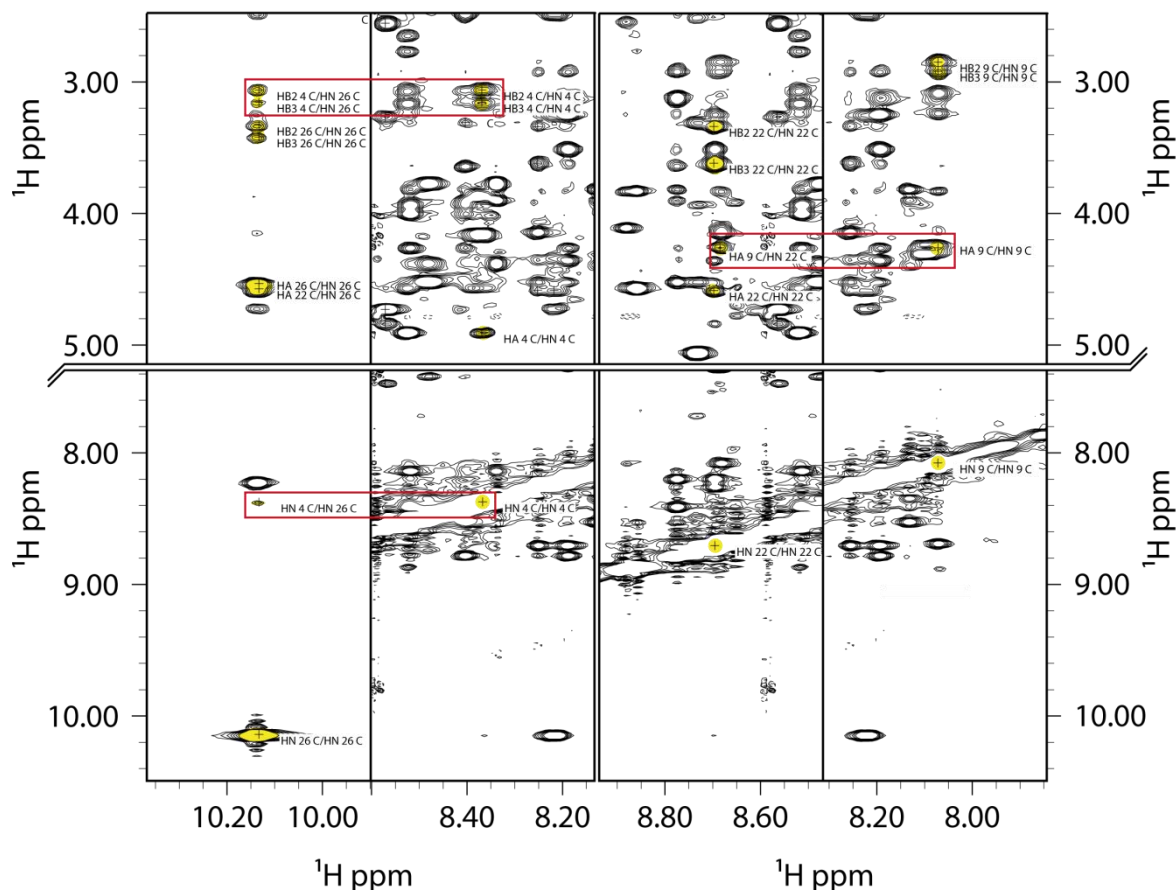


Figura 4.10. Asignaciones de las interacciones entre los protones beta de las cisteínas. En **A**, se presentan las interacciones entre las cisteínas 4 y 26 (**C₁-C₅**). En **B**, las interacciones mostradas corresponden a las cisteínas 9 y 22 de la proteína recombinante GS-Ts16.

Al final de la asignación, el conjunto de picos en el espectro ^1H , ^1H NOESY se integró en el programa CYANA; con ello se establecieron las restricciones de distancias en función del valor de la integral de cada señal. Posteriormente, se evaluó la asignación iterativamente con el mismo programa. Después de seis iteraciones, las coordenadas atómicas de 20 estructuras se escribieron en el archivo “final.pdb” en formato PDB. El RMSD^{††} (root mean square deviation; el cual indica la divergencia entre las coordenadas atómicas de las estructuras comparadas) del ensamble anterior fue de 0.35 Å. Los resultados se muestran en la tabla Tabla 4.2.

^{††}RMSD calculado del aminoácido 3 al aminoácido número 31 en la secuencia de GS-Ts16.

Tabla 4.2. Resultados de la evaluación de la asignación usando CYANA 2.0.

Cycle	1	2	3	4	5	6	7	Final
Peaks								
selected	820	820	820	820	820	820	820	820
assigned	787	812	808	810	807	809	809	
unassigned	33	8	12	10	13	11	11	
with diagonal assignment	15	15	15	15	15	15	15	
Cross peaks								
with off-diagonal assignment	772	797	793	795	792	794	794	
with unique assignment	496	706	747	747	762	766	768	
with short-range assignment $ i-j \leq 1$	610	607	602	602	595	596	594	
with medium-range assignment $1 < i-j < 5$	81	90	90	90	91	92	92	
with long-range assignment $ i-j \geq 5$	81	100	101	103	106	106	108	
Comparison with reference assignment								
Cross peaks with reference assignment	708	708	708	708	708	708	708	
with identical reference assignment	448	620	649	647	659	664	664	
with compatible reference assignment	683	696	687	689	686	688	685	
with incompatible reference assignment	2	8	14	14	15	14	17	
with additional reference assignment	22	3	6	4	6	5	5	
with additional assignment	87	93	92	92	91	92	92	
Upper distance limits								
total	407	409	406	404	404	405	412	421
short-range, $ i-j \leq 1$	270	252	246	244	239	240	237	251
medium-range, $1 < i-j < 5$	106	121	80	80	82	83	86	85
long-range, $ i-j \geq 5$	31	36	80	80	83	82	89	85
Average assignments/constraint	2.15	1.54	1.07	1.06	1.04	1.03	1.00	1.00
Average target function value	1.15	2.57	4.10	0.36	0.21	0.20	0.19	0.17
RMSD (residues 3..31)								
Average backbone RMSD to mean	0.84	0.74	0.36	0.37	0.38	0.36	0.31	0.35
Average heavy atom RMSD to mean	1.45	1.28	1.05	1.03	1.07	1.03	1.03	1.00

4.5.1 Refinamiento de la estructura

El refinamiento de las estructuras obtenidas se efectuó con dinámica molecular utilizando el programa AMBER 9. Las coordenadas de cada una de las estructuras refinadas se colocaron en el archivo de depósito al Protein Data Bank (código 2LKA) ordenadas de la estructura de menor a mayor energía. Los resultados de la energía asociada a cada una de las 20 estructuras después de realizar los pasos de cálculo computacional se enlistan en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Resultados de las 20 estructuras refinadas en AMBER 9.

Estructura calculada	Términos Energéticos (Kcal/mol)								Número de modelo en el reporte PDB
	Enlace	Ángulo	Torsión	VDW	EEL *	1-4 VDW**	1-4 EEL**	Energía en Amber	
1	2857.3	65.3	271.6	6517.7	-48965.3	87.7	1365.8	-37800.02	8
2	2744.9	61.4	285.3	6291.7	-47307.2	88.8	1378.2	-36457.04	13
3	2838.3	67.5	277.2	6502.6	-48800.5	88.6	1350.8	-37675.42	9
4	2684.4	63.0	283.5	6152.6	-46247.9	88.5	1392.7	-35583.23	16
5	3181.5	75.7	281.7	7403.0	-54061.5	88.0	1354.6	-41677.09	2
6	2630.9	69.0	280.5	6142.3	-45297.9	84.9	1372.8	-34717.55	20
7	2680.7	67.5	274.9	6250.7	-45862.9	87.3	1358.1	-35143.76	18
8	2749.1	66.4	294.7	6333.0	-47301.6	88.9	1378.0	-36391.54	14
9	2706.1	70.8	272.5	6243.3	-46469.5	87.7	1356.8	-35732.43	15
10	2819.4	68.1	274.0	6497.5	-48391.6	89.0	1378.4	-37265.00	11
11	2765.6	75.6	272.5	6363.1	-47429.9	87.0	1357.4	-36508.74	12
12	2975.2	70.0	276.8	6906.3	-50815.4	87.8	1374.3	-39125.12	4
13	3425.6	67.4	283.2	7926.8	-58267.3	89.6	1367.2	-45107.44	1
14	2682.9	67.7	277.2	6269.3	-46231.6	90.6	1376.9	-35466.97	17
15	3058.8	66.7	279.2	7096.8	-51970.4	88.5	1369.4	-40011.07	3
16	2886.7	70.4	284.3	6797.9	-49388.5	88.8	1368.2	-37892.32	7
17	2629.3	65.8	273.2	6069.4	-45341.5	89.6	1369.9	-34844.29	19
18	2929.6	66.2	275.2	6685.2	-50096.5	87.7	1377.4	-38675.30	6
19	2903.2	69.9	290.9	6635.6	-50065.4	86.6	1356.3	-38722.88	5
20	2838.5	68.1	281.2	6627.2	-48611.7	87.9	1360.7	-37348.14	10

*Término de la contribución electrostática.

**El término 1-4 refiere a la suma de las contribuciones de las interacciones no enlazantes entre los átomos 1-2, 1-3 y 1-4.

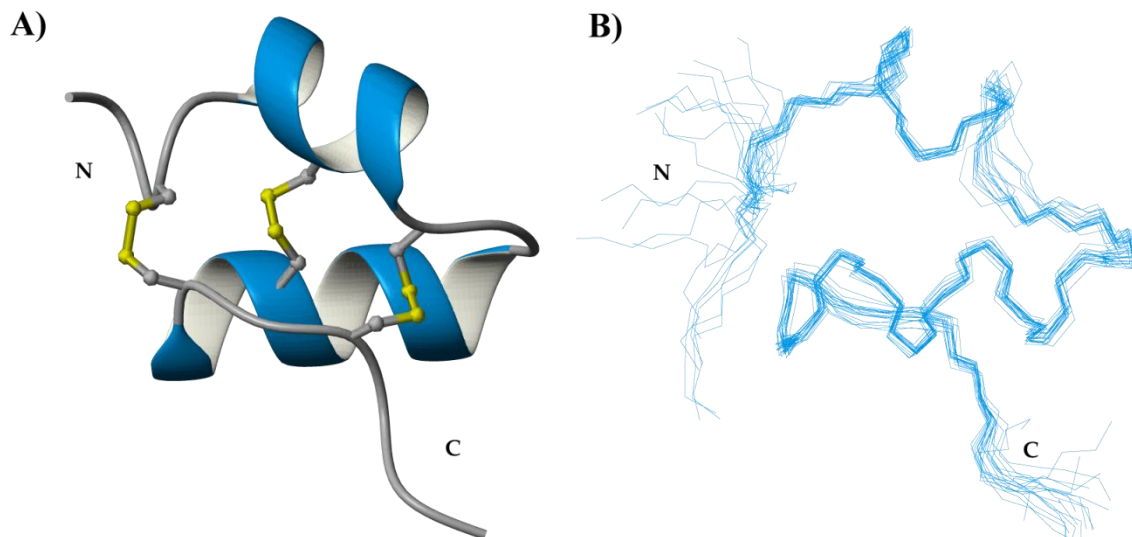


Figura 4.11. (A) Representación de listones de la proteína GS-Ts16 resuelta por RMN. La figura corresponde a la estructura con la menor energía obtenida en el refinamiento de las 20 estructura con AMBER 9. (B) Representación de la cadena principal de las 20 estructuras de GS-Ts16.

Del ensamble de 20 estructuras, se seleccionó a la estructura de menor energía (Ts16_13.pdb) y con ella se calculó la superficie de potencial electrostático en el programa APBS⁽³⁷⁾. En el mapa de la superficie de potencial se logró observar la distribución de cargas en la estructura tridimensional de la Ts16 (Figura 4.12).

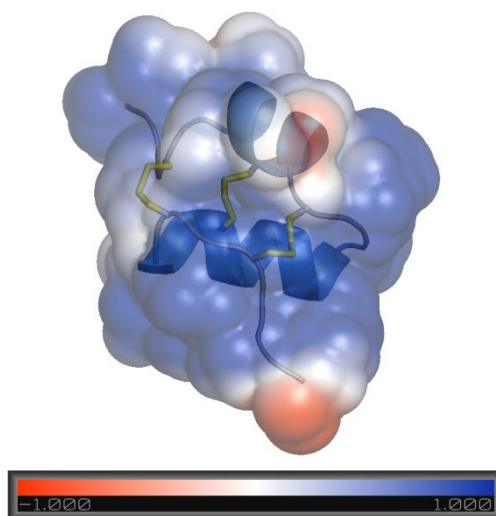


Figura 4.12. Superficie de potencial para la estructura de menor energía de la proteína GS-Ts16. Calculo en APBS utilizando el campo de fuerza de AMBER.

5 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 Biosíntesis de Ts16

Después de encontrar las condiciones experimentales adecuadas, la sobre-expresión de la proteína Ts16 fue posible utilizando la cepa de *E. coli* Rosetta™; Figura 3.1 (p. 14). En este sistema, la mayoría de la proteína de fusión sintetizada se mantuvo soluble en el extracto celular (Figura 4.1, p. 20), sin que se observara en los geles de SDS-PAGE la formación de agregados insolubles. No se observó precipitación de proteínas después del fraccionamiento del extracto celular por centrifugación, lo cual permitió enfocar el trabajo experimental en la purificación de GS-Ts16, su caracterización y la determinación estructural por RMN.

5.2 Purificación

El gel SDS-PAGE de la Figura 4.3 (p. 22) muestra en el último carril el aumento en la intensidad de la banda correspondiente a la proteína de fusión. El aumento se logró con la utilización de CAMQ para aislar a la proteína de fusión de la parte soluble del extracto celular. El rendimiento promedio de esta última fracción se estimó, con el método de Bradford, en 6 mg de proteína total por litro de cultivo, resultado que pareció en primera instancia satisfacer la demanda de proteína necesaria para el estudio estructural por RMN. Sin embargo, al final de la purificación, el rendimiento de proteína GS-Ts16 no fue totalmente satisfactorio (0.51 mg/L). No se observó la formación de precipitados después de retirar por diálisis el exceso de imidazol en la fracción purificada por CAMQ, denotando de esta forma, que las proteínas en disolución presentan estabilidad en las condiciones señaladas.

Los mejores resultados para el corte de la proteína de fusión con trombina se observaron con la utilización de *BLI* como disolución amortiguadora, ya que en estas condiciones, independientemente de la concentración de proteína, no se observó precipitación, en comparación a la utilización de una disolución amortiguadora de Tris 50 mM a pH 8.0. En lo que respecta a la variación de la concentración de proteína para el corte, no se observó ninguna dificultad para trabajar con la concentración de 3 mg/mL; utilizando trombina a ~80 mg/mL. El tiempo de la reacción de corte (Figura 4.4, p. 22) se fijó en 2, 3 y 4 horas para las concentraciones de 1, 2 y 3 mg/mL respectivamente, de proteína de fusión. La extensión del tiempo de corte es congruente con el aumento de la concentración de proteína susceptible a la

Análisis y discusión de resultados

hidrólisis con trombina. Se decidió utilizar para el corte una concentración de 3 mg/mL, pues, sin omitir los beneficios de un corte rápido, resultó más práctico purificar un lote concentrado de 3 mg/mL cuyo volumen es 3 veces menor al de un lote con concentración de 1 mg/mL. El retiro de los residuos de corte (proteína de fusión sin la secuencia de aminoácidos de la GS-Ts16) se realizó nuevamente de forma efectiva por CAMQ.

El cromatograma de la Figura 4.5 (p. 23) muestra la purificación de la proteína GS-Ts16 por HPLC. El método utilizado para la purificación fue optimizado hasta lograr la separación de los 2 picos en el cromatograma referido. A pesar de que el gradiente utilizado se optimizó para conseguir la mejor separación posible, no se logró la purificación completa de los picos referidos en una sola corrida cromatográfica, pues como se menciona más adelante en el análisis de los resultados de espectrometría de masas (sección 5.3), ambas moléculas guardan una gran similitud lo que dificultó su purificación. Por lo anterior, fue necesario coleccionar por separado las fracciones de los picos señalados, retirar el disolvente mediante liofilización y volver a realizar el mismo método de separación, logrando de este modo una separación completa y por consiguiente una mejor purificación; Figura 4.6 (p. 24).

El rendimiento promedio de la proteína GS-Ts16 por litro de cultivo bacteriano se calculó en 0.56mg/L. Con este rendimiento, fue necesario incubar 6 L de cultivo bacteriano para satisfacer la demanda de 3 mg de proteína para la caracterización y la determinación estructural por RMN.

5.3 Caracterización

Las dos proteínas de los picos cromatográficos de la Figura 4.5 (p. 23) fueron caracterizados por espectrometría de masas MALDI-TOF. En cada uno de los espectros MALDI-TOF de ambas proteínas no se encontró otra señal dentro del intervalo monitoreado (de 1'000 a 12'000 unidades de peso molecular), corroborando la purificación de una sola proteína en cada uno de los picos cromatográficos. Se observó que el peso molecular de ambas proteínas concordaba con el cálculo del peso molecular para la proteína GS-Ts16 con las cisteínas oxidadas. Este resultado y las dificultades encontradas para la separación cromatográfica, confirmó la obtención de dos proteínas del mismo peso molecular, lo que sugiere fuertemente que durante la síntesis y purificación se obtuvieron dos conformaciones tridimensionales de la GS-Ts16.

La dificultad para purificar ambas especies químicas por HPLC demuestra que existe una gran similitud en la naturaleza química de ambas proteínas. Simultáneamente, la identificación por MALDI-TOF de la misma masa molecular sugiere que entre ambas proteínas

Análisis y discusión de resultados

existe una estrecha similitud estructural. Esto se toma como evidencia de que coexistan dos conformaciones de la proteína recombinante GS-ts16, una de ellas con un carácter ligeramente más hidrofóbico.

Para decidir si ambas o alguna de las proteínas purificadas eran susceptibles a la determinación de su estructura tridimensional por RMN, se evaluaron los respectivos espectros de protón (^1H -RMN), analizando la dispersión de las señales correspondientes a los protones de amida de la cadena principal. Debido a que el desplazamiento químico (δ) de un núcleo detectado por RMN es consecuencia del ambiente químico que lo rodea, las diferencias en el valor de δ es un reflejo del ambiente electrónico cercano a cada uno de los protones detectados en el espectro ^1H -RMN. Por ejemplo, un protón de amida que forma un puente de hidrógeno dentro de una hoja β tendrá un δ distinto a cuando el mismo protón se encuentre formando en un puente de hidrogeno en una hélice α . Si las señales correspondientes a los protones de amida no exhiben diferencias de δ (se encuentran en una región muy restringida del espectro), se infiere que los átomos analizados se encuentran en un ambiente químico muy similar, correspondiendo a una pérdida de estructura tridimensional. Esta sencilla y trascendental prueba espectroscópica dio la pauta elegir adecuadamente que proteína era adecuada para estudiar su estructura y cual no. Se decidió trabajar con el pico cromatográfico cuyo t_r fue de 16.47 minutos, ya que la proteína correspondiente a esta fracción presentó el patrón de RMN que caracteriza a las proteínas con una estructura tridimensional definida. En la región de 6.0 a 10.5 ppm del espectro de la Figura 4.8 se puede verificar la dispersión de las señales de los protones de amida $^1\text{H}^N$ presentes en la cadena principal de la GS-Ts16. En cambio, el espectro de la segunda proteína ($t_r = 16.97$ min.) no presenta el patrón referido. Por esta razón, se decidió trabajar con la fracción que sí presentaba estructura tridimensional.

5.4 Determinación estructural por RMN

Gracias a la excelente calidad de los espectros COSY, TOCSY y NOESY; fue posible identificar y asignar los sistemas de espín de todos los aminoácidos que conforman a la GS-Ts16. La asignación de los sistemas de espín permitió encontrar en el espectro NOESY interacciones a través del espacio entre los aminoácidos de la GS-Ts16. Unas las interacciones más importantes identificadas en el espectro NOESY, fueron las utilizadas para la determinación de los puentes disulfuro.

Se encontraron las señales nOe para establecer restricciones de distancia entre algunos de los protones β de las cisteínas presentes en la secuencia primaria. Para el puente disulfuro C_1 - C_5 las interacciones entre los $^1\text{H}^\beta$ se identificaron en la cisteína número 4 y la número 26. En el siguiente puente C_2 - C_4 , se logró encontrar correlaciones entre los protones β de las cisteínas 9

Análisis y discusión de resultados

y 22. No se encontró evidencia espectroscópica de la formación del puente C_3-C_6 entre las cisteínas 13 y 28. Para verificar que la configuración de los puentes disulfuro, se realizó el cálculo de la estructura con la configuración clásica C_1-C_4 , C_2-C_5 y C_3-C_6 ; y con la sospecha de la configuración C_1-C_5 , C_2-C_4 y C_3-C_6 .

Analizando los resultados del cálculo de estructura en CYANA 2.0, se observó que en ambos casos se encontraron señales que entraron en conflicto, dando origen a algunas violaciones de restricciones de distancia. Para la configuración C_1-C_4 , C_2-C_5 y C_3-C_6 se identificaron 17 señales nOe en conflicto, contra 6 señales en la estructura con la nueva configuración C_1-C_5 , C_2-C_4 y C_3-C_6 . El número de violaciones a las restricciones de distancia generadas por las señales en conflicto fueron 33 en la configuración clásica, mientras que en la otra estructura se identificaron 15. De las 33 violaciones generadas en la configuración clásica, 7 son violaciones mayores a 2.0 Å, 19 violaciones mayores a 1.0 Å y 6 son violaciones mayores a 0.3 Å. En cambio, en la estructura con la nueva configuración de puentes se presenta 1 violación mayor a 2.0 Å, 6 violaciones mayores a 1.0 Å y 4 violaciones mayores a 0.3 Å. Estos resultados marcan el apego de la estructura con los puentes C_1-C_5 , C_2-C_4 y C_3-C_6 a los resultados espectroscópicos de RMN, conduciendo a que la estructura de la GS-Ts16 se determinara con la configuración de puentes disulfuro C_1-C_5 , C_2-C_4 y C_3-C_6 .

Para evaluar la determinación de los elementos de estructura secundaria, se realizaron distintos análisis estadísticos para hacer la revisión del tipo y número de señales nOe utilizadas en los cálculos de estructura. En la Figura 5.1 **A** se muestra gráficamente la cantidad de restricciones utilizadas en función del rango de distancia, esto es, el valor absoluto de la diferencia entre los índices de los aminoácidos para los cuales se establece una correlación espacial en el espectro NOESY. La Figura 5.1 **B** muestra con mayor detalle el tipo de interacciones identificadas encada uno de los aminoácidos de la GS-Ts16. El color de las barras representan el tipo de interacciones en cada uno de los aminoácidos: Blanco, restricciones nOe dentro del mismo residuo ($|i-j|=0$); gris claro, restricciones de corto alcance ($|i-j|=1$); gris oscuro, correlaciones de mediano alcance ($1<|i-j|<5$); de color negro, las correlaciones de largo alcance ($|i-j|\geq 5$). Este análisis del número y tipo de restricciones toma relevancia al considerar que las restricciones de mediano y largo alcance son las responsables de establecer, en mayor medida, la estructura tridimensional de una proteína^(31; 32; 33).

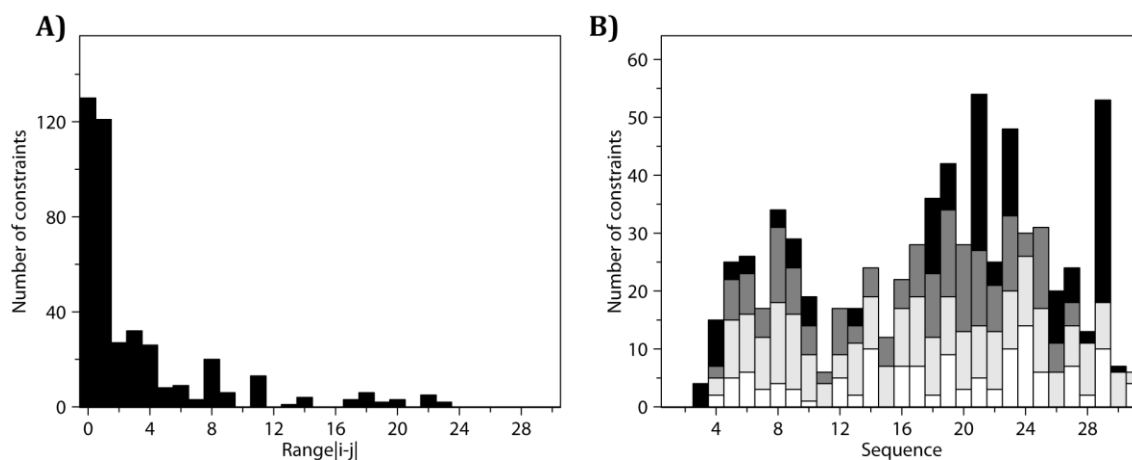


Figura 5.1. Gráficas con las estadísticas de las asignaciones nOe para la proteína GS-Ts16. En el inciso **A)** se muestra la gráfica de barras con el número de restricciones de distancia contra el valor absoluto de la diferencia entre los índices de los aminoácidos interaccionando (rango de distancia). En **B)** el gráfico muestra el número y tipo de restricciones nOe relacionada con cada uno de los aminoácidos, el color de la barra indica el rango de la correlación (Blanco $|i-j|=0$; gris claro $|i-j|=1$; gris oscuro $1 < |i-j| < 5$; negro $|i-j| \geq 5$).

Otro aspecto importante es la intensidad de ciertas señales nOe. Conociendo la interacción entre los protones de la cadena principal y algunos otros adyacentes ($^1H^{\beta}$), se pueden reconocer patrones para identificar elementos de estructura secundaria en una proteína. En la Figura 5.2 se intenta mostrar cuales son las correlaciones nOe que caracterizan a un protón de amida, dentro de una hélice alfa. La Figura 5.3 muestra una relación de las asignaciones nOe entre los protones $^1H^N$, $^1H^{\alpha}$ y $^1H^{\beta}$. En el gráfico de esta última figura, las regiones en las que existe la presencia de hélices alfa se caracteriza por tener en el renglón $d_{NN}^{(i,i+1)}$ señales nOe cuya intensidad relativa es de mediana a fuerte. Estas señales corresponden a las interacciones entre los protones secuenciales $^1H^N$ de los aminoácidos i e $i+1$, ejemplificadas en la Figura 5.2. Las interacciones a larga distancia $d_{NN}^{(i,i+2)}$ son también características de la presencia de hélices alfa.

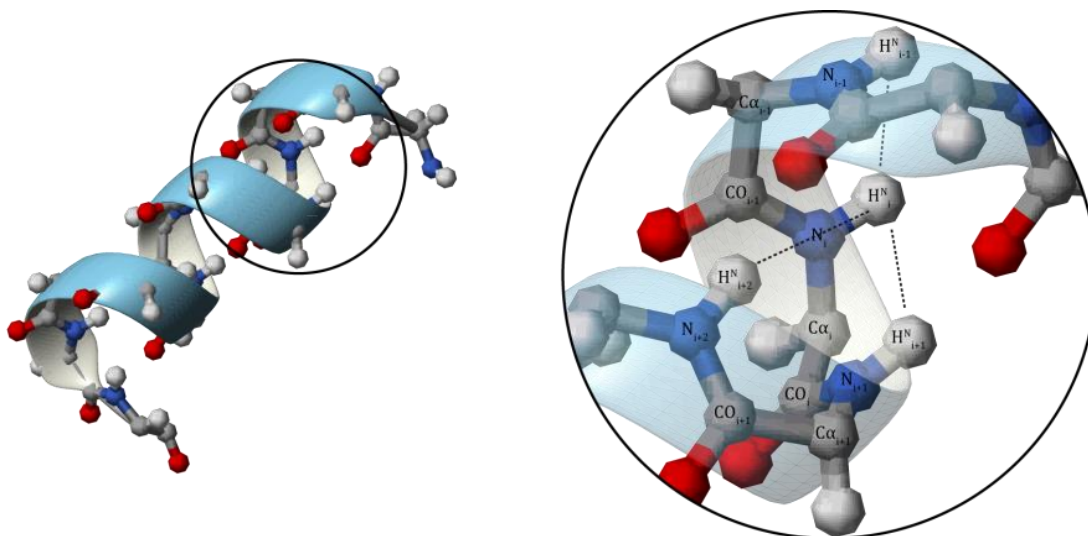


Figura 5.2. Interacciones de los protones de amida dentro de una alfa hélice. En la figura se muestran las interacciones responsables de establecer patrones de señales características del elemento de estructura secundaria asociado. Estos patrones son identificables en el espectro NOESY.

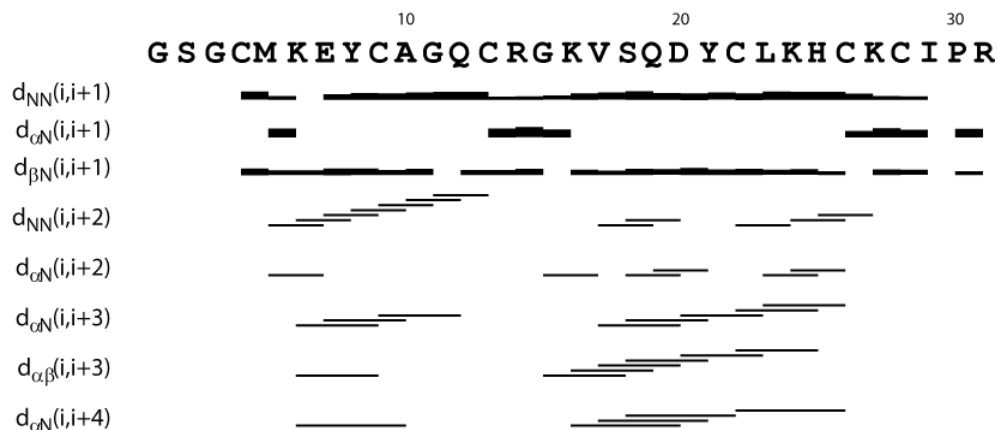


Figura 5.3. Asignación de las señales nOe en función de la secuencia de aminoácidos. En las filas $d_{NN}(i, i+1)$, $d_{\alpha N}(i, i+1)$ y $d_{\beta N}(i, i+1)$; la altura de las barras es proporcional a la intensidad relativa de la señal nOe. En los siguientes 5 renglones, las barras horizontales marcan la existencia de la señal nOe con las características descritas en la primera columna, entre los protones de los aminoácidos en los extremos de la barra.

El gráfico de Ramachandra en la Figura 5.4 se muestran los ángulos φ y ψ de las 20 estructuras obtenidas en el cálculo de estructura con CYANA 2.0. El 83.6 % de los pares de ángulos diedros caen en las zonas más favorecidas, mientras que el porcentaje restante se encuentra en las regiones adicionalmente permitidas. Las 20 estructuras se obtuvieron con un RMSD de 0.35 Å del aminoácido número 3 al 31.

Análisis y discusión de resultados

En cuanto a las estructuras de proteínas determinadas por RMN, comúnmente es deseable obtener un ensamble de estructuras con el menor RMSD posible; sin embargo, tiene gran relevancia el criterio utilizado para elegir dicho ensamble. Al respecto, Chris A.E.M. Spronk y colaboradores⁽³⁸⁾ han propuesto elegir el ensamble de estructuras que maximicen el RMSD y cumplan con el mayor número de restricciones encontradas por RMN. Con la maximización del RMSD se pretende encontrar una relación directa entre la precisión de las estructuras de proteína determinadas por RMN, ya que al obtener la máxima desviación en el ensamble de estructuras que cumplen las restricciones, se puede llegar a conocer algunas de las características dinámicas de la molécula⁽³⁸⁾. Para la determinación de la GS-Ts16 el criterio de elección fue seleccionar a las 20 estructuras de menor energía la cuales cumplieran con las restricciones encontradas por RMN.

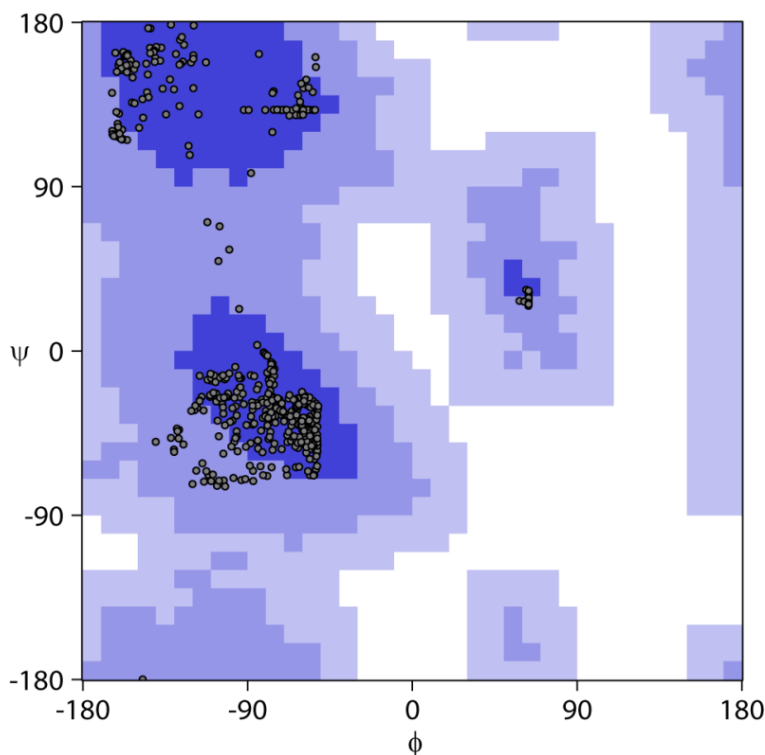


Figura 5.4. Gráfico de Ramachandra de las 20 estructuras calculadas en CYANA 2.0. Se distinguen 4 regiones de distinto color. Las regiones se clasifican estadísticamente en: 1) No permitidas. Representadas por las zonas de color blanco. 2) Regiones generosamente permitidas. Color gris claro. 3) Regiones adicionalmente permitidas. Tonalidad intermedia del color gris. 4) Regiones favorecidas. Zonas representadas por el color gris oscuro. 83.6 % de las combinaciones de ángulos ψ y ϕ están dentro de la región más favorecida. El resto de combinaciones se encuentran dentro de las regiones adicionalmente permitidas (16.4 %).

El refinamiento en AMBER 9.0 de las estructuras obtenidas en CYANA 2.0 ayudó a minimizar el número de violaciones a las restricciones de resonancia, obteniendo de esta

Análisis y discusión de resultados

forma una estructura que cumple mejor con las restricciones de RMN. En el archivo sumviol (Apéndice A.2 p.46) se observaron únicamente violaciones de distancia menores a 0.5 Å, lo cual se encuentra dentro de los límites normalmente considerados para hacer la determinación estructural de proteínas en disolución⁽³⁸⁾.

Una vez conocida la estructura de la GS-Ts16, esta representación se comparó con su homóloga la toxina κ -BUTX-Tt2b. La comparación de la representación en listones de la estructura de menor energía de ambas proteínas se ilustra en la Figura 5.5 en los incisos A y B.

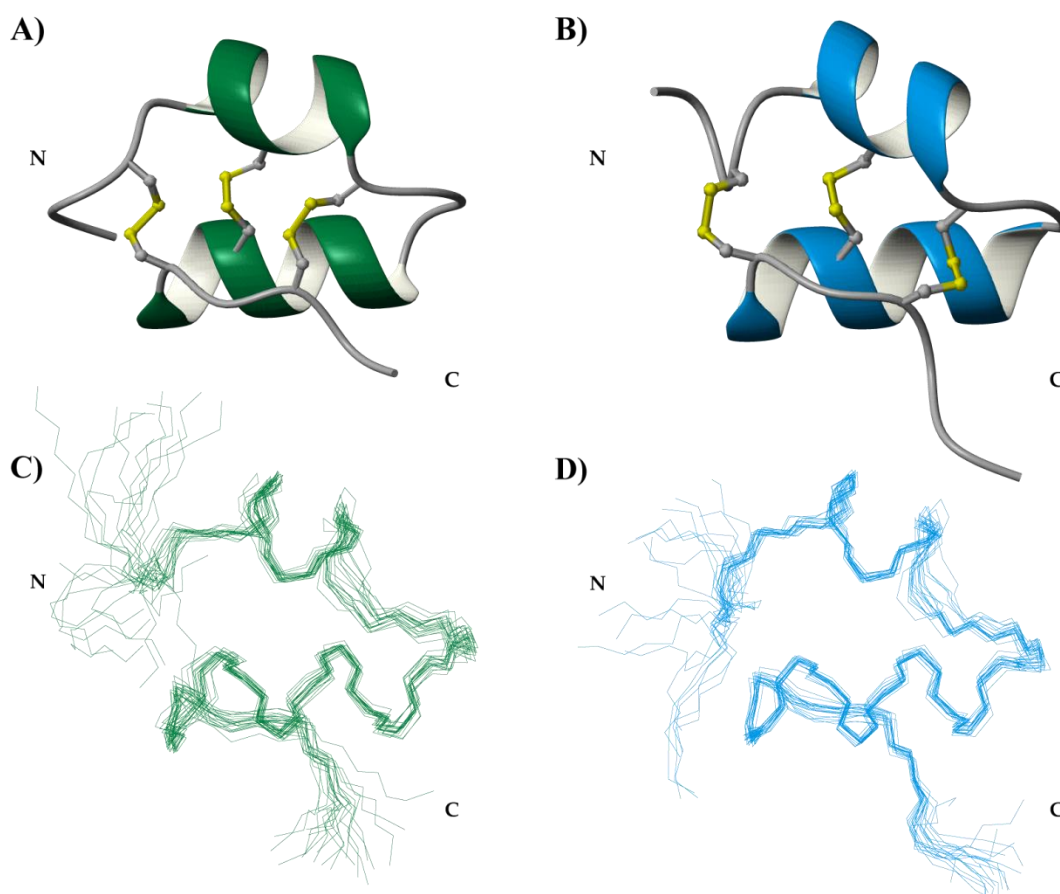


Figura 5.5. Representación en listones de las estructuras obtenidas por RMN de (A) la toxina κ -BUTX-Tt2b y (B) la proteína Ts16. En los incisos C y D se muestra la representación de la cadena principal de las 20 estructuras determinadas por RMN de ambas proteínas. El RMSD para la GS-Ts16 fue de 0.45 Å.

En la Figura 5.5 se puede observar que las proteínas comparadas poseen la misma conformación espacial, además de la misma configuración de puentes disulfuro, los cuales se forman entre las cisteínas C₁-C₅, C₂-C₄ y C₃-C₆. Una de las similitudes más evidentes entre las dos proteínas comparadas son los elementos de estructura secundaria, en donde se observa

Análisis y discusión de resultados

un par de hélices α en ambas estructuras, formando un motivo estructural CS- α/α . Comparativamente, el par hélices alfa en la toxina κ -BUTX-Tt2b van de la prolina 4 a la glutamina 12 para la primera hélice, la segunda hélice va de la valina 15 a la asparagina 23, en tanto, la primera hélice de la proteína Ts16 comienza en la lisina número 4 y termina en la glutamina 12, mientras que la siguiente hélice comienza en la lisina 14 y termina en la histidina 23. Lo anterior evidencia la enorme similitud que existe entre los elementos de estructura secundaria de las proteínas comparadas, aunado a la configuración de los puentes disulfuro, esta comparación exhibe que ambas proteínas pertenecen a una misma clasificación estructural de KTx. No obstante que ambas son parte de una misma familia, se pueden encontrar diferencias significativas al analizar a detalle la superficie de potencial electrostático correspondiente a cada una de las estructuras señalada.

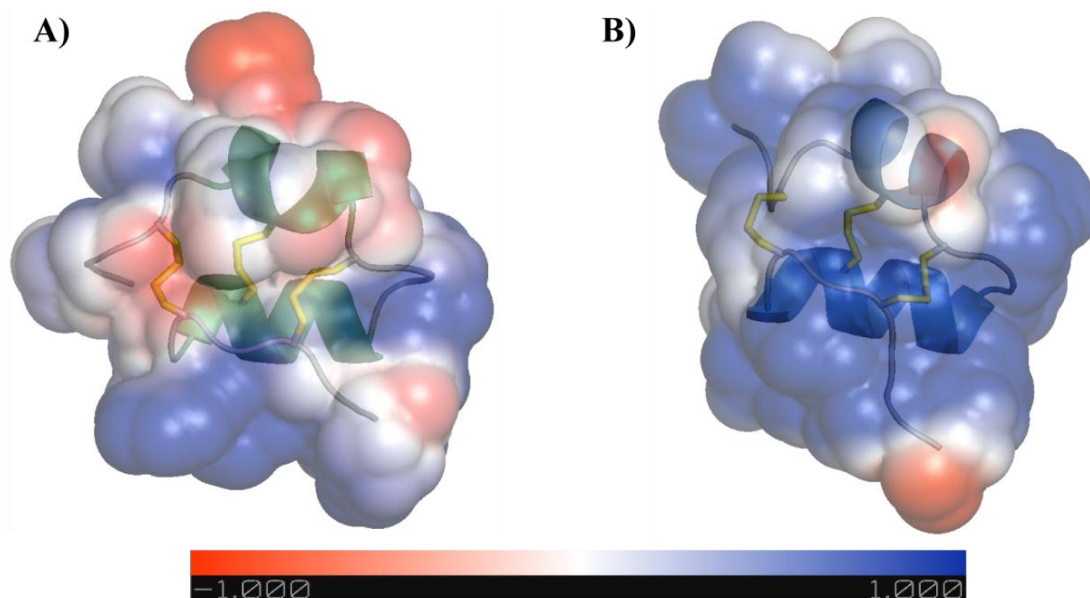


Figura 5.6. Comparación de las superficies de potencial electrostático. En (A) la toxina κ -BUTX-Tt2b y en (B) la proteína GS-Ts16. Ambos mapas de potencial electrostático fueron calculados en el programa APBS⁽³⁷⁾ con las correspondientes estructuras de menor energía.

La Figura 5.6 muestra una comparación de las superficies de potencial electrostático entre la toxina κ -BUTX-Tt2b y la proteína GS-Ts16. A simple vista, se pueden apreciar diferencias en los mapas de superficie de potencial electrostático, la toxina κ -BUTX-Tt2b posee una superficie con regiones altamente positivas, no tanto así regiones negativas (Figura 5.6 A). La proteína GS-Ts16 presenta una superficie con un alto porcentaje de carga positiva, inclusive mayor a la κ -BUTX-Tt2b, haciendo que la superficie parezca más homogénea (Figura 5.6 B) en cuanto a carga se refiere. En este punto de comparación, lo más lógico es pensar que la actividad de ambas proteínas sería sustancialmente distinta, debido a las diferencias

encontradas en los potenciales electrostáticos de ambas proteínas. Sin embargo, estas conjeturas deben de ser minuciosamente comprobadas realizando pruebas electrofisiológicas para comparar la actividad biológica de ambas proteínas. En caso de conocer su actividad biológica se podrían aportar más evidencias experimentales para intentar ampliar el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en el bloqueo de los canales por este tipo de toxinas, ya que hay una gran homología entre las proteínas comparadas a nivel estructural y de secuencia de aminoácidos. Al presentarse cambios significativos en la actividad específica de alguna proteína respecto a su homóloga las modificaciones estructurales debida al cambio de los aminoácidos puede apreciarse con mayor facilidad.

5.4.1 Una nueva familia de KTx

Hasta la elucidación estructural de la κ -BUTX-Tt2b⁽¹¹⁾ no se conocían variantes de los plegamientos adoptados por las KTx de alacrán con 6 cisteínas conservadas^(1; 4). La elucidación estructural de la κ -BUTX-Tt2b permitió observar por primera vez un plegamiento alternativo en las toxinas mencionadas. Sin embargo, era transcendental encontrar otra toxina que confirmara el plegamiento adoptado por la toxina κ -BUTX-Tt2b. La determinación estructural de la GS-Ts16 permitió llevar a cabo la confirmación de un nuevo tipo estructural de toxinas bloqueadoras de canales iónicos de potasio. Además de exhibir la versatilidad de la configuración de los puentes disulfuro en este tipo de toxinas.

6 CONCLUSIÓN

La determinación estructural de la proteína recombinante GS-Ts16 confirma la existencia de una nueva clase estructural de proteínas bloqueadoras de canales iónicos de potasio. Estos resultados suponen el replanteamiento de la nomenclatura hasta ahora adoptada para las KTx con 6 cisteínas.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. *Mining on scorpion venom biodiversity*. **Rodríguez de la Vega, R.C., Schwartz, E. F., and Possani, L. D.** 7, 2010, *Toxicon*, Vol. 56, pp. 1155-1161.
2. *The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants*. **Ma, J. K. -, Drake, P. M. W., and Christou, P.** 19, 2003, *Nature Reviews Genetics*, Vol. 4, págs. 794-805.
3. *Plant immunity to insect herbivores*. **Howe, G. A., and Jander, G.** 2008, *Annual Review of Plant Biology*, Vol. 59, págs. 41-66.
4. *The cystine knot motif in toxins and implications for drug design*. **Craik, D. J., Daly, N. L., and Waite, C.** 1, 2000, *Toxicon*, Vol. 39, págs. 43-60.
5. *Animal Toxins Acting on Voltage-Gated Potassium Channels*. **Mouhat, S., Andreotti, N., Jouriou, B., and Sabatier, J.** 24, 2008, *Current Pharmaceutical Design*, Vol. 14, págs. 2503-2518.
6. *Animal peptides targeting voltage-activated sodium channels*. **Billen, B., Bosmans, F., and Tytgat, J.** 24, 2008, *Current Pharmaceutical Design*, Vol. 14, págs. 2492-2502.
7. *Peptides targeting voltage-gated calcium channels*. **Norton, R. S., and McDonough, S. I.** 24, 2008, *Current Pharmaceutical Design*, Vol. 14, págs. 2480-2491.
8. **Bordon K.C.F., Varanda W.A. and Arantes E.C.** Uniprot Primary accession number: P86271. [En línea] 4 de Noviembre de 2009. [Citado el: 7 de Octubre de 2010.] <http://www.uniprot.org/uniprot/P86271>.
9. **National Center for Biotechnology Information.** Protein BLAST. [En línea] [Citado el: 7 de Octubre de 2010.] http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome.
10. *A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals*. **Glenn F. King, Margaret C. Gentz, Pierre Escoubas and Graham M. Nicholson.** 2, 2008, *Toxicon*, Vol. 52, págs. 264-276.
11. *New tricks of an old fold: structural versatility of scorpion toxins with common cysteine spacing*. **Saucedo A. L., Flores-Solis D., Rodríguez de la Vega R. C., Ramírez-Cordero B., Hernández-López R., Cano-Sánchez P., Noriega Navarro R., García-Valdés J., Coronas-Valderrama F., de Roodt A., Brieba L. G., Possani L. and del Río-Portilla F.** *Journal of Biological Chemistry*. In press. Aceptado para su publicación el 23 de diciembre de 2011.
12. *Scorpion toxins specific for Na⁺-channels*. **Possani, L. D., Becerril, B., Delepierre, M., and Tytgat, J.** 2, 1999, *European Journal of Biochemistry*, Vol. 264, págs. 287-300.
13. *A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: α -KTx molecular subfamilies*. **Jan Tytgat, K.George Chandy, Maria L Garcia, George A Gutman, Marie-France Martin-Eauclaire, Jurg J van der Walt and Lourival D Possani.** 11, 1999, *Trends in Pharmacological Sciences*, Vol. 20, págs. 444-447.

14. *Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels.* **Possani, Ricardo C. Rodríguez de la Vega and Lourival D.** 8, 2004, *Toxicon*, Vol. 43, págs. 865-875.
15. *Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels.* **S. Mouhat, B. Jouirou, A. Mosbah, M. De Waard and J.-M. Sabatier.** 3, 2004, *Biochemical Journal*, Vol. 378, págs. 717-726.
16. *Cytolytic and K⁺ channel blocking activities of β -KTx and scorpine-like peptides purified from scorpion venoms.* **Diego-García, E., Abdel-Mottaleb, Y., Schwartz, E. F., De La Vega, R. C. R., Tytgat, J., and Possani, L. D.** 1, 2008, *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 65, págs. 187-200.
17. *κ -Hefutoxin1, a Novel Toxin from the Scorpion *Heterometrus fulvipes* with Unique Structure and Function: IMPORTANCE OF THE FUNCTIONAL DIAD IN POTASSIUM CHANNEL SELECTIVITY.* **Kellathur N. Srinivasan, Vaithiyalingam Sivaraja, Isabelle Huys, Toru Sasaki, Betty Cheng, Thallampuranam Krishnaswamy S. Kumar, Kazuki Sato, Jan Tytgat, Chin Yu, B. Chia Cheng San, Shoba Ranganathan, H. John Bowie, R. Manjunatha Kini, and Ponnampalam Gop.** 33, 2002, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 277, págs. 30040-30047.
18. *Assignment of voltage-gated potassium channel blocking activity to κ -KTx1.3, a non-toxic homologue of κ -hefutoxin-1, from *Heterometrus spinifer* venom.* **Selvanayagam Nirthanan, Joost Pil, Yousra Abdel-Mottaleb, Yuko Sugahara, Ponnampalam Gopalakrishnakone, Jeremiah S. Joseph, Kazuki Sato and Jan Tytgat.** 4, 2005, *Biochemical Pharmacology*, Vol. 69, págs. 669-678.
19. *An unusual fold for potassium channel blockers: NMR structure of three toxins from the scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*.* **B. Chagot, C. Pimentel, L. Dai, J. Pil, J. Tytgat, T. Nakajima, G. Corzo, H. Darbon and G. Ferrat.** 1, 2005, *Biochemical Journal*, Vol. 388, págs. 263-271.
20. *The new kappa-KTx 2.5 from the scorpion *Opisthacanthus cayaporum*.* **Thalita Soares Camargos, Rita Restano-Cassulini, Lourival Domingos Possani, Steve Peigneur, Jan Tytgat, Carlos Alberto Schwartz, Erica Maria C Alves, Sonia Maria de Freitas and Elisabeth Ferroni Schwartz.** 7, 2011, *Peptides*, Vol. 32, págs. 1509-1517.
21. *Animal toxins acting on voltage-gated potassium channels.* **Mouhat, S., N. Andreotti, B. Jouriou, and J. -M Sabatier.** 24, 2008, *Current Pharmaceutical Design*, Vol. 14, págs. 2503-2518.
22. *A novel toxin from the venom of the scorpion *Tityus trivittatus*, is the first member of a new α -KTX subfamily.* **Yousra Abdel-Mottaleb, Fredy V. Coronas, Adolfo R. de Roodt, Lourival D. Possani and Jan Tytgat.** 2, 2006, *FEBS Letters*, Vol. 580, págs. 592-596.
23. *Disulfide bridges and blockage of shaker B K⁺-channels by another butantoxin peptide purified from the argentinean scorpion *tityus trivittatus*.* **Coronas, F. V., A. R. De Roodt, T. Olamendi-Portugal, F. Z. Zamudio, C. V. F. Batista, F. Gómez-Lagunas, and L. D. Possani.** 2, 2003, *Toxicon*, Vol. 41, págs. 173-179.
24. MAFFT 6. *Multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequences.* [En línea] 6.0. [Citado el: 7 de Enero de 2011.] <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>.
25. **Madigan, Michael T, Martinko, John M y Parker, Jack.** *Biología de los microorganismos.* Décima. s.l. : Pearson Prentice Hall, 2003.
26. **Alberts, Bruce, y otros, y otros.** *Biología Molecular de la Célula.* Tercera Edición en español. s.l. : Omega.

27. **McPerson, M.J. y G., Moller S.***PCR*. First edition. New York : BIOS scientific, 2000. ISBN: 1859960170.
28. **Cunico, Robert L., Gooding, Karen M. y Wehr, Tim.***Basic HPLC and CE of Biomolecules*. Richmond, California : Bay Bioanalytical Laboratory, 1998.
29. *Nobel lecture: The Principle of Nuclear Induction*. **Bloch, Félix**. 1952.
30. *Nobel lecture: Research in Nuclear Magnetism*. **Purcel, Edwards Mills**. 1952.
31. **Wuthrich, Kurt.***NMR of proteins and nuclear acids*. Segunda edición. New York : J. Wiley, 1986. pág. 296. ISBN: 0-471-82893-9.
32. *NMR-This Other Method for Protein and Nucleic Acid Structure Determination*. **Wüthrich, Kurt**. 1995, Acta Crystallographica, Vol. D51, págs. 249 - 270.
33. *NMR spectroscopy: a multifaceted approach to macromolecular structure*. **Ferentz, Ann E. y Wagner, Gerhard**. 1, 2000, Quarterly Reviews of Biophysics, Vol. 33, págs. 29 - 65.
34. **Levitt, Malcolm H.***Spin Dynamics*. Second Edition. s.l. : John Wiley & Sons Ltd, 2008.
35. *Comparison of protein solution structures refined by molecular dynamics simulation in vacuum, with a generalized born model, and with explicit water*. **Xia, B., V. Tsui, D. A. Case, H. J. Dyson, and P. E. Wright**. 4, 2002, Journal of Biomolecular NMR, Vol. 22, págs. 317-331.
36. **Cavanagh, John, y otros, y otros.***Protein NMR Spectroscopy: Principles an Practice*. San Diego, California : Academic Press, 1996. ISBN 0-12-164490-1.
37. *Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome*. **Baker, Nathan A., Sept, D., Simpson, J., Michael, Holst J. and McCammon, J. Andrew**. 18, 2001, Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol. 98, págs. 10037 - 10041.
38. *The precision of NMR structure ensembles revisited*. **Spronk, C. A. E. M., Nabuurs, S. B., Bonvin, A. M. J. J., Krieger, E., Vuister, G. W., and Vriend, G.** 3, 2003, Journal of Biomolecular NMR, Vol. 25, pp. 225-234.

APÉNDICE

A.1. Medios de cultivo y disoluciones

MEDIO LURIA BERTANI (LB)

Tripsina	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	10 g/L
pH	7.0

Disolver completamente los primeros tres componentes en 1 L de agua desionizada. Posteriormente, ajustar el pH de la disolución. Esterilizar en autoclave a 120 °C y 16.5 psi durante 20 minutos.

Tabla A.1. Disoluciones amortiguadoras utilizadas en la purificación y corte de la proteína de fusión.

Componente	Disolución amortiguadora		
	BLI	BLII	BLIII
Tris	50 mM		
NaCl	150 mM		
Imidazol	10 mM	500 mM	500 mM
pH	8.0		

A.2. Datos complementarios de la determinación estructural por RMN de la proteína Ts16

#	Filename	nvio	max	<0.1	0.2	0.3	0.4	>0.4	Amber energy	Constraint	b-dev	a-dev	align	Distance	Torsion	Noesy
1	min_01.o	12	0.25	4	6	2	0	0	-37800.02	10.50	0.0000	0.00	0.00	5.681	4.818	0.000
2	min_02.o	11	0.13	6	5	0	0	0	-36457.04	7.80	0.0000	0.00	0.00	2.877	4.921	0.000
3	min_03.o	11	0.28	2	8	1	0	0	-37675.42	9.76	0.0000	0.00	0.00	4.906	4.856	0.000
4	min_04.o	7	0.17	2	5	0	0	0	-35583.23	7.22	0.0000	0.00	0.00	2.343	4.874	0.000
5	min_05.o	11	0.23	5	5	1	0	0	-41677.09	9.56	0.0000	0.00	0.00	4.698	4.862	0.000
6	min_06.o	10	0.20	5	5	0	0	0	-34717.55	8.69	0.0000	0.00	0.00	3.781	4.905	0.000
7	min_07.o	7	0.18	3	4	0	0	0	-35143.76	7.54	0.0000	0.00	0.00	2.604	4.939	0.000
8	min_08.o	12	0.15	5	7	0	0	0	-36391.54	8.46	0.0000	0.00	0.00	3.463	4.998	0.000
9	min_09.o	11	0.21	4	6	1	0	0	-35732.43	9.09	0.0000	0.00	0.00	4.281	4.807	0.000
10	min_10.o	13	0.26	6	6	1	0	0	-37265.00	9.58	0.0000	0.00	0.00	4.701	4.880	0.000
11	min_11.o	8	0.20	4	3	1	0	0	-36508.74	8.33	0.0000	0.00	0.00	3.253	5.076	0.000
12	min_12.o	14	0.24	9	4	1	0	0	-39125.12	9.17	0.0000	0.00	0.00	4.322	4.847	0.000
13	min_13.o	10	0.18	3	7	0	0	0	-45107.44	9.07	0.0000	0.00	0.00	4.196	4.875	0.000
14	min_14.o	11	0.14	3	8	0	0	0	-35466.97	8.54	0.0000	0.00	0.00	3.727	4.817	0.000
15	min_15.o	13	0.22	7	4	2	0	0	-40011.07	9.91	0.0000	0.00	0.00	5.031	4.878	0.000

Apéndice

16	min_16.o	10	0.22	5	4	1	0	0	-37892.32	9.47	0.0000	0.00	0.00	4.608	4.862	0.000
17	min_17.o	9	0.20	3	5	1	0	0	-34844.29	8.76	0.0000	0.00	0.00	3.962	4.797	0.000
18	min_18.o	9	0.29	1	6	2	0	0	-38675.30	10.84	0.0000	0.00	0.00	6.053	4.792	0.000
19	min_19.o	13	0.41	6	5	1	0	1	-38722.88	12.44	0.0000	0.00	0.00	7.562	4.875	0.000
20	min_20.o	10	0.41	4	5	0	0	1	-37348.14	11.20	0.0000	0.00	0.00	6.245	4.959	0.000

Averages: -37607.27 9.30 0.0000 0.00 0.00 4.415 4.882 0.000

ENERGY TERMS:

#	Filename	Bond	Angle	DihedVDW	EEL	HBOND	1-4VDW	1-4EEL	
1	min_01.o	2857.3	65.3	271.6	6517.7	-48965.3	0.0	87.7	1365.8
2	min_02.o	2744.9	61.4	285.3	6291.7	-47307.2	0.0	88.8	1378.2
3	min_03.o	2838.3	67.5	277.2	6502.6	-48800.5	0.0	88.6	1350.8
4	min_04.o	2684.4	63.0	283.5	6152.6	-46247.9	0.0	88.5	1392.7
5	min_05.o	3181.5	75.7	281.7	7403.0	-54061.5	0.0	88.0	1354.6
6	min_06.o	2630.9	69.0	280.5	6142.3	-45297.9	0.0	84.9	1372.8
7	min_07.o	2680.7	67.5	274.9	6250.7	-45862.9	0.0	87.3	1358.1
8	min_08.o	2749.1	66.4	294.7	6333.0	-47301.6	0.0	88.9	1378.0
9	min_09.o	2706.1	70.8	272.5	6243.3	-46469.5	0.0	87.7	1356.8
10	min_10.o	2819.4	68.1	274.0	6497.5	-48391.6	0.0	89.0	1378.4
11	min_11.o	2765.6	75.6	272.5	6363.1	-47429.9	0.0	87.0	1357.4
12	min_12.o	2975.2	70.0	276.8	6906.3	-50815.4	0.0	87.8	1374.3
13	min_13.o	3425.6	67.4	283.2	7926.8	-58267.3	0.0	89.6	1367.2
14	min_14.o	2682.9	67.7	277.2	6269.3	-46231.6	0.0	90.6	1376.9
15	min_15.o	3058.8	66.7	279.2	7096.8	-51970.4	0.0	88.5	1369.4
16	min_16.o	2886.7	70.4	284.3	6797.9	-49388.5	0.0	88.8	1368.2
17	min_17.o	2629.3	65.8	273.2	6069.4	-45341.5	0.0	89.6	1369.9
18	min_18.o	2929.6	66.2	275.2	6685.2	-50096.5	0.0	87.7	1377.4
19	min_19.o	2903.2	69.9	290.9	6635.6	-50065.4	0.0	86.6	1356.3
20	min_20.o	2838.5	68.1	281.2	6627.2	-48611.7	0.0	87.9	1360.7

Averages: 2849.4 68.1 279.5 6585.6 -48846.2 0.0 88.2 1368.2

ANGLES:

#	Filename	viomax<5	10	20	5-20	10->20	15->20
1	min_01.o	25	138.50	0	0	0	25
2	min_02.o	23	139.59	0	0	0	23
3	min_03.o	22	138.03	0	0	0	22
4	min_04.o	24	138.41	0	0	0	24
5	min_05.o	23	139.92	0	0	0	23
6	min_06.o	23	139.21	0	0	0	23
7	min_07.o	24	138.36	0	0	0	24
8	min_08.o	24	139.44	0	0	0	24
9	min_09.o	24	138.71	0	0	0	24
10	min_10.o	25	139.01	0	0	0	25
11	min_11.o	25	138.88	0	0	0	25
12	min_12.o	24	138.63	0	0	0	24
13	min_13.o	24	139.70	0	0	0	24
14	min_14.o	23	138.57	0	0	0	23
15	min_15.o	23	139.73	0	0	0	23
16	min_16.o	23	139.96	0	0	0	23
17	min_17.o	22	139.31	0	0	0	22
18	min_18.o	23	139.84	0	0	0	23
19	min_19.o	23	139.60	0	0	0	23
20	min_20.o	25	138.78	0	0	0	25

OMEGAS:

#	Filename	viomax<5	10	20	5-20	10->20	15->20
1	min_01.o	0	0.00	0	0	0	0
2	min_02.o	0	0.00	0	0	0	0
3	min_03.o	0	0.00	0	0	0	0
4	min_04.o	0	0.00	0	0	0	0
5	min_05.o	0	0.00	0	0	0	0
6	min_06.o	0	0.00	0	0	0	0
7	min_07.o	0	0.00	0	0	0	0
8	min_08.o	0	0.00	0	0	0	0
9	min_09.o	0	0.00	0	0	0	0
10	min_10.o	0	0.00	0	0	0	0
11	min_11.o	0	0.00	0	0	0	0
12	min_12.o	0	0.00	0	0	0	0
13	min_13.o	0	0.00	0	0	0	0
14	min_14.o	0	0.00	0	0	0	0
15	min_15.o	0	0.00	0	0	0	0
16	min_16.o	0	0.00	0	0	0	0
17	min_17.o	0	0.00	0	0	0	0
18	min_18.o	0	0.00	0	0	0	0
19	min_19.o	0	0.00	0	0	0	0
20	min_20.o	0	0.00	0	0	0	0

Apéndice

Distance and angle violations:

First atom	Last atom	target	Key: . = 0.0 - <= 0.1 + <= 0.2 * <= 0.5 0 <= 1.0 8 <= 2.0 @ > 2.0	Stats: Ave <std> min/max/#
CA	SER	2 -- C	SER 2 :	55.00 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.@ 108.00 < 12.90> 91.82 / 137.97 13
CA	CYX	4 -- C	CYX 4 :	185.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@ 105.32 < 13.62> 84.71 / 126.70 20
CA	MET	5 -- C	MET 5 :	55.00 : @.@.@.@.@.@.@.@.@.@ 87.52 < 4.01> 82.78 / 93.92 12
CA	LYS	6 -- C	LYS 6 :	185.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@ 131.25 < 3.50> 124.94 / 139.73 20
CA	GLU	7 -- C	GLU 7 :	185.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@ 132.53 < 5.01> 117.75 / 139.44 20
CA	TYR	8 -- C	TYR 8 :	185.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@ 127.16 < 4.46> 118.48 / 133.76 20
CA	CYX	9 -- C	CYX 9 :	105.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@ 134.40 < 5.11> 118.27 / 139.06 20
CA	ALA	10 -- C	ALA 10 :	105.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@ 130.44 < 5.59> 119.39 / 138.62 20
CA	GLN	12 -- C	GLN 12 :	185.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@ 127.52 < 8.52> 106.27 / 138.03 20
CA	CYX	13 -- C	CYX 13 :	55.00 : @.@@@@@@@@@@@@@@@@@ 96.88 < 6.92> 86.40 / 112.60 19
CA	ARG	14 -- C	ARG 14 :	55.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@ 104.06 < 13.83> 83.47 / 136.53 20
CA	LYS	16 -- C	LYS 16 :	105.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@ 134.08 < 4.26> 125.54 / 139.92 20
CA	VAL	17 -- C	VAL 17 :	105.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@ 137.01 < 2.40> 131.52 / 139.70 20
CA	SER	18 -- C	SER 18 :	185.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@ 128.61 < 3.32> 124.70 / 138.88 20
CA	GLN	19 -- C	GLN 19 :	185.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@ 134.48 < 4.92> 116.07 / 139.84 20
CA	ASP	20 -- C	ASP 20 :	185.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@ 135.80 < 2.76> 129.39 / 139.77 20
CA	TYR	21 -- C	TYR 21 :	185.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@ 135.44 < 2.66> 128.83 / 139.32 20
CA	CYX	22 -- C	CYX 22 :	105.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@ 135.44 < 2.99> 129.66 / 139.96 20
CA	LEU	23 -- C	LEU 23 :	105.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@ 118.51 < 10.17> 102.63 / 135.95 20
CA	LYS	24 -- C	LYS 24 :	105.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@ 131.09 < 6.52> 118.80 / 139.39 20
CA	HIE	25 -- C	HIE 25 :	105.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@ 106.19 < 4.25> 97.30 / 115.17 20
CA	CYX	26 -- C	CYX 26 :	105.00 : @@@@.@@@@@@.@...@ 93.07 < 5.78> 85.14 / 107.69 14
CA	LYS	27 -- C	LYS 27 :	55.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@ 103.69 < 6.42> 88.04 / 112.72 20
CA	CYX	28 -- C	CYX 28 :	55.00 : @@@@@@@@@@@@@@@@@@ 101.86 < 4.88> 90.70 / 110.28 20
CB	VAL	17 -- H	TYR 21 :	4.94 : +.+++..+++++..++++ 0.13 < 0.03> 0.08 / 0.18 15
H	LYS	16 -- CB	VAL 17 :	5.39 :*..... 0.20 < 0.00> 0.20 / 0.20 1
H	GLY	3 -- HG	LEU 23 :	5.50 :- 0.07 < 0.00> 0.07 / 0.07 1
HA3	GLY	3 -- *HD23	LEU 23 :	5.81 :+..... 0.11 < 0.03> 0.09 / 0.13 2
HA2	GLY	3 -- H	CYX 26 :	5.50 :-..... 0.08 < 0.02> 0.07 / 0.09 2
H	CYX	4 -- H	MET 5 :	3.10 :+..... 0.12 < 0.00> 0.12 / 0.12 1
HB3	CYX	4 -- H	CYX 26 :	5.50 : +.-..+.-+..... 0.12 < 0.02> 0.10 / 0.14 6
HB2	CYX	4 -- *HB3	CYX 26 :	3.94 :+..... 0.12 < 0.00> 0.12 / 0.12 1
H	CYX	4 -- *HB3	CYX 26 :	5.99 :-..... 0.08 < 0.00> 0.08 / 0.08 1
HB2	CYX	4 -- H	LYS 27 :	5.50 :-..... 0.09 < 0.02> 0.08 / 0.10 2
H	MET	5 -- HG3	MET 5 :	4.40 :+..... 0.18 < 0.00> 0.18 / 0.18 1
H	MET	5 -- HG2	MET 5 :	4.40 : +.+. 0.11 < 0.01> 0.10 / 0.12 2
H	MET	5 -- H	GLU 7 :	5.50 : -.-..... 0.07 < 0.00> 0.07 / 0.07 3
H	MET	5 -- HB2	TYR 8 :	5.16 :-..... 0.10 < 0.00> 0.10 / 0.10 1
HA	MET	5 -- *HD13	LEU 23 :	5.96 :-..... 0.09 < 0.00> 0.09 / 0.09 1
*HB3	GLU	7 -- *HD2	TYR 8 :	6.73 : .-...+.-+.-+ 0.10 < 0.04> 0.07 / 0.19 9
HA	GLU	7 -- H	ALA 10 :	3.66 :-..... 0.09 < 0.00> 0.09 / 0.09 1
*HD2	TYR	8 -- HG3	GLN 12 :	5.35 : +..... 0.10 < 0.00> 0.10 / 0.10 1
*HD2	TYR	8 -- *HB3	CYX 26 :	6.73 : .-...+..... 0.08 < 0.00> 0.08 / 0.08 1
HA	GLN	12 -- *HG3	GLN 12 :	3.49 : *...*..... 0.24 < 0.01> 0.23 / 0.25 2
*HG3	GLN	12 -- H	CYX 13 :	4.75 :++..+.-+.-+ 0.11 < 0.03> 0.07 / 0.14 6
HB3	CYX	13 -- HB3	SER 18 :	4.25 : -.....+..... 0.09 < 0.02> 0.07 / 0.10 2
HB3	CYX	13 -- HB2	SER 18 :	4.25 :+..... 0.13 < 0.00> 0.13 / 0.13 1
H	ARG	14 -- HG2	ARG 14 :	4.53 :+..... 0.12 < 0.00> 0.12 / 0.12 1
H	ARG	14 -- *HB3	ARG 14 :	3.59 : ...+..... 0.12 < 0.00> 0.12 / 0.12 1
*HB3	ARG	14 -- H	GLN 19 :	6.17 : **+++++*+.-+***- 0.19 < 0.06> 0.10 / 0.28 19
HA	ARG	14 -- H	GLN 19 :	4.39 :-.....+..... 0.12 < 0.06> 0.07 / 0.18 3
H	LYS	16 -- HB3	LYS 16 :	3.56 :+..... 0.14 < 0.00> 0.14 / 0.14 1
*HG23	VAL	17 -- H	GLN 19 :	6.61 :+.-+.-+... 0.10 < 0.02> 0.07 / 0.12 9
H	VAL	17 -- H	GLN 19 :	4.19 :+..... 0.11 < 0.02> 0.10 / 0.12 2
H	SER	18 -- HB3	SER 18 :	3.30 : +.+++..+..+...+... 0.15 < 0.03> 0.10 / 0.19 13
HA	SER	18 -- *HG13	ILE 29 :	4.64 : .+.....-..... 0.10 < 0.03> 0.07 / 0.15 7
H	GLN	19 -- HE21	GLN 19 :	5.50 : .+.-.-.-+.-+.-+ 0.10 < 0.02> 0.07 / 0.14 13
HB3	GLN	19 -- H	ASP 20 :	3.85 : ..+..... 0.14 < 0.00> 0.14 / 0.14 1
HB2	ASP	20 -- H	LEU 23 :	5.50 : ..+..... 0.11 < 0.04> 0.07 / 0.14 2
*HD2	TYR	21 -- HB3	HIE 25 :	4.59 :+.....+..... 0.10 < 0.03> 0.07 / 0.13 3
*HD2	TYR	21 -- *HD3	LYS 27 :	6.79 :+.....+..... 0.11 < 0.04> 0.08 / 0.15 3
*HD2	TYR	21 -- *HB3	LYS 27 :	5.69 :-.....+..... 0.10 < 0.01> 0.09 / 0.10 3
*HD2	TYR	21 -- *HG3	LYS 27 :	6.25 : -..... 0.07 < 0.00> 0.07 / 0.07 1
*HD2	TYR	21 -- *HG23	ILE 29 :	6.04 :+..... 0.10 < 0.03> 0.07 / 0.12 2
H	CYX	22 -- HB2	LEU 23 :	4.26 : --+.-+.....-+... 0.10 < 0.02> 0.07 / 0.13 12
H	CYX	22 -- *HD23	LEU 23 :	6.61 :+.-..... 0.11 < 0.03> 0.09 / 0.14 3
HA	CYX	22 -- H	CYX 26 :	3.01 : -..... 0.08 < 0.00> 0.08 / 0.08 1
H	CYX	22 -- *HG23	ILE 29 :	6.61 :-..... 0.09 < 0.01> 0.08 / 0.10 5
H	CYX	22 -- *HD13	ILE 29 :	6.61 :-..... 0.08 < 0.00> 0.08 / 0.08 1
HB3	LEU	23 -- H	HIE 25 :	5.50 : --.-.-+.....+.....+ 0.11 < 0.02> 0.08 / 0.16 12
*HG3	LYS	24 -- HD2	HIE 25 :	4.78 : +.....-+.....+..... 0.10 < 0.02> 0.07 / 0.13 9
*HG3	LYS	24 -- H	HIE 25 :	4.80 :-..... 0.09 < 0.00> 0.09 / 0.09 1
H	LYS	27 -- *HD3	LYS 27 :	4.85 :-.....+..... 0.09 < 0.02> 0.08 / 0.12 3
HB3	LYS	27 -- H	CYX 28 :	3.74 :+..... 0.11 < 0.04> 0.07 / 0.17 4
HB2	LYS	27 -- H	CYX 28 :	3.74 : ..+..... 0.10 < 0.00> 0.10 / 0.10 1
HB3	CYX	28 -- H	ILE 29 :	3.34 : +.....+.....+.-+.-+ 0.11 < 0.02> 0.07 / 0.14 8
HA	PRO	30 -- H	ARG 31 :	3.03 :*** 0.41 < 0.00> 0.41 / 0.41 2
H	ARG	31 -- *HG3	ARG 31 :	4.13 :*+*... 0.23 < 0.05> 0.20 / 0.29 3