



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

**“Caracterización estructural mediante RMN, de la toxina OspTx2b  
proveniente de la anémona *Oulactis* sp.”**

## **TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

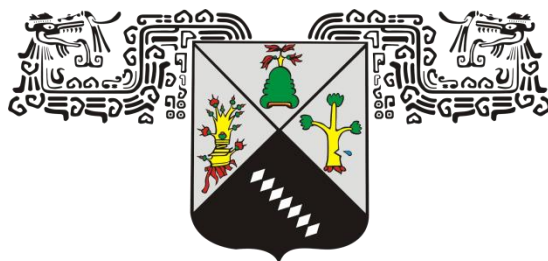
**M. en C. Jessica Nayeli Villegas Moreno**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dr. Carlos Amero Tello**

CUERNAVACA, MORELOS.

DICIEMBRE, 2018.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

**“Caracterización estructural mediante RMN, de la toxina OspTx2b  
proveniente de la anémona *Oulactis* sp.”**

## **TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

**M. en C. Jessica Nayeli Villegas Moreno**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dr. Carlos Amero Tello**

CUERNAVACA, MORELOS.

DICIEMBRE, 2018.

## LISTA DE JURADO

Presidente: Dra. Laura Álvarez Berber, CIQ-UAEM.

Secretario: Dr. Ismael León Rivera, CIQ-UAEM.

Vocal 1: Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal, CEIB-UAEM.

Vocal 2: Dr. Alexis J. Rodríguez Solís, CEIB-UAEM.

Vocal 3: Dra. Judith Sánchez Rodríguez, ICMYL-UNAM (externa).

Suplente: Dra. Claudia Rodríguez Almazán, IBT-UNAM (externa).

Suplente: Dr. Carlos Amero Tello, CIQ-UAEM (asesor).

## PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS

- ✓ Synthesis, folding, structure and activity of a predicted peptide from the sea anemone *Oulactis* sp. with an ShKT fold. *Toxicon* 150 (2018) 50–59. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.05.006
- ✓ Identification, chemical synthesis, structure and function of a new KV1 channel blocking peptide from *Oulactis* sp. *Peptide Science*. (2018) 1-10. DOI: 10.1002/pep2.24073

## RESUMEN

Las toxinas extraídas de animales terrestres como escorpiones, serpientes, arañas y anfibios, así como las aisladas de animales marinos, tales como medusas, anémonas, serpientes de mar, peces, conus, etc. han sido estudiadas con mayor interés en los últimos años, debido a la gran variedad de proteínas y péptidos que contienen, que han mostrado un efecto potente en diversos sistemas<sup>1</sup>.

En el presente trabajo se describen las características específicas de las toxinas de anémonas, así como su clasificación principal: neurotoxinas y citolisinas. Por ser OspTx2b y BcsTx1 neurotoxinas, se reduda más sobre la función de las neurotoxinas en canales de Potasio. Algunas neurotoxinas provenientes de anémonas han mostrado tener efectos en canales de Potasio Kv1.3. Estos canales están asociados a la proliferación de células T, que pueden desencadenar enfermedades autoinmunes tales como: psoriasis y esclerosis múltiple.

En la metodología, se describen las toxinas con las que se trabajaron: OspTx2b proveniente de la anémona *Oulactis* sp., una especie endémica de las costas de Australia y BcsTx1 procedente de anémona *Bunodosoma caissarum*, endémica de Brasil. Se puntualiza el procedimiento para la producción de BcsTx1 de forma recombinante y para OspTx2b de forma sintética, así como el procedimiento de la purificación de cada una, para llegar a la obtención de la muestra adecuada para continuar con los estudios de RMN.

Algunos resultados, como en el caso de BcsTx1, no fueron favorables a pesar de realizar cambios en diversos parámetros, para la optimización de la producción del péptido recombinante. Por el caso contrario, no se observaron mayores problemas al trabajar con OspTx2b. Sin embargo, inesperadamente OspTx2b no mostró tener actividad en canales de Potasio como sus homólogas ShK y BgK, pero este estudio revela que además de ciertos aminoácidos, la disposición espacial de los residuos es importante para la unión de la toxina y el canal.

En este trabajo, se determinó la estructura tridimensional de OspTx2b por RMN. Mientras que para la toxina BcsTx1 de la anémona *Bunodosoma caissarum*, que tiene un 54% de identidad con OspTx2b, por lo que, teóricamente la estructura sería similar, no se pudo determinar la estructura tridimensional.

## ABSTRACT

Peptide toxins from scorpions, snakes, spiders and amphibious, as well as, marine animals like jellyfish, sea anemones, sea snake, fishes and conus have come into increasing use in studies of the various ion-channels controlling membrane excitability and secretion, and have proved the means by which some of the active proteins have been purified and analyzed the last years.

Methodology section describes toxins that we studied OspTx2b and BcsTx1 from different sea anemone. *Oulactis sp.* is an endemic sea anemone from Australia. In a transcriptomic study on *Oulactis sp.*, was identified a 36-residue peptide, OspTx2b, containing a ShK/BgK-like cysteine framework, with high sequence similarity to BgK. OspTx2b was obtained by chemical synthesis. BcsTx1 is a toxin that belongs to *Bunodosoma caissarum* an endemic sea anemone from Brazil, BcsTx1 obtained by recombinant technique. Additionally, this section shows procedures to obtain the NMR sample to structural studies.

Results chapter shows the solution structure of OspTx2b. OspTx2b structure was determined using nuclear magnetic resonance spectroscopy. OspTx2b possesses a BgK-like scaffold with the same disulfide bond connectivity. However, OspTx2b doesn't have activity against the  $K_v$  channels assessed in this study implies that the ShK/BgK scaffold is capable of supporting functional activity beyond potassium channel blockade, also OspTx2b showed no growth inhibitory activity against several strains of bacteria and fungi. On other hands, BcsTx1 was produce by expression system. Unfortunately, the expression was very inconsistent, although, we tried different host, vector, temperature, media concentration and expression time to optimized expression. NMR results showed that BcsTx1 could be random coil and electrophysiology results did not show strong activity against the K channel compare to native toxin.

Elucidation of chemical structures is imperative of mechanisms of actions but also for designing proper countermeasures such as detection, determination and therapeutic methods. In summary, we determinate OspTx2b tridimensional structure by NMR spectroscopy. We cannot obtain BcsTx1 structure, due to recombinant peptide obtained exhibit random coil behavior. However, BcsTx1 has 54% sequence identity to OspTx2b; therefore, BcsTx1 structure could be similar to OspTx2b.

## AGRADECIMIENTOS

**Agradezco al Universo, por darme la oportunidad de estar aquí y ahora.**

A **CONACyT** por la beca otorgada con número de becario: **211286**.

Al **Dr. Carlos Amero Tello**, por darme la oportunidad de aprender y trabajar con él, además de aceptar adentrarse en el mundo de las anémonas, por sus comentarios, sugerencias y ayuda a lo largo de este camino.

A los miembros del Comité Tutorial: **Dra. Laura Álvarez Berber**, **Dr. Ismael León Rivera** y **Dra. Claudia Rodríguez Almazán** por sus comentarios y ayuda a lo largo de este proyecto. Así como a los miembros del jurado **Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal**, **Dr. Alexis J. Rodríguez Solís** por sus apreciables comentarios y a la **Dra. Judith Sánchez Rodríguez** por instruirme en el mundo marino desde hace algunos ayeres.

A los mejores amigos que pude encontrar: **Ángel, Hugo** y **Chucho**, los quiero ♥. A los amigos que encontré a lo largo de mi estancia en Cuernavaca: **Eve, Arline, Félix, Mali, Nichim, Erick, Víctor, Daniel, Liz, Melchor, Junior, Miguel Ángel, Dominic, Michel, Deby**, guardo recuerdos de cada uno de ustedes.

Agradezco infinitamente al **Dr. Ray Norton**, por ser mi inspiración y por ser una persona admirable, por aceptarme en su laboratorio y compartir conmigo de su tiempo para enseñarme RMN, por aquella comida un 25 de diciembre en compañía de su familia.

Doy gracias a las personas que hicieron que aprendiera y disfrutara Australia: mis mentores **Dr. Rodrigo Morales, Dr. Krishna**, mis amigas de laboratorio: **Michaela, Maiada, Eleonor**; mis amigas de plática: **Mansura y Sunanda**♥, mis amigos, los latinos: **Karla, Carlos, Sofy, Ruty**. Mis roomies: **Miguel** y **Oy**. A todos: los extraño.

A los administradores **Cristy, Vero, Mayumi** y **Nicky Penny** (Australia) que me ayudaron en todo momento en los trámites administrativos.

A mis amigos de toda la vida: **Mariana** y **Luis Fer** (seguro estarían felices), **Tania, Lau, Caro, Esme, Clau, Alex, Fany**.

A los **Moreno**, que siempre han creído en mí.

## DEDICATORIA

A **Carmelita, Bet** y **Sergio**, por apoyarme y estar cerca de mí pese a la lejanía, por tener siempre una palabra de aliento cuando la necesito, por creer en mí y por su amor infinito♥.

*“LA CLAVE DEL ÉXITO CONSTA DE TRES COSAS:  
EL TRABAJO DURO, SIEMPRE QUERER  
APRENDER Y COLABORAR CON OTRAS  
PERSONAS”.*

*Dr. Ray Norton (2017).*



ÍNDICE GENERAL

LISTA DE JURADO.....	3
PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS .....	3
RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	5
AGRADECIMIENTOS.....	6
DEDICATORIA.....	7
ÍNDICE GENERAL .....	10
ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y CROMATOGRAMAS.....	13
SIMBOLOGÍA .....	16
1. INTRODUCCIÓN .....	18
Clase Anthozoa .....	20
Orden Actiniaria.....	21
2. ANTECEDENTES .....	23
2.1 Toxinas de anémonas .....	23
2.2 Citolosinas y neurotoxinas .....	25
2.2.1 Citolisinas.....	25
2.2.2 Neurotoxinas .....	27
2.3 Canales de potasio .....	28
2.3.1 Canal de potasio Kv1.3 y su relación con células T .....	30
2.4 Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de Proteínas .....	31
2.4.1 Experimentos de RMN bidimensional para la determinación de estructura .....	37
2.4.2 Proceso de asignación .....	40
2.4.3 Cálculos estructurales mediante CYANA .....	41
2.4.4 Afinamiento de estructura.....	42
2.4.5 Validación de estructura .....	43
2.4.6 Estudio de neurotoxinas por RMN.....	43
2.5 Toxina OspTx2b proveniente de la anémona <i>Oulactis sp.</i> .....	46
2.6 Toxina BcsTx1 proveniente de anémona la <i>Bunodosoma caissarum</i> .....	47
3. OBJETIVO GENERAL .....	50
Objetivos Particulares .....	50

4.	HIPÓTESIS .....	51
5.	JUSTIFICACIÓN .....	52
6.	METODOLOGÍA.....	53
6.1	Producción del péptido OspTx2b .....	54
6.1.1	Síntesis de los péptidos OspTx2b y OspTx2a.....	54
6.1.2	Espectrometría de masas del péptido OspTx2b .....	55
6.1.3	Experimentos de RMN del péptido OspTx2b .....	57
6.1.4	Cálculo de estructura del péptido OspTx2b .....	58
6.2	Producción de péptido rBcsTx1 .....	60
6.2.1	Expresión del plásmido pET32a-BcsTx1.....	61
6.2.1.1	Rompimiento de pared celular del plásmido pET32a-BcsTx1 .....	61
6.2.2	Purificación de la proteína de fusión Trx-r-BcsTx1 .....	62
6.2.3	Cuantificación por espectrometría UV .....	62
6.2.4	Corte con enteroquinasa de la proteína de fusión Trx-r-BcsTx1 .....	62
6.2.5	Gel de acrilamida SDS-PAGE 15 y 18% .....	63
6.2.6	Inoculación de medio mínimo M9 del péptido r-BcsTx1 .....	63
6.2.7	Experimentos de RMN del péptido r-BcsTx1 .....	63
6.2.8	Pruebas en canales iónicos de potasio del péptido r-BcsTx1 .....	63
7.	RESULTADOS .....	64
7.1	Resultados del péptido OspTx2b .....	64
7.1.1	Espectrometría de masas del péptido OspTx2b .....	64
7.1.2	Resultados de RMN del péptido OspTx2b .....	66
7.1.3	Calculo de estructura del péptido OspTx2b .....	73
7.2	Resultados del péptido r-BcsTx1 .....	75
7.2.1	Plásmido pGS- 21a- BcsTx1 .....	76
7.2.2	Optimización de crecimiento y expresión del plásmido r-BcsTx1 .....	77
7.2.3	Plásmido pET-32a-BcsTx1 .....	78
7.2.4	Cinética de expresión en BL21 del plásmido pET-32a-BcsTx1 .....	79
7.2.5	Cinética de expresión en Rosetta del plásmido pET-32a-BcsTx1 .....	80
7.2.6	Purificación por afinidad en BL21 de la proteína de fusión Trx-r-BcsTx1 .....	81
7.2.7	Exclusión molecular en BL21 de la proteína de fusión Trx-r-BcsTx1 .....	83

7.2.8 Intercambio aniónico en BL21 de la proteína de fusión Trx-r-BcsTx1 .....	83
7.2.9 Purificación de Rosetta de la proteína de fusión Trx-r-BcsTx1 .....	85
7.2.10 Corte con enteroquinasa de la proteína de fusión Trx-r-BcsTx1 .....	86
7.2.11 Purificación del recombinante BcsTx1 .....	87
7.2.12 Obtención del recombinante BcsTx1 .....	88
7.2.13 Espectrometría de masas del recombinante BcsTx1 .....	88
7.2.14 Resultados de RMN del recombinante BcsTx1 .....	89
7.2.15 Respuesta en canales de potasio del recombinante BcsTx1 .....	90
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	92
9. CONCLUSIONES.....	101
10. PERSPECTIVAS .....	102
11. BIBLIOGRAFÍA .....	103
ANEXO 1 SUSTANCIAS.....	111
ANEXO 2 GELES SDS- PAGE AL 15% (3 kDa- 100 kDa).....	115
ANEXO 3 CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES.....	117
ANEXO 4 TRANSFORMACIÓN .....	118
PUBLICACIONES.....	119
TRABAJOS EN CONFERENCIAS .....	119

**ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y CROMATOGRAMAS**

Fig. 1 Ejemplos de Cnidarios: medusa, pólipos y anémonas..... 18

Fig. 2 Esquema del general de un cnidocistos ..... 19

Fig. 3 Diferentes tipos de nematocistos ..... 20

Fig. 4 Fisiología de una anémona..... 21

Tabla 1 Tipos de toxinas, encontradas en anémonas. .... 24

Fig. 5 Propuesta de mecanismo de formación de poros por actinoporinas<sup>29</sup> ..... 26

Fig. 6 Canal de potasio de KcsA..... 30

Fig. 7 Desplazamientos químicos ..... 34

Tabla 2 Valores teóricos de 3 JHN-αH en estructuras secundarias típicas. .... 35

Fig. 8 Estructura secundaria de una proteína. .... 36

Tabla 3 Principales experimentos de RMN en 2D..... 36

Fig.9 Espectro de COSY de una proteína..... 37

Fig. 10 Espectro TOCSY de una proteína..... 38

Fig. 11 Espectro NOESY (rojo) traslapado con TOCSY (azul) de una proteína..... 39

Fig. 12 Alineamiento de secuencias de la toxinas ShK (*Stichodactyla helianthus*) y BgK  
(*Bunodosoma granulifera*)..... 44

Fig. 13 Estructura tridimensional determinada por RMN de la neurotoxina ShK ..... 45

Fig. 14 Estructura tridimensional determinada por RMN de la neurotoxina BgK ..... 45

Fig. 15 Alineación de secuencias de OspTx2b con secuencias que han demostrado tener  
interacción con canales de potasio, como ShK, BgK y BcsTx1..... 46

Fig.16 Anémona *Oulactis* sp. .... 47

Tabla 4 Taxonomía de *Oulactis* sp. .... 47

Tabla 5 Taxonomía de *Bunodosoma caissarum* ..... 48

Fig.17 Anémona *Bunodosoma caissarum* ..... 48

Fig. 18 Diagrama de flujo de metodología, modificado de Vetter (2015)<sup>82</sup>..... 53

Fig. 19 Esquema de síntesis química en fase sólida de péptidos de OspTx2b. .... 56

Tabla 6 Características de las diferentes cepas utilizadas para la producción de r-BcsTx1. . 61

Cromatograma 1 de OspTx2b sintetizada químicamente. .... 64

Tabla 7 Fragmento de masa molecular esperadas y observadas de OspTx2b ..... 65

Fig. 20 Espectro de masas de OspTx2b. ....	65
Tabla 8 Parámetros de OspTx2b para RMN. ....	66
Fig. 21 Espectro de <sup>1</sup> H de OspTx2b (1mM) a 25°C, pH 5.9.....	66
Fig. 22 Espectro de RMN 1H de la titulación ácido-base de OspTx2b. ....	67
Fig. 23 Espectro de RMN 1H de la titulación ácido-base OspTx2b (región NH).....	67
Fig. 24 Espectro TOCSY (azul) y NOESY (rojo) de OspTx2b.....	69
Tabla 9. Desplazamientos Químicos de OspTx2b .....	70
Tabla 10 Desplazamientos Químicos de OspTx2b conformación minoritaria .....	71
Fig. 25 Espectro 2D NOESY de OspTx2b, región HN amida. ....	71
Fig. 26 Comparación de los valores del desplazamiento químicos en la región NH.....	72
Fig. 27 Comparación de los valores del desplazamiento químicos en la región Ha .....	73
Fig. 28 Veinte mejores estructuras basada en las menores energías de OspTx2b .....	74
Fig. 29 Estructura de OspTx2b en base a los experimentos de RMN. ....	74
Tabla 11. Características de la proteína de fusión pET-32a-BcsTx1 .....	75
Fig. 30 Cinética de expresión de pGS- 21a- BcsTx1 en Rosetta.....	76
Fig. 31 Secuencia de proteínas de fusión.....	77
Fig. 32 Diagrama de bloques proteína de fusión .....	77
Fig. 33 Prueba de purificación de las tres diferentes colonias de Trx-rBcsTx1.....	78
Fig. 34 Cinética de expresión de pET-32a-BcsTx1 en cepa BL21 a 25°C.....	79
Fig. 35 Cinética de expresión de pET-32a-BcsTx1 en cepa BL21 a 37°C.....	80
Fig. 36 Cinética de expresión de pET-32a-BcsTx1 en cepa Rosetta a 25°C.....	81
Fig. 37 Cinética de expresión de pET-32a-BcsTx1 en cepa Rosetta a 37°C .....	81
Cromatograma 2 Extracto crudo cepa BL21 inyectado a columna de afinidad.....	82
Fig. 38 Purificación por columna de afinidad de BL21.....	82
Cromatograma 3 Inyección de las fracciones 50,51 y 52 .....	83
Cromatograma 4 Cromatografía por Intercambio aniónico .....	84
Fig. 39 Gel SDS-PAGE 18% Fracciones de Intercambio Aniónico en BL21 .....	84
Cromatograma 5 Extracto crudo cepa Rosetta inyectado a columna de afinidad.....	85
Fig. 40 Purificación por columna de afinidad de Rosetta .....	86
Fig.41 Gel SDS-PAGE 15% Reacción de corte con Enteroquinasa. ....	87
Fig. 42 Gel SDS-PAGE 18% Purificación por afinidad de la proteína previamente cortada. .	88

Fig. 43 Gel SDS-PAGE 18% Purificación por afinidad de la proteína cortada .....	89
Fig. 44 Espectro de RMN 1H de r-BcsTx1sm .....	90
Fig. 45 Respuesta de r-BcsTx1sm en canales de potasio. ....	91
Fig. 46 Modelo de BcsTx1 obtenido por Swiss-Model .....	91
Fig. 47 Estructura tridimensional de OspTx2b .....	94
Fig. 48 Alineación de secuencias de toxinas bloqueadoras de canal Kv1.3 .....	95
Fig. 49 Representación de las estructuras.....	96
Fig. 50 Docking del complejo OspTx2b .....	98

**SIMBOLOGÍA**

M- Molar	ppm- partes por millón
k- kilo	J·s- Joules por segundo
m- mili	J- acoplamiento escalar
μ- micro	FPLC- Fast Performance Liquid Cromatography
n- nano	HPLC- High Performance Liquid Cromatography
Å- Ångström	pH- potencial de Hidrógeno
p- pico	U- unidad
rpm- revoluciones por minuto	SM- esfingomiolina
OD- Densidad óptica	Da- Dalton
OspTx- Toxina proveniente de <i>Oulactis</i> sp.	
Bgk- Toxina proveniente de <i>Bunodosoma granulifera</i>	
ShK- Toxina proveniente de <i>Sticholactila helianthus</i>	
BcsTx- Toxina proveniente de <i>Bunodosoma caissarum</i>	
<i>r-BcsTx1- recombinante de Bunodosoma caissarum</i>	
K <sub>v</sub> - Canal de potasio sensible al voltaje	
Na <sub>v</sub> - Canal de sodio sensible al voltaje	
Na <sup>+</sup> - ion sodio	
K <sup>+</sup> - ion potasio	
pI- punto Isoeléctrico	
RMN- Resonancia Magnética Nuclear	
I- Espín nuclear	
ħ- constante de Plank	
v <sub>L</sub> - frecuencia de Lamor	
w- frecuencia de Lamor	
B <sub>0</sub> - campo magnético	
Hz- Hertz	
MHz- MegaHertz	
T- Tesla	
δ- desplazamiento químico	

**Simbología de los aminoácidos**

A	Ala	Alanina
R	Arg	Arginina
N	Asn	Asparagina
D	Asp	Aspartato
C	Cys	Cisteína
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Ácido glutámico
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
L	Leu	Leucina
K	Lys	Lisina
M	Met	Metionina
F	Phe	Fenilalanina
P	Pro	Prolina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
W	Trp	Triptófano
Y	Tyr	Tirosina
V	Val	Valina



### 1. INTRODUCCIÓN

Los Cnidarios constituyen uno de los principales filos en el reino animal debido a la gran cantidad de organismos que lo integran. Está constituido por medusas, anémonas, corales e hidroides (Figura 1), que agrupa cinco clases: Hydrozoa, Scyphozoa, Cubozoa, Staurozoa y Anthozoa. Esta última clase constituye el 68% del total del filo. Los Cnidarios son organismos sencillos que tienen un enterocelo, es decir, una cavidad interna que se abre al exterior y está dotada de paredes que segregan los jugos digestivos. Son organismos que han ido evolucionando de una forma muy selectiva, con cerca de 600 millones de años de antigüedad<sup>1,2</sup>.



Fig. 1 Ejemplos de Cnidarios: medusa, pólipos y anémonas.  
<http://zoology2014peter.weebly.com/cnidaria.html>

Este filo, es considerado uno de los más venenosos puesto que de las 11,000 especies que lo conforman, aproximadamente el 70% de éstas causan daño al hombre por contacto directo o ingestión. Los cnidocistos son organelos microscópicos urticantes intracelulares, abundantes principalmente en los tentáculos y alrededor de la boca, cuya misión es la defensa y/o ataque contra sus depredadores y presas<sup>2</sup>. La presencia de estos cnidocistos, es el motivo por el cual este filo es uno de los más venenosos.

Existen cerca de 28 tipos de cnidocistos, divididos en tres categorías: espirocistos, ptycocistos y nematocistos. Los espirocistos se encuentran en la subclase Hexacorallia, la cual tiene la característica de tener un múltiplo de seis en cada cámara que integra la

cavidad gastrovascular. Los ptycocistos, se encuentran también en la subclase Hexacorallia, carecen de espinas y tiene una función adhesiva. Los nematocistos aparecen en todos los Anthozoarios<sup>3</sup>.

Los nematocistos están localizados a lo largo de la epidermis y se encuentran entre las células del epitelio muscular<sup>3</sup>. Los nematocistos están compuestos por una cápsula de colágeno que es secretada por el aparato de Golgi. Además, contiene una cápsula invaginada de doble pared, un opérculo que la cierra y un filamento enrollado en su interior que con frecuencia está erizado de espinas (Figura 2). Cuando el nematocisto es estimulado se produce la evaginación del filamento que se clava en la piel de la víctima o depredador e inyecta el líquido venenoso contenido en la cápsula<sup>1-4</sup>.

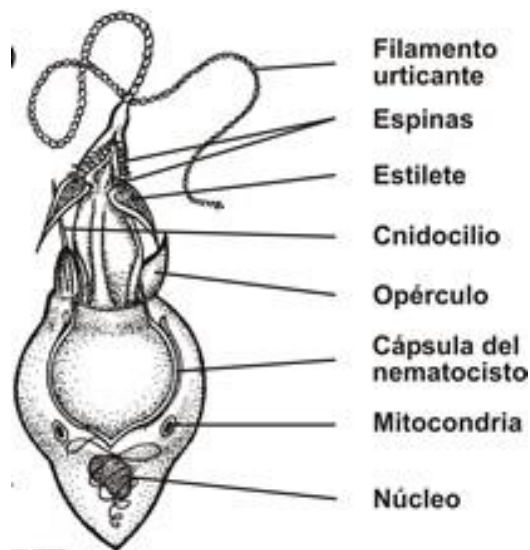


Fig. 2 Esquema del general de un cnidocistos  
<https://www.asturnatura.com/articulos/cnidarios/general.php>

Existen 28 tipos de nematocistos, cada uno de ellos tiene funciones, formas y estructuras diferentes para cada especie. En la siguiente Figura 3, se muestran diferentes tipos de nematocistos<sup>3</sup>.

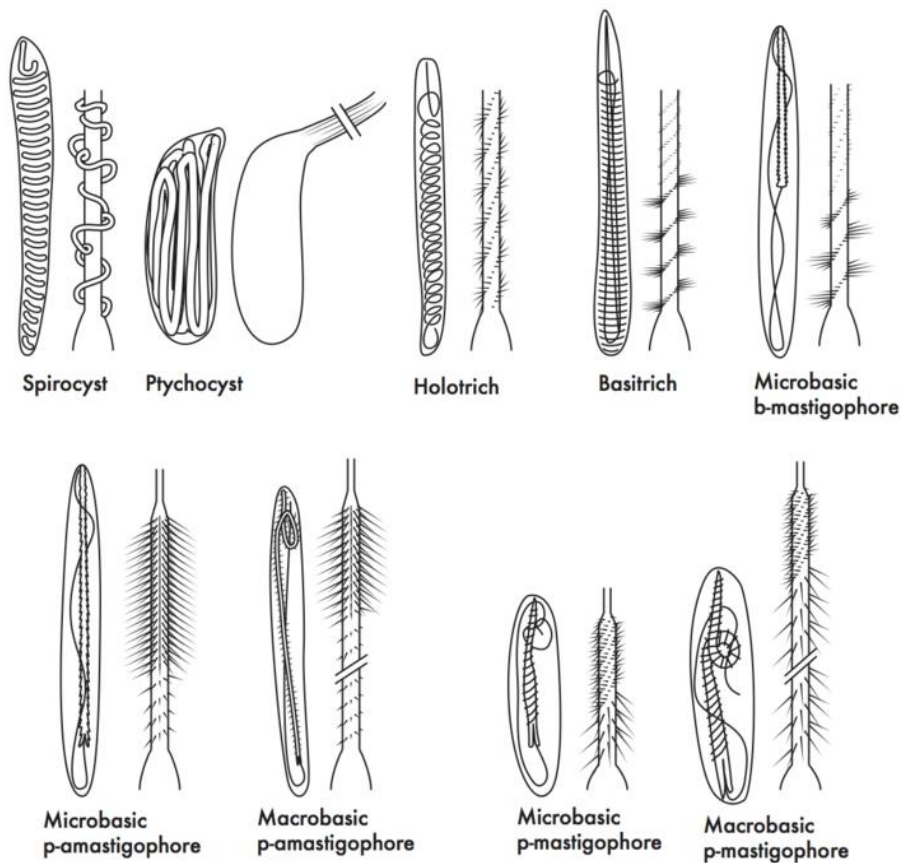


Fig. 3 Diferentes tipos de nematocistos  
<http://www.meghanrocktopus.com/blog-2/2016/10/10/portfolio-update>

*Clase Anthozoa*

En los Anthozoarios, encontramos a las anémonas, corales y las plumas de mar. En esta clase, los nematocistos son “el arma secreta”. Estos organelos diminutos les han permitido alcanzar un enorme éxito como depredadores, a pesar de ser organismos muy sencillos desde el punto de vista fisiológico<sup>1,4</sup>.

*Orden Actiniaria*

El orden Actiniaria, está compuesto sólo por anémonas, las cuales presentan simetría primaria birradial. Los Actinarios, están esencialmente compuestas de dos capas epiteliales y una cavidad interna gastrovascular o celenteron. Esta cavidad se abre por la boca. Las anémonas tienen un cuerpo cilíndrico y la cavidad oral está rodeada de tentáculos<sup>5</sup>. Son organismos sésiles, es decir, casi no se trasladan de lugar; viven en sustratos sólidos y se deslizan con el disco pedal o basal (Figura 4). Los largos tentáculos incorporan y eliminan sustancias del metabolismo que contienen venenos producidos por los nematocistos<sup>6</sup>. La mayoría de las anémonas miden entre 1.5 y 10 cm de longitud y de 1 a 5 cm de diámetro<sup>7,8</sup>.

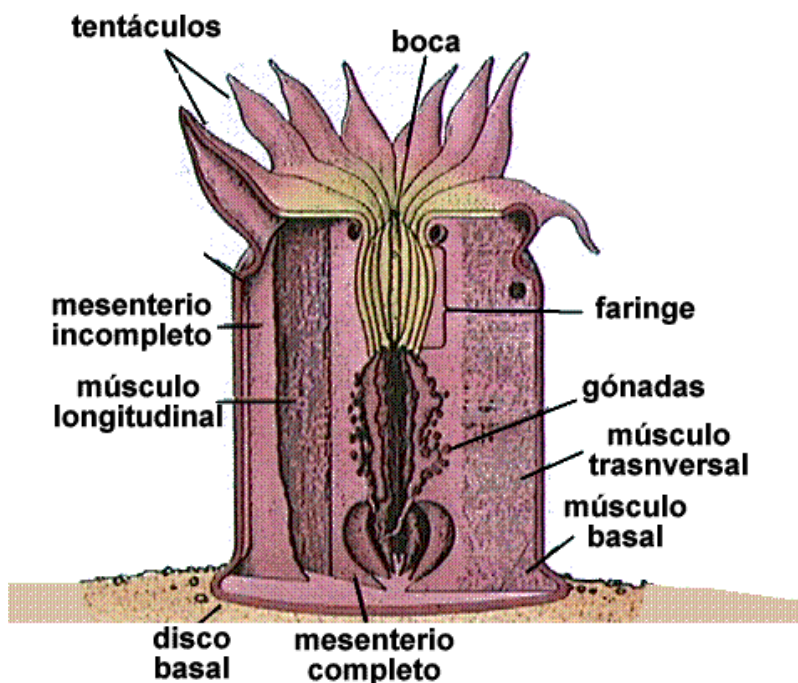


Fig. 4 Fisiología de una anémona.  
[http://www.biologia.edu.ar/animales/phylum\\_cnidarios.htm](http://www.biologia.edu.ar/animales/phylum_cnidarios.htm)

En los últimos años, la caracterización funcional y estructural de las toxinas de anémonas ha comenzada a obtener mayor interés por parte de la comunidad científica. En 1968, se purificó por primera vez la toxina de la anémona *Condylactis gigantea* y se observó

que esta toxina era capaz de incrementar el potencial de acción del nervio ventral de langosta<sup>5</sup>. Mientras que Béress, en 1975, aisló tres toxinas de *Anemonia sulcata* que fueron estudiadas en canales de sodio<sup>9</sup>. Sin embargo, fue hasta 1988 cuando se determinó la primera estructura tridimensional de una toxina activa en canales de sodio proveniente de *Anthopleura xanthogrammia* y en 1989, de la anémona *Anemonia sulcata*<sup>10-12</sup>.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Toxinas de anémonas

Las toxinas de anémonas son una mezcla compleja de componentes activos que van desde moléculas orgánicas sencillas hasta moléculas poliméricas como poliaminas, péptidos y proteínas<sup>13,14</sup>. Los compuestos bioactivos segregados por los nematocistos comprenden: citolisinas, neurotoxinas, hemolisinas, fosfolipasas, inhibidores de proteasas y metabolitos secundarios. Estas moléculas pueden tener propiedades biomédicas deseadas (por ejemplo: agentes para tratar el cáncer) o propiedades patológicas (cardiotoxicidad, dermatitis, parálisis, necrosis, etc.). A pesar del gran número de toxinas que han sido purificadas y caracterizadas, las toxinas de anémonas han sido poco estudiadas en comparación con las provenientes de otros animales terrestres (escorpiones o serpientes), y se sabe poco acerca de sus mecanismos de acción<sup>15</sup>.

En la Tabla 1 se muestran algunos tipos de toxinas encontrados en anémonas y algunos ejemplos de sus blancos.

Las anémonas representan una fuente potencial de compuestos farmacológicos, debido a que algunos compuestos activos actúan en canales sensibles al voltaje. La interferencia por toxinas de diferentes animales con canales de sodio ( $Na_v$ ) ha sido reportada ampliamente, sin embargo, existen pocos registros de la interacción de toxinas con canales de potasio ( $K_v$ )<sup>16</sup>.

## 2. ANTECEDENTES

Tabla 1 Tipos de toxinas, encontradas en anémonas.

CLASE	TOXINA	ESPECIE	BLANCO
<b>Neurotoxina bloqueadora de Canal Na<sup>+</sup></b>	ATX I (AsI)	<i>Anemonia sulcata</i>	Nav1
	Anthopleurin A (AP-A)	<i>Anthopleura xanthogrammica</i>	Nav1
	Anthopleurin B (AP-B)	<i>Anthopleura xanthogrammica</i>	Nav1
	CgNa	<i>Condylactis gigantea</i>	Nav1
	ShI	<i>Stichodactyla heliathus</i>	Nav1
	ATX III (As III)	<i>Anemonia sulcata</i>	Nav1
	APETx2	<i>Anthopleura elegantissima</i>	ASIC
<b>Neurotoxina bloqueadora Canal K<sup>+</sup></b>	ShK	<i>Stichodactyla heliathus</i>	K <sub>v</sub> 1, IKCa
	BgK	<i>Bunodosoma granulifera</i>	K <sub>v</sub> 1, IKCa
	BDS-I	<i>Anemonia sulcata</i>	K <sub>v</sub> 3.4
	APETx1	<i>Anthopleura elegantissima</i>	HERG
<b>Citolisina (Actinoporinas)</b>	Equinitoxina II (EqII)	<i>Actinia equina</i>	Membranas con esfingomielina
	Sticholisin II (St II)	<i>Stichodactyla heliathus</i>	Membranas con esfingomielina
	FraC	<i>Actinia fragacea</i>	Membranas con esfingomielina
<b>Inhibidores de proteasa</b>	ShPI	<i>Stichodactyla heliathus</i>	Proteasa (inhibidor tipo Kunitz)
	AEI	<i>Anemonia sulcata</i>	Proteasa (inhibidor tipo Kazal)

El estudio de las neurotoxinas y las citolisinas procedentes de anémonas, ha demostrado ser una herramienta importante en el desarrollo de posibles fármacos. En el caso de los canales iónicos, han servido como guía para determinar los mecanismos de acción. Las características de las citolisinas y las neurotoxinas, se describirán posteriormente.

Además de las toxinas citolisinas y neurotoxinas, que son procedentes de nematocistos generados en los tentáculos y el cuerpo, se han obtenido otro tipo de toxinas que proceden de los órganos específicos de las anémonas, como la acontia y el acrorhagi (específicos de especies de la familia Actiniidae<sup>17</sup>). Acrorhagi es un órgano que se encuentra en la base de la boca, tiene forma de pequeños sacos, son ricos en nematocistos,

principalmente del tipo holotricus (Fig. 3). Este órgano funciona como un órgano agresivo, que al sentirse en competencia puede dilatarse y por movimientos de la columna entra en contacto con otro organismo. Después del contacto, alguna parte del ectodermo acrorhagial se adhiere al cuerpo de la víctima y descargan los nematocistos<sup>5, 18, 19</sup>.

En el 2005, Honma y colaboradores<sup>19</sup> aislaron toxinas provenientes del órgano Acrorhagi de la anémona *Actinia equina*. Hasta la fecha, la secuencia de la toxina no tiene homología con ninguna toxina de anémona reportada. Una de las características de este grupo de toxinas es que poseen ocho cisteínas, las cuales no son conservadas, lo que sugiere una diferente conformación a toxinas ya reportadas<sup>17-20</sup>.

Lo más interesante de este tipo de toxinas es que por primera vez se reporta el ataque intra-especie. Se sabe que las anémonas poseen proteasas digestivas, las cuales desintegran la composición de sus propias toxinas, sin embargo, en el caso de las toxinas provenientes del acrorhagi, la anémona atacada, presenta daños, a pesar que son organismos de la misma especie<sup>21</sup>.

## 2.2 Citolisinas y neurotoxinas

### 2.2.1 Citolisinas

Estudios realizados por Anderluh & Macek (2003)<sup>22</sup>, identificaron que en más de 32 especies de anémonas se ha reportado un efecto citolítico letal de péptidos y proteínas. Las primeras citolisinas purificadas de anémonas fueron las actinoporinas<sup>23</sup>. Éstas, son extremadamente citotóxicas y citolíticas, tienen una masa molecular de 18 a 20 kDa, un punto isoeléctrico básico, y una estructura secundaria compuesta mayormente por hojas- $\beta$  que les permite formar poros oligoméricos en membranas<sup>24,25</sup>. Estas toxinas tienen una elevada similitud en estructura, a pesar que el porcentaje de identidad es baja (30%)<sup>13</sup>.



## 2. ANTECEDENTES

Las actinoporinas son moléculas únicas, debido a su capacidad de insertarse en la membrana, mediante la formación de canales hidrofílicos. La presencia de esfingomielina (un tipo de esfingolípido que se encuentra en las membranas de los animales) permite la formación de dichos canales. Los efectos citotóxicos y citolíticos de las actinoporinas afectan a un gran número de células, incluyendo plaquetas, fibroblastos, células tumorales y células parásitas<sup>26,27,28</sup>.

Los canales de las actinoporinas son selectivos a cationes y están integrados por monómeros que se insertan en la membrana lipídica, formando polímeros de 3, 6 ó 9 monómeros, según la especie (Figura 5), con un diámetro cercano a 13 nm que permite que pasen las moléculas de 400 a 900 Da<sup>29</sup>. En este modelo, los monómeros de las toxinas se unen a la superficie de la membrana por medio de grupos aromáticos, generando un cambio conformacional, dando pie a la formación de los poros en la membrana<sup>30</sup>.

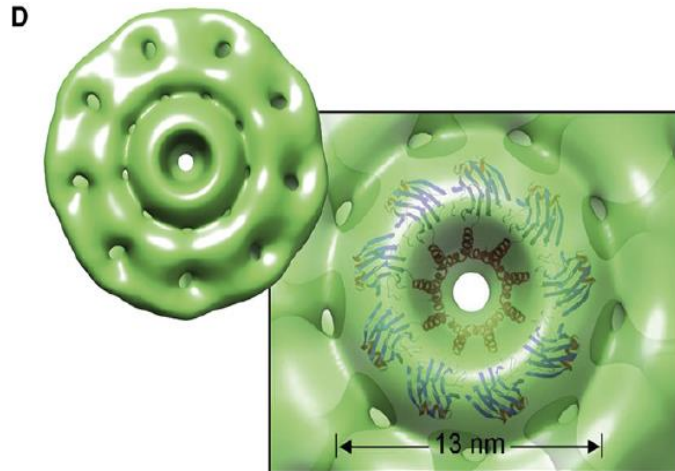


Fig. 5 Propuesta de mecanismo de formación de poros por actinoporinas<sup>29</sup>  
Los monómeros de la toxina FraC se unen a la superficie de la membrana por medio de los grupos aromáticos dando pie a la formación de poros.

### 2.2.2 Neurotoxinas

Las neurotoxinas han demostrado ser herramientas muy valiosas para el estudio de diferentes aspectos mecanísticos de neurotransmisión<sup>31</sup>. Un grupo diverso de toxinas, interactúa con los canales iónicos aumentando o inhibiendo la función del mismo<sup>32</sup>. Otras neurotoxinas, interfieren con la acción de los canales neuronales de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> regulados por voltaje<sup>33,34</sup>.

Algunos de los efectos observados en crustáceos al inyectar toxinas de anémona, son la actividad altamente parálitica ó movimientos involuntarios. Estos movimientos están vinculados a la presencia de al menos una proteína neuroactiva, la cual es responsable de causar el incremento en la actividad motora<sup>35</sup>. Los efectos tóxicos debido a las toxinas de Cnidarios se deben al deterioro de la permeabilidad de la membrana<sup>36,37,38</sup>.

En 1995, Schweitz y colaboradores<sup>39</sup> reportaron las primeras dos toxinas provenientes de la anémona *Anemonia sulcata* como bloqueadoras del canal de potasio. A estas toxinas se les conoce como Kaliclutines y Kaliseptine. Existen tres tipos de toxinas de anémona que interaccionan con los canales de potasio dependientes del voltaje, cada uno de estos tipos tienen características específicas que se describen a continuación:

#### Tipo I

Están conformadas por 35 a 38 aminoácidos y tres puentes de disulfuro. Las familias en las que se han encontrado este tipo son Actiniidae, Hormathiidae, Stychodactylidae y Thalassianthidae. Se sabe que los aminoácidos como Ser 20, Lys 22 y Tyr 23 son esenciales para la unión al canal de potasio, además, de los enlaces disulfuro formados se observan entre la Cys1-Cys6, Cys2-Cys4 y Cys3-Cys5. Los canales que son afectados son Shaker Kv1. Adicionalmente, se ha encontrado que comparten algunas características parecidas a las toxinas de escorpión<sup>40</sup>.

### Tipo II

Este tipo de toxinas suelen ser menos potentes que las Tipo I. Poseen de 58 a 65 aminoácidos, y tres enlaces disulfuro, aunado a ello, se han caracterizado como inhibidores de proteasa tipo Kunitz que intervienen en la degradación digestiva o metabólica de las proteínas, por ello, comparten similitud con toxinas de las serpientes (b-Bungarotoxina proveniente de *Bungarus multicinctus*)<sup>41</sup>.

### Tipo III

Las neurotoxinas del Tipo III, tienen de 41 a 42 aminoácidos, con tres enlaces disulfuro y tienen interacción en canales de tipo  $K_v3$  y en ether-a-go-go<sup>41</sup>.

En general, las anémonas son conocidas por ser ricas en toxinas peptídicas principalmente de dos tipos, las que actúan en el sitio tres del  $Na_v$  y en diferentes sitios del canal de potasio  $K_v^{33}$ . A principios de los años 90, se encontró una nueva clase de toxinas bloqueadoras de  $K_v 1.3$  a partir de diferentes especies de anémonas tales como *Bunodosoma granulifera*<sup>42</sup>, *Stichodactyla helianthus*, *Anemonia sulcata*<sup>39,43</sup> y *Heteractis magnifica*<sup>44</sup>. Algunas mutantes de estas toxinas peptídicas, están siendo utilizadas como prototipo de fármacos, por su gran afinidad con canales específicos<sup>6</sup>. Es por ello, que consideramos muy importante el estudio de las neurotoxinas bloqueadoras del canal de potasio, específicamente  $K_v1.3$ .

## 2.3 Canales de potasio

Los canales iónicos están formados por proteínas que atraviesan la membrana celular, permitiendo el paso de iones a favor de un gradiente de potencial electroquímico. Los canales se pueden abrir y cerrar como compuertas y se encuentran en todos los tipos de membranas celulares, incluidas las membranas plasmáticas de las neuronas y de las células

## 2. ANTECEDENTES

---

musculares<sup>45</sup>. Están involucrados en muchos procesos fisiológicos como la señalización eléctrica de los músculos y neuronas, y el mal funcionamiento de éstos puede provocar la aparición de diversas enfermedades (fibrosis cística, epilepsia, la ataxia episódica, etc.)<sup>46</sup>. Estos canales están formados por una parte hidrofóbica que permite la interacción con los lípidos que forman la membrana y una parte hidrofílica que permite el paso de los iones a través de la membrana<sup>45,47</sup>.

Los canales, se pueden clasificar en función del tipo de estímulo para su apertura o cierre en: canales activados por voltaje, canales activados por ligando y canales mecanosensibles<sup>45</sup>.

En los canales de compuerta dependientes de voltaje, un dominio de una proteína cargada se mueve en relación a la membrana en respuesta a un cambio del potencial eléctrico transmembranal, provocando que el canal iónico se abra o se cierre<sup>45</sup>.

Se han estudiado distintas isoformas de los canales de potasio, que han ido cobrando interés por que se han correlacionado con enfermedades autoinmunes<sup>36</sup>. Por medio de cristalografía, se han determinado algunas estructuras de canales de potasio, lo que ha permitido conocer su conformación.

El primer estudio realizado en el canal de potasio fue realizado en la bacteria *Streptomyces lividans*, a este canal se le conoce como KcsA, el cual ha servido como modelo para el estudio de canales de potasio. KcsA está formado por cuatro subunidades idénticas, compuestas por tres segmentos. En medio del dominio existe un filtro selectivo que mide 12 Å de largo y 2.8 Å de diámetro, este filtro se ha alineado con los grupos carbonilos de seis residuos TTVGYG, los cuales son conservados en los canales de potasio<sup>48,49</sup>. En la Figura 6 podemos observar la estructura de KcsA, en tres diferentes vistas.

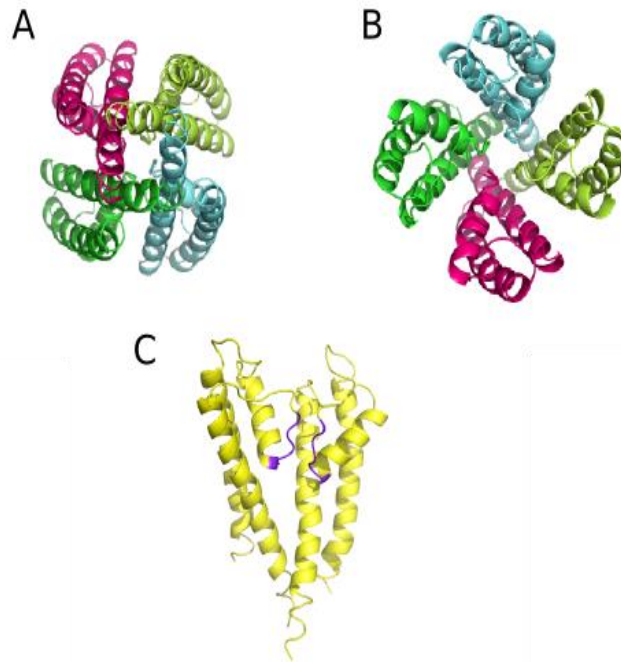


Fig. 6 Canal de potasio de KcsA.

A) Se observa la cavidad interna, B) Cavidad externa, C) vista lateral en la cual se resaltan los residuos TTVGYG PDB 1BL8.

### 2.3.1 Canal de potasio Kv1.3 y su relación con células T

La familia de canales de potasio Kv1 está integrada por seis genes (Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4, Kv1.5 y Kv1.6) cada uno con funciones específicas<sup>37</sup>.

El canal Kv1.3 pertenece a la familia Shaker (Kv1), participa en la diferenciación de tejidos y en el crecimiento celular y la señalización por calcio en las células T efectoras de memoria en humanos. Además, ayuda promoviendo la proliferación, regulación del volumen celular, activación, apoptosis y producción de citosinas proinflamatorias<sup>50,51</sup>. Se encuentra presente en diversos sistemas y órganos como el sistema nervioso central, hígado, riñón, músculo esquelético, testículos, espermatozoides, osteoclastos, plaquetas y Macrófagos. Se ha demostrado que Kv1.3 es muy importante para la regulación del peso, el gasto de energía y la homeostasis de glucosa<sup>52</sup>.

La búsqueda de moléculas que inhiban la activación del canal Kv1.3 ha ido en aumento, debido a que enfermedades autoinmunes, como esclerosis múltiple<sup>53</sup>, diabetes mellitus tipo 1, vitiligo, psoriasis y artritis reumatoide están ligadas a dicho canal. Las moléculas bloqueadoras de canales Kv1.3, representan una nueva clase de inmunomoduladores con un menor riesgo de inducir una inmunosupresión, debido a que se dirigen (preferentemente) a los linfocitos T<sub>(TEM)</sub> de memoria efectora, implicados en enfermedades autoinmunes, con poco o ningún efecto sobre otros subconjuntos de linfocitos<sup>54</sup>.

Un pequeño número de toxinas de origen animal (escorpiones, serpientes, anfibios, arañas y anémonas) es capaz de bloquear el canal Kv1.3<sup>46</sup>. Dichas toxinas, tiene la característica de poseer tres o cuatro puentes de disulfuro, estos bloqueadores se unen con gran afinidad al vestíbulo externo del poro bloqueando el flujo de la corriente iónica.

Las toxinas que se estudiaron en este trabajo, fueron BcsTx1 y OspTx2b, ambas pertenecen al grupo de las neurotoxinas bloqueadoras del canal Kv1.3 provenientes de anémonas.

### **2.4 Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de Proteínas**

La RMN se basa en el estudio de las interacciones magnéticas que existen entre el núcleo atómico con el medio circundante, cuando se encuentran sometidos a un campo magnético externo.

Desde su desarrollo inicial como técnica espectroscópica en 1946, la RMN ha expandido continuamente su área de aplicación. En la actualidad, RMN es una herramienta imprescindible en la determinación de estructuras, además de proporcionar información de

los entornos químicos de los núcleos, relaciones geométricas entre átomos, distancias, dinámica e interacciones moleculares<sup>55,56,57</sup>.

La determinación de estructuras tridimensionales de biomoléculas mediante RMN, en particular de proteínas y ácidos nucleicos, ha constituido la frontera de la investigación científica en este campo. En estas biomoléculas, se han aplicado sistemáticamente las técnicas e instrumentos más novedosos en los últimos 30 años para su caracterización<sup>58</sup>.

Para poder estudiar un sistema por RMN en solución, se requiere cumplir con ciertas condiciones. Dependiendo de las características de las muestras, la concentración óptima se encuentra cerca de 1 mM, el volumen mínimo requerido es de 450  $\mu$ L en tubos convencionales y se busca normalmente una pureza mayor al 90%<sup>59</sup>. La sensibilidad puede mejorarse con el uso de equipos de mayor campo magnético y sondas criogénicas. En el caso de estudio de proteínas, la cantidad y el tipo de aminoácidos presentes determinan el número de señales que aparecerán en los espectros. A mayor número de aminoácidos las probabilidades de traslape de señales incrementa, lo que dificulta la asignación y se vuelve un requisito, el uso de marcaje isotópico.

El desplazamiento químico es la medida indirecta del entorno químico que rodea a cada uno de los núcleos, es por ello que se puede identificar, mediante este parámetro, los distintos tipos de núcleos que componen una molécula. La frecuencia de resonancia de cada núcleo depende del ambiente químico del núcleo en la molécula.

El desplazamiento químico es sensible a cambios de pH, temperatura, solvente y concentraciones<sup>60,61</sup>. También describe la presencia de estructuras secundarias en proteínas tipo  $\alpha$ -hélices y hojas  $\beta$ . En la presencia de  $\alpha$ -hélices, el desplazamiento químico presenta cambios positivos en tres residuos consecutivos con respecto a los valores reportados para proteínas desplegadas. Mientras que si los cambios son negativos, se predice hojas  $\beta$ .

## 2. ANTECEDENTES

---

En una proteína, la mayoría de los átomos que podemos encontrar son protones, los cuales aparecen en una región específica del espectro de RMN. Con la información que se puede obtener de estos átomos, se puede calcular la estructura tridimensional de proteínas pequeñas (menores a 60 aminoácidos).

En la Figura 7 se observan los desplazamientos químicos típicos de una proteína en un espectro de 1D. Las señales observadas, son la suma de todas las señales de los protones presentes en la estructura. Los  $^1\text{H}$  de grupo amida (NH), aparecen entre 6.5 y 11.5 ppm, mientras que los  $^1\text{H}$  de grupos aromáticos aparecen entre 6.5 a 8.0 ppm (excepto los desplazamientos de  $\text{H}_\epsilon$  de Trp e His que normalmente se encuentran en 8.0 y 10.2 aproximadamente). Entre 3.5 a 5.0 ppm, se encuentran los espines de los  $^1\text{H}_\alpha$  (Hidrógenos alfas), mientras que a campos más altos entre 1.0 y 3.5 ppm se encuentran los  $^1\text{H}_\alpha$  de metilos alifáticos y los metilos se observan desplazamientos menores a 1.0 ppm.

Debido al gran número de traslape de señales presente, se hace imposible interpretar un espectro de una proteína, sin embargo, las señales de la cadena principal (NH), nos dan información acerca del plegamiento de la proteína. Señales en la región de 8 ppm (aproximadamente con mayor dispersión) implican que la proteína probablemente se encuentre plegada (Fig.7). Por el contrario, cuando hay poca dispersión la proteína se encuentra desplegada.



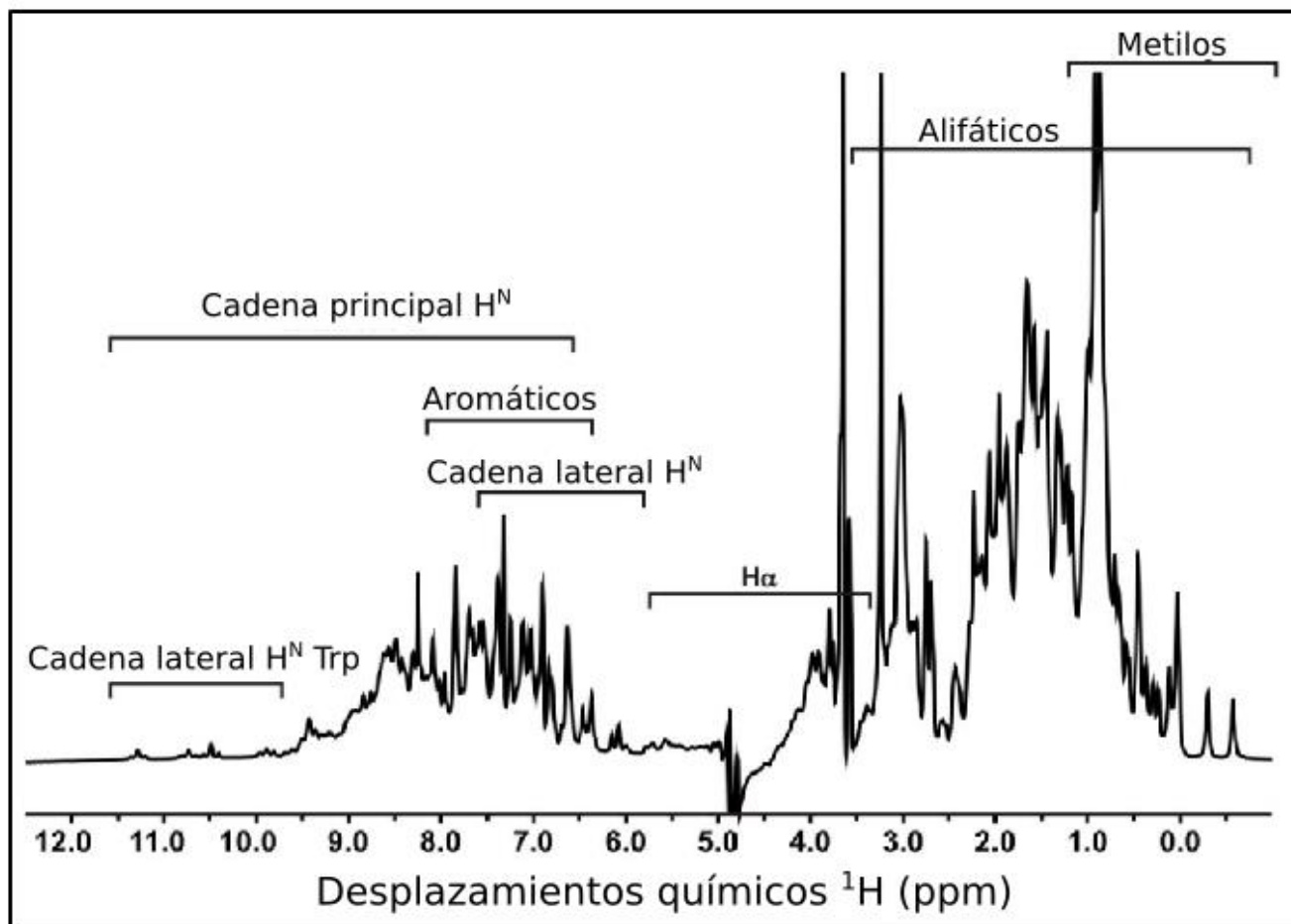


Fig. 7 Desplazamientos químicos

Las constantes de acoplamiento escalar o acoplamiento  $J$ , dependen de la geometría de los enlaces covalentes y tienen un profundo efectos en la señal de RMN. Estos acoplamientos se originan cuando un núcleo forma un enlace covalente con otro núcleo, es decir, la interacción entre núcleos–electrones. Este acoplamiento es muy utilizado en el estudio de moléculas pequeñas, donde ésta constante es muy importante para la identificación de estructuras.

Los acoplamientos escalares pueden ser usados para definir los rangos de conformación de los ángulos diedros, los cuales ayudan a mejorar el cálculo de una

## 2. ANTECEDENTES

---

estructura. A continuación se muestran los valores teóricos de los acoplamientos escalares en estructuras secundarias (Tabla 2).

Tabla 2 Valores teóricos de  $^3 J_{\text{HN-}\alpha\text{H}}$  en estructuras secundarias típicas.

<b>Estructura secundaria</b>	<b><math>\theta</math></b>	<b><math>^3 J_{\text{HN-}\alpha\text{H}}</math></b>
$\alpha$ -hélice	-57°	3.9 Hz
$3_{10}$ -hélice	-60°	4.2 Hz
$\beta$ -antiparalela	-139°	8.9 Hz
$\beta$ -paralela	-119°	9.7Hz

Otro tipo de interacción es la dipolar o acoplamiento dipolar, que se produce por las interacciones entre núcleos y el campo magnético externo, la cual es dependiente de la distancia entre núcleos<sup>56</sup>. Por otra parte, el efecto nuclear Overhauser (NOE), proporciona información acerca de las distancias entre núcleos, debido a la transferencia de magnetización entre núcleos próximos en el espacio<sup>62</sup>.

Existen patrones observados en los experimentos NOE los cuales nos dan información de la estructura secundaria como regiones con hélices ( $\alpha$ ,  $3_{10}$ ) y las cadenas extendidas (correspondientes a las hojas  $\beta$ ). En el caso de las regiones con hélices, se observan que los protones de amida secuencial están cerca en el espacio (Figura 8A). En el caso de las hojas  $\beta$ , se observan regiones secuenciales  $\text{NH}_{i+1}$ - $\alpha\text{H}_i$ , y señales de NOE entre núcleos lejanos como se observa en la Figura 8B.

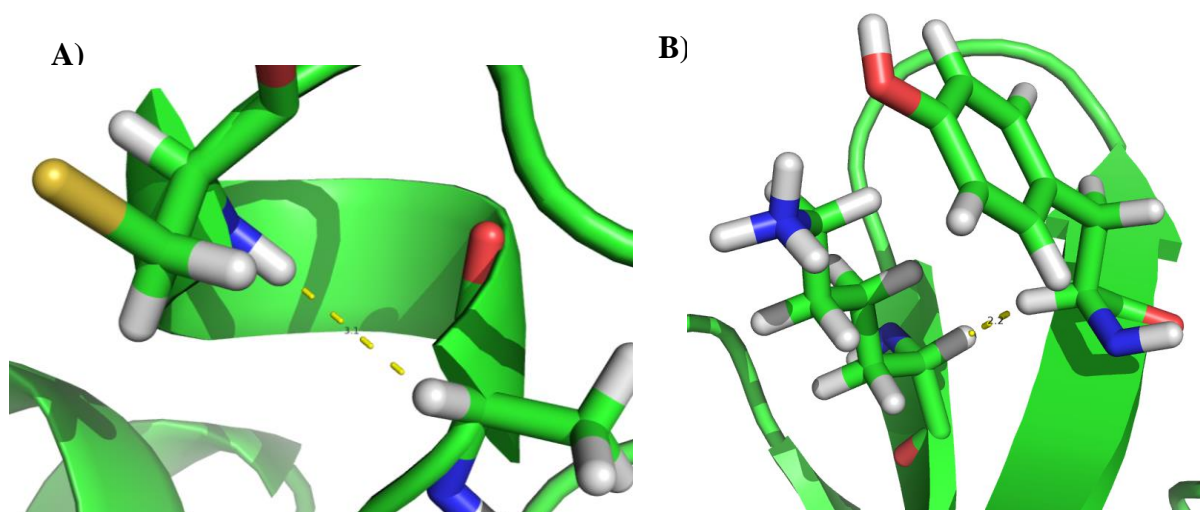


Fig. 8 Estructura secundaria de una proteína. A) Estructura  $\alpha$ - hélice. B) Estructura hojas  $\beta$ . de los grupos funcionales correspondientes a una proteína plegada.

Para lograr la determinación de estructuras por RMN, es importante obtener espectros multidimensionales. En el caso de péptidos, experimentos homonucleares bidimensionales como TOCSY, COSY y NOESY, son suficientes. Cuando la complejidad de la molécula es mayor, existen diferentes experimentos homonucleares y heteronucleares bidimensionales (2D) y tridimensionales (3D) de RMN, que nos dan información de las interacciones entre núcleos<sup>63</sup>. En la Tabla 3 se muestran algunos de los experimentos de RMN más utilizados.

Tabla 3 Principales experimentos de RMN en 2D.

NOMBRE	CARACTERÍSTICAS
COSY	(COrelated Spectroscopy) Muestra la correlación de núcleos de la misma especie.
TOCSY	(TOtal Correlated Spectroscopy) 2D Correlación de núcleos de un mismo sistema espín.
NOESY	(Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) Correlación de núcleos a través del espacio, a una distancia no mayor a 5 Å.
HSQC	(Heteronuclear Single Quantum Coherence) Correlación de heteronucleos a un enlace de distancia.

Las limitaciones de la RMN, en cuanto a sensibilidad y resolución, han sido continuamente superadas mediante el desarrollo de ingeniosas técnicas cada vez más poderosas. La

sensibilidad se ha incrementado con el desarrollo de potentes criomagnetos (resonancia protónica hasta 1GHz) y el desarrollo de criosondas<sup>64</sup>.

### 2.4.1 Experimentos de RMN bidimensional para la determinación de estructura

#### COSY (Correlated spectroscopy)

Consiste en un experimento homonuclear, en el cual los contornos fuera de la diagonal surgen de la transferencia de coherencia entre núcleos acoplados escalarmenete, es decir, por medio de los electrones de enlace. Los protones que son observables en este espectro son los que están separados a 1, 2 o 3 enlaces de distancia (Figura 9). Las señales que se observan en este tipo de experimento son: señales en la diagonal, las cuales corresponden a las señales del espectro unidimensional y las señales fuera de la diagonal, que corresponden a los desplazamientos químicos de los protones que se encuentran acoplados escalarmenete. Estas señales proporcionan información acerca del enlace y los núcleos<sup>62</sup>.

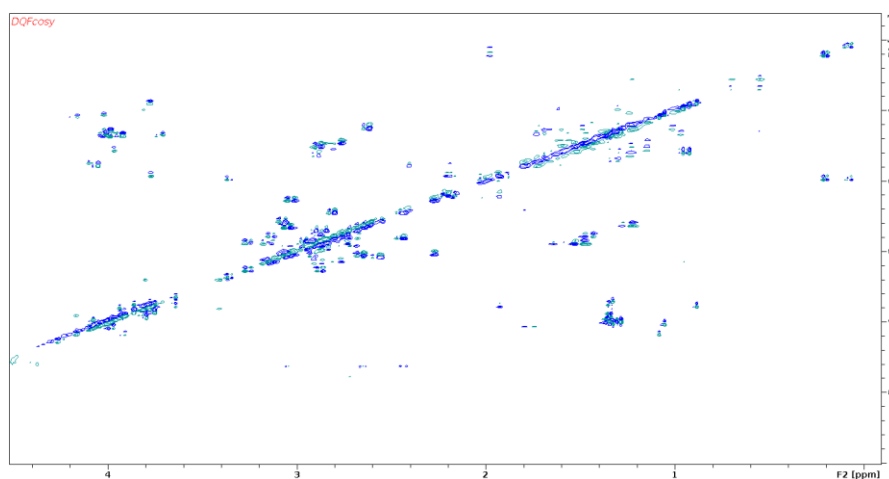


Fig.9 Espectro de COSY de una proteína.

### TOCSY (Total Correlated spectroscopy)

Este experimento también es conocido como HOHAHA (HOmonuclear HArtman Hanh experiment). Con el experimento TOCSY se pueden definir y encontrar los desplazamientos químicos de átomos de hidrógeno de cada sistema del espín (Figura 10). El experimento de TOCSY se basa en una serie de pulsos continuos, que provocan que un mismo sistema de espín se encuentre bajo una mezcla isotrópica, es decir, que todos los espines del sistema están bajo el mismo campo efectivo, y la magnetización es transferida entre núcleos acoplados a más de 3 enlaces de distancia<sup>66</sup>. Las señales que se observan en este tipo de experimento son: señales en la diagonal, las cuales corresponden a las señales del espectro unidimensional y las señales fuera de la diagonal, que corresponden a los desplazamientos químicos de los protones que se corresponden a un sistema de espines (aminoácido).

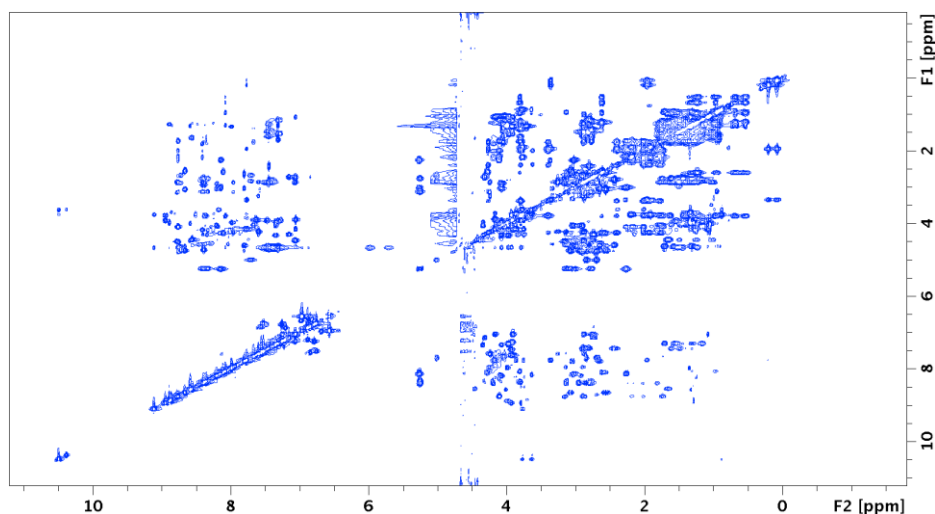


Fig. 10 Espectro TOCSY de una proteína.

NOESY (Nuclear Overhauser-Effect Spectroscopy).

El efecto Nuclear Overhauser (NOE) es el resultado de la interacción con dipolos a través del espacio<sup>62</sup>. Este efecto es de corto alcance, por lo que permite la medición de distancias menores a 5 Å. La intensidad de las señales debidas al NOE puede ser relacionada con la distancia entre los núcleos<sup>56</sup>.

Las señales observadas en el espectro NOESY (Figura 11) permiten realizar la asignación secuencial de los aminoácidos de una proteína, así como la determinación de la estructura tridimensional por medio de la asignación de señales NOE. Las señales que se observan en este tipo de experimento son: señales en la diagonal, las cuales corresponden a las señales del espectro unidimensional y las señales fuera de la diagonal, que corresponden a los desplazamientos químicos de los protones que se encuentran cercanos espacialmente.<sup>67</sup>

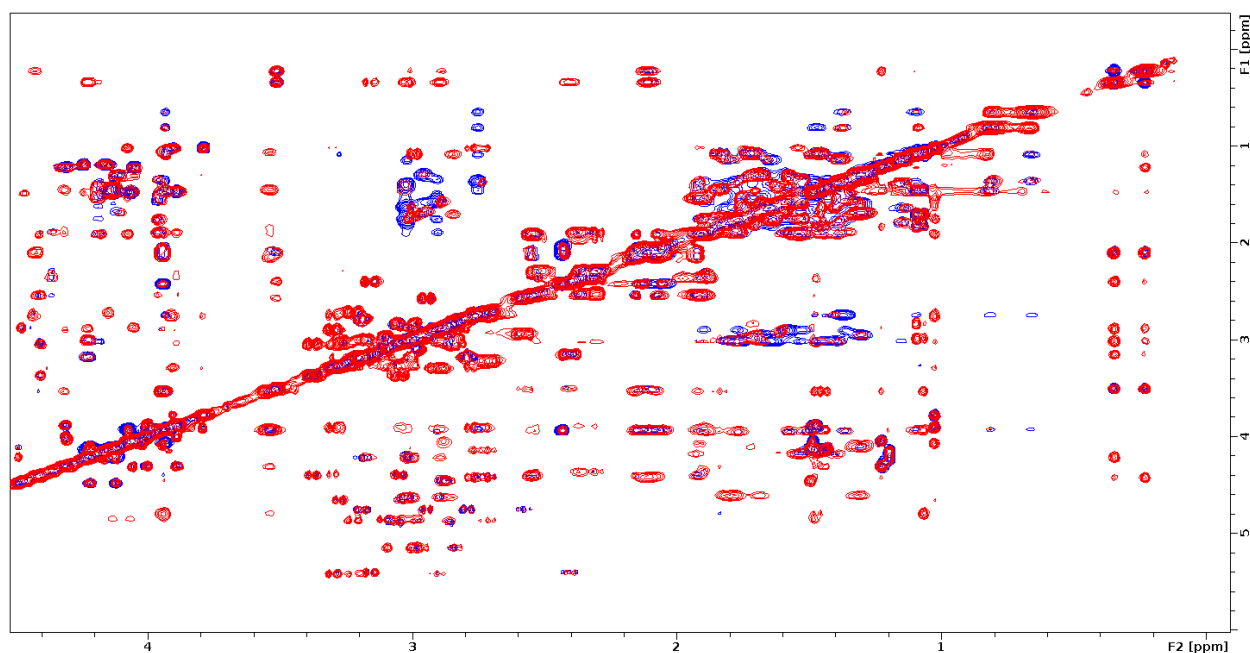


Fig. 11 Espectro NOESY (rojo) traslapado con TOCSY (azul) de una proteína.

### 2.4.2 Proceso de asignación

La asignación de las resonancias de cada uno de los aminoácidos, en una secuencia, es el primer paso para la determinación de estructura de las proteínas por RMN. A partir de 1990, se empezaron a realizar estudios de RMN en proteínas y a partir de allí se revolucionó el estudio de moléculas de mayor tamaño como carbohidratos y ácidos nucleicos, para lo cual se desarrollaron nuevas técnicas. Entre las nuevas técnicas que se empezaron a implementar esta la producción de proteínas recombinantes marcada isotópicamente con  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ , para llevar a cabo la RMN en tres dimensiones. Con el incremento de dimensión, se pudieron resolver problemas como el traslape de señales característico de proteínas de mayor tamaño. El proceso de asignación es distinto con proteínas marcadas isotópicamente que a las proteínas sin marcar.

A continuación, se describe el proceso de asignación en dos dimensiones (H-H)<sup>68</sup>:

- 1) Identificar en el experimento COSY, las señales correspondientes al  $\text{H}\alpha$  (Hidrógenos alfa) de los residuos en el experimento.
- 2) Agrupar todas las señales en el experimento TOCSY que están asociadas con el mismo sistema de espín (mismo residuo). Estas frecuencias están divididas en núcleos que pertenecen a la cadena lateral ( $\text{H}\text{N}$ ,  $\text{H}\alpha$ ,  $\text{H}\beta$ ,  $\text{H}\delta$ ,  $\text{H}\zeta$ ,  $\text{H}\epsilon$ ).
- 3) Agrupar al sistema espín basado en el tipo de patrón de aminoácido que presente.
- 4) Determinar cuáles pares del sistema espín se conectan con el residuo adyacente de la proteína (traslapar experimentos TOCSY y NOESY). En este paso, pueden coincidir más de un sistema espín. Se pueden determinar segmentos

discontinuos debido a la pérdida de señales, al traslape de señales o a la presencia de prolinas (las cuales no poseen protón de amida).

5) Asociar la conexión de segmentos del sistema espín con los segmentos de la secuencia que mejor coincidan con el tipo de residuo del sistema espín.

### Índice de desplazamiento químico

El método de índice de desplazamiento químico (CSI) relaciona los cambios de desplazamiento químico de los átomos:  $^1\text{H}\alpha$ ,  $^{13}\text{C}\alpha$ ,  $^{13}\text{C}\beta$  y  $^{13}\text{CO}$  de cada aminoácido con respecto a los valores de referencia establecidos.

### 2.4.3 Cálculos estructurales mediante CYANA

Para determinar la estructura de moléculas, tales como proteínas o péptidos, es necesario obtener datos sobre las interacciones de los núcleos a través del espacio, estas interacciones se encuentran en el espectro de NOESY. En las señales derivadas del NOESY, podemos encontrar señales de larga y corta distancia en secuencia. En especial las señales de larga distancia son de mayor utilidad para la determinación de estructura terciaria.

La asignación de las señales en NOESY, no es una tarea sencilla, debido a que estas señales pueden sobreponerse, además que existen diversas posibilidades en la asignación, es por ello que se tiene que realizar con el mayor cuidado y realizar varias veces, para lograr que las restricciones de distancia concuerden unas con respecto a otras y se pueda obtener un modelo adecuado, basado en la estabilidad energética. El cálculo de estructura engloba varios parámetros como restricciones de distancia, ángulos de enlace, ángulos de torsión y longitudes de enlace.



El cálculo de estructura mediante el programa CYANA consta de varias etapas, las cuales hay un incremento y estabilización de temperatura y diferentes valores de ángulos de torsión. El número de modelos aleatorios es normalmente de 200 y al finalizar el proceso se llegan a las 20 estructuras más estables en base al parámetro elegido. Para llegar a estas estructuras estables, el programa realiza siete ciclos, en los que la estructura se va definiendo en base a las restricciones establecidas.

CYANA requiere algunos archivos como: la secuencia de aminoácidos, la lista de desplazamientos químicos, una lista de interacciones nOe asignados para calibrar las restricciones de distancia y generar una lista de asignaciones creada para cada pico tomando en cuenta los desplazamientos químicos. Las asignaciones son filtradas de acuerdo a las tolerancias establecidas y se generan las restricciones de distancia para todos los picos de cruce. Posteriormente, se calculan las estructuras mediante un proceso dinámico de ángulos de torsión usando un protocolo de enfriamiento en el cual el movimiento se reduce y estas estructuras son utilizadas para el siguiente ciclo y así iterativamente. De esta manera, se garantiza que las interacciones de NOE tengas asignaciones específicas para cada átomo de hidrógeno.

### *2.4.4 Afinamiento de estructura*

Una vez obtenida la estructura de CYANA, se realiza un afinamiento de estructura, basados en los valores de las contribuciones de fuerzas de Van der Waals, interacciones electrostáticas, ángulos de torsión, potenciales energéticos y longitudes de enlace, los cuales generan gradientes de energía potencial. Lo que se busca es minimizar la energía potencial debida a los movimientos de los átomos y para ello se somete la estructura a una simulación a alta temperatura y posteriormente se disminuye, permitiendo así la formación de diversas conformaciones, así mismo el uso de simulaciones en solventes ayuda al afinamiento de la estructura.

### 2.4.5 Validación de estructura

Para evaluar la calidad de una estructura determinada por RMN, se utilizan distintos parámetros como el número y tipo de restricciones de NOE a corta, mediana y larga distancia, el valor de RMSD, las restricciones de ángulos de torsión, el valor de RMSD (Root Mean Square Deviation), es la medida de desviación estándar de la distancia entre átomos que conforma la molécula. Mientras menos sea el número de violaciones obtenida y el valor de RMSD sea menor o igual a 1 Å, se considera que la estructura es viable.

La técnica de RMN es una herramienta muy versátil, que puede ser utilizada para determinar la estructura tridimensional de proteínas, además de proveer otro tipo de información, como la dinámica de moléculas en diferentes escalas de tiempo o la interacción que existe entre diferentes moléculas. Esta técnica espectroscópica ha sido aplicada para el estudio de modelos estructurales tridimensionales, así como para conocer las interacciones que presentan las toxinas<sup>69-72</sup>.

### 2.4.6 Estudio de neurotoxinas por RMN

En 1989, Driscoll<sup>73</sup> reportó la primera estructura tridimensional de una fracción llamada BDS-I (Blood Depressing Substances) proveniente de la anémona *Anemonia sulcata* que presentó actividades antihipertensión y antivirales<sup>74</sup>.

Las neurotoxinas son el tipo de toxinas que han sido mayormente determinadas por RMN. En el caso de las neurotoxinas de anémonas las cadenas de aminoácidos suelen ser pequeñas, van de 10 a 45 aminoácidos y determinar la estructura de estas secuencias es relativamente sencillo, siempre y cuando se tengan las condiciones óptimas<sup>41</sup>, sin embargo, también existen estudios de elucidación, con actinoporinas mayores a 20 kDa<sup>75</sup>, con ello se muestra la versatilidad de la técnica RMN<sup>76</sup>.

## 2. ANTECEDENTES

De acuerdo con la NBCI (National Center of Biotechnology Information), existen 78 estructuras de anémonas de mar, 27 de ellas son por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y 51 por difracción de rayos X. Mientras que, el total de secuencias de aminoácidos, que se encuentra en esta base de datos provenientes de anémonas es de más de 50 mil, es decir, solamente cerca del 0.05% de las secuencias conocidas han sido determinadas estructuralmente.

En 1996, Dauplais y colaboradores<sup>42</sup> realizaron la síntesis química en fase sólida y determinación de estructura de la toxina BgK, de la anémona *Bunodosoma granulifera*. BgK interacciona con los canales de Potasio. Asimismo en 1997 se estudió y elucidó la toxina ShK donde se demostró que la proteína nativa, la sintética y la recombinante tienen un comportamiento similar bloqueando canales de Potasio.

La alineación de las toxinas ShK y BgK se muestran en la Figura 12. Como se puede observar en el alineamiento, algunos aminoácidos son conservados, entre ellos las cisteínas, el porcentaje de identidad entre ShK y BgK es del 35%. Estas dos toxinas son interesantes porque han mostrado bloquear el canal de potasio sensible al voltaje Kv1.3.

```
ShK      RSCIDTIPKSRCTAFQ----CKHSMKYRLSF--CRKTCGTC
BgK      VCRDWFKETACRHA KSLGNCR TSQKYRAN---CAKTCELC
```

Fig. 12 Alineamiento de secuencias de la toxinas ShK (*Stichodactyla helianthus*) y BgK (*Bunodosoma granulifera*)

La toxina nativa de ShK (Figura 13), consiste en dos alfa hélices cortas que van de los residuos 14-19, 21-24 y un N-terminal con una conformación extendida hacia el residuo 8, seguida por una hélice  $3_{10}$ <sup>77</sup>. Se estima que la superficie de ShK provoca una unión con el canal de Potasio sensible al voltaje (K<sub>v</sub>), siendo los residuos Lys22, Tyr23, Arg11, His19, Ser20 y Arg24 los aminoácidos que contribuyen a esta interacción<sup>77-79</sup>.

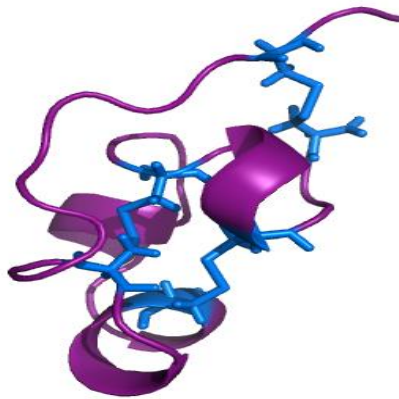


Fig. 13 Estructura tridimensional determinada por RMN de la neurotoxina ShK (PDB 1ROO)<sup>79</sup>

Por su parte, BgK (Figura 14) está formada por dos hélices, una desde 9 al 16 y la otra del residuo 24 al 30. Las cisteínas forman puentes disulfuro con funciones específicas Cys2-Cys37 mantienen la aproximación espacial, mientras que el enlace Cys20-Cys34 conservar los loops 16-24 y 31-37 dentro del centro de la molécula, de esta manera la toxina adquiere una forma globular. El RMSD (Root Mean Square Deviation) entre las estructuras de BgK y ShK es de 0.718. El enlace de Cys11-Cys30 une las dos hélices, adquiriendo una conformación única<sup>42</sup>.



Fig. 14 Estructura tridimensional determinada por RMN de la neurotoxina BgK (PDB 1BGK)<sup>43</sup>.

## 2. ANTECEDENTES

En el presente trabajo, se estudiaron las toxinas: BcsTx1 y OspTx2b cuyo porcentaje de identidad entre ellas es de 54%, en la siguiente Figura 15 se muestra el porcentaje de identidad entre ShK y BgK con respecto a OspTx2b.

		ID (%)
OspTx2b	ACKDNLPAATCSNVKANNNC-SSEKYKTN---CAKTCGEC	100
ShK	RSCIDTIPKSRCTAFQ----CKHSMKYRLSF--CRKTCGTC	35
BgK	VCRDWFKETACRHA KSLGNCR TSQKYRAN---CAKTCELC	43
BcsTx1	ACIDRFPTGTCKHVKKGGSCKNSQKYRIN---CAKTCGLCH	54

Fig. 15 Alineación de secuencias de OspTx2b con secuencias que han demostrado tener interacción con canales de potasio, como ShK, BgK y BcsTx1.

### 2.5 Toxina OspTx2b proveniente de la anémona *Oulactis sp.*

*Oulactis sp.* es una anémona endémica de las costas sureste de Australia, se encuentra en las costas a profundidad de 0 a 1 m, se pueden encontrar en colores amarillo, marrón y verde. La longitud de la columna puede ser hasta 6 cm de longitud (<https://collections.museumvictoria.com.au/species/8617>).

Se desconocen el tipo total de toxinas presentes en este organismo, sin embargo, se están realizando estudios del transcriptoma de esta especie y se han aislado más de 14 secuencias de toxinas diferentes, procedentes de esta anémona (comunicación personal Dr. Norton).

OspTx2a y OspTx2b, son dos toxinas obtenidas de *Oulactis sp.* Sus secuencias tienen homología con neurotoxinas ShK, BgK, BcsTx1 y BcsTx2, denominadas bloqueadores del Kv1.3.

Tabla 4 Taxonomía de *Oulactis* sp.

Reino	<i>Animal</i>
Filo	<i>Cnidaria</i>
Clase	<i>Anthozoa</i>
Subclase	<i>Hexacorallia</i>
Orden	<i>Actiniaria</i>
Suborden	<i>Nyantheae</i>
Infraorden	<i>Thenaria</i>
Familia	<i>Actiniidae</i>
Género	<i>Oulactis</i>
Especie	<i>Oulactis</i> sp.



Fig.16 Anémoma *Oulactis* sp.

### 2.6 Toxina BcsTx1 proveniente de anémoma la *Bunodosoma caissarum*

La anémoma *Bunodosoma caissarum* (nombrada por Corrêa, 1964), es una especie endémica Brasil, distribuida a lo largo de las costas de Sao Paulo y Río de Janeiro. *B. caissarum* se reproduce de manera sexual y abunda en las aguas contaminadas, donde la densidad de población puede alcanzar 150 individuos por metro cuadrado<sup>23</sup>. Esta anémoma es utilizada para la extracción biológica de compuestos activos y como biomonitor de la radioactividad en las costas.

El extracto crudo de *B. caissarum* ocasiona convulsiones en ratón<sup>15</sup>, se han logrado identificar neurotoxinas que atacan a los canales de sodio y potasio, además de hemolisinas con un peso molecular de 15 y 20 kDa. Otras fracciones como BcPLA (2) de 14.7 kDa mostró efectos sobre Fosfolipasa A<sub>2</sub>, específicamente en las funciones renales<sup>70</sup>, además se observaron efectos antimitóticos y citotóxicos en erizos de mar<sup>80</sup>. El estudio con los nematocistos de *B. caissarum* comenzó con pruebas para obtener cápsulas del cnidocito *in vitro*, así como su veneno. Sin embargo, como las técnicas anteriores utilizadas con esta especie no tuvieron éxito, se utilizó un método *in vivo*.

## 2. ANTECEDENTES

Tabla 5 Taxonomía de *Bunodosoma caissarum*

Reino	Animal
Filo	Cnidaria
Clase	Anthozoa
Subclase	Hexacorallia
Orden	Actinaria
Suborden	Nyantheae
Infraorden	Thenaria
Familia	Actiniidae
Género	Bunodosoma
Especie	Bunodosoma caissarum



Fig.17 Anémoma *Bunodosoma caissarum* (fotografía de: <http://cifonauta.cebimar.usp.br/photo/3811/>)

En el artículo de Orts, *et al* (2013), se realiza un estudio de nuevas neurotoxinas provenientes de la anémoma *B. caissarum* denominadas: BcsTx1, BcsTx2 y BcsTx3<sup>15,81</sup>. En este estudio, se muestrearon organismos en dos zonas geográficas diferentes en Brasil, con el objetivo de comparar los efectos que tienen las toxinas de *B. caussiarum* en ovocitos de *Xenopus leavis*. Las neurotoxinas BcsTx1 y BcsTx2 presentaron actividades en canales de potasio sensibles al voltaje y se obtuvo la secuencia de aminoácidos de cada una de estas toxinas. BcsTx1 y BcsTx2 tienen 38 y 37 aminoácidos respectivamente y tres enlaces disulfuro<sup>15</sup>.

El porcentaje de identidad entre BcsTx1 y BgK, es del 42% sin embargo, se han reportado diferencias en la interacción con el canal de Potasio<sup>42</sup>. Lo que podría sugerir una diferencia estructural que conduce a la discrepancia de las interacciones con dicho canal.

En este trabajo se estudiaron las neurotoxinas OspTx2 provenientes de la anémoma *Oulactis* sp. y BcsTx1 de la anémoma *Bunodosoma caissarum*. Se obtuvieron estas toxinas por métodos sintéticos y recombinantes, respectivamente y se realizaron experimentos de RMN con el fin de determinar la estructura de dichas toxinas.

## 2. ANTECEDENTES

---

Parte de este trabajo se desarrolló en Monash Institute of Pharmaceutical Science, Victoria Australia con una colaboración con el Profesor Raymond S. Norton, como parte de una estancia de investigación.

El trabajo más extenso fue realizado en r-BcsTx1, debido a que se realizó el diseño del plásmido con la toxina, la optimización del protocolo de expresión y purificación, sin embargo, fue complicado la obtención del péptido puro y en buenas cantidades, así como la utilización de los equipos de RMN del LANEM-CIQ. Por estos motivos, no se logró concluir estos estudios y solamente se presentan los avances obtenidos para esta toxina.



### 3. OBJETIVO GENERAL

Determinar la estructura terciaria de la toxina OspTx2b, proveniente de la anémona *Oulactis* sp., y de la toxina BcsTx1 por medio de la técnica Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

#### *Objetivos Particulares*

- Obtener los péptidos OspTx2b y BcsTx1.
- Purificar los péptidos OspTx2b y BcsTx1.
- Asignar las señales de RMN de OspTx2b y BcsTx1.
- Determinar la estructura tridimensional de los péptidos OspTx2b y BcsTx1.

### 4. HIPÓTESIS

La estructura tridimensional de OspTx2b y BcsTx1 será semejante a la estructura de las neurotoxinas ShK y BgK, provenientes de otras anemonas (*Stichodactyla helianthus* y *Bunodosoma granulifera*, respectivamente).

### 5. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad el estudio de toxinas de origen marino en México, es muy reducido; los grupos de investigación se centran en la purificación y caracterización biológica de estos organismos, para tratar de comprender el comportamiento de la variedad de péptidos y proteínas que poseen los Cnidarios.

La importancia del estudio de toxinas de origen marino, en especial de anémonas, radica en que se ha podido obtener un homólogo de la toxina ShK, el cual se encuentra en fase de prueba para enfermos de psoriasis. Esta enfermedad es autoinmune y se ha podido controlar la proliferación de las células T, es decir, se ha observado el detenimiento de despigmentación de la piel en los pacientes que presentan este daño. Así como la psoriasis, existen otras enfermedades autoinmunes, que no tienen un tratamiento efectivo, por ello la búsqueda de nuevas moléculas que puedan ayudar al tratamiento de este tipo de enfermedades, sin comprometer el óptimo funcionamiento de organismo.

Existen pocas secuencias de aminoácidos descritas provenientes de anémonas, y consecuencia de ello, la cantidad de modelos estructurales obtenidos por RMN y por difracción de rayos X es muy limitada. Es por ello, que con este proyecto se pretende producir diferentes tipos de toxinas y determinar la estructura tridimensional por medio de RMN, así como comprobar su actividad en distintos sistemas.

## 6. METODOLOGÍA

En la Figura 18 se muestra un esquema general de la metodología de este trabajo. Como se puede observar una toxina (r-BcsTx1) se produjo por técnica recombinante, mientras que otra (OspTx2b) por síntesis química. En la primera parte de la metodología se describe la producción de OspTx2b y en la segunda rBcsTx1.

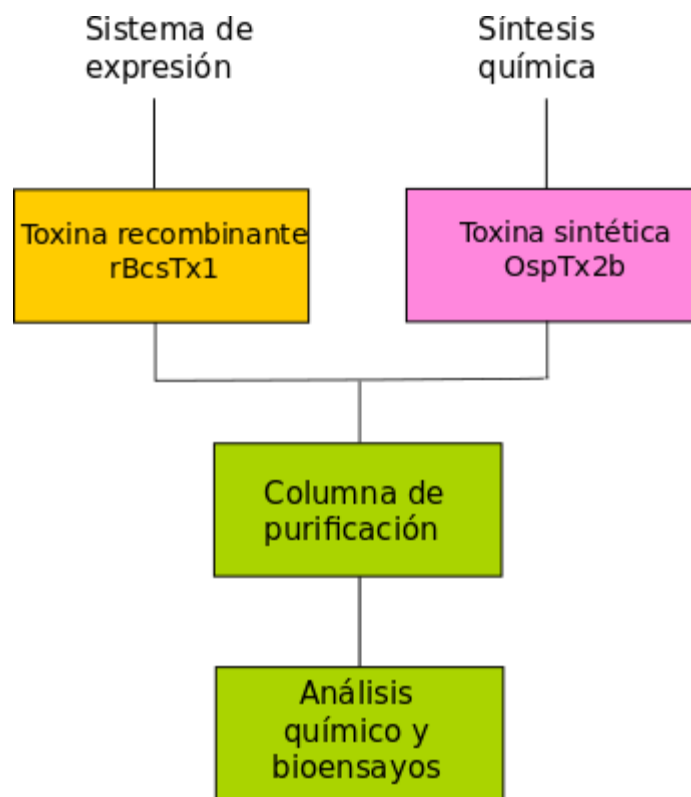


Fig. 18 Diagrama de flujo de metodología, modificado de Vetter (2015)<sup>82</sup>

## 6.1 Producción del péptido OspTx2b

### 6.1.1 Síntesis de los péptidos OspTx2b y OspTx2a

OspTx2a fue la toxina con la que se empezó a trabajar en el laboratorio de Monash Institute of Pharmaceutical Science (MIPS), se realizó la síntesis por fragmentos de esta toxina, sin embargo, al tratar de unir los fragmentos, se pudo apreciar que las masas moleculares de los productos mayoritarios no coincidían y se realizaron algunas modificaciones al método sin cambios significativos en los resultados.

Al mismo tiempo la compañía Peptide Internacional, sintetizó OspTx2b, la cual, se obtuvo en grandes cantidades (63 mg) y con pureza del 98%. Por esta razón se comenzó a trabajar con OspTx2b. Un mes después se obtuvo OpsTx2a, mediante síntesis química. La síntesis de OspTx2a dio como resultado dos conformaciones mayoritarias OspTx2a pico 1 y OspTx2a pico 2. Con los cuales se empezaron a trabajar y a sacar algunos experimentos en RMN. Estos resultados, no son mostrados en el presente trabajo.

Enseguida se muestra el alineamiento de OspTx2a y OspTx2b:

```
OspTx2a  ACKDVFPAAT  CRHAKSVGNC  SSEKYKRNCA  ITCGAC  
OspTx2b  ACKDNLPAAT  CSNVKANNNC  SSEKYKTNCA  KTCGEC
```

OspTx2b fue sintetizada químicamente, la metodología utilizada se describe a continuación (Figura 19):

- 1) El último aminoácido de la secuencia en éste caso C36 es acoplado a la resina Fmoc.
- 2) El  $\alpha$ -amino del residuo anterior (C36) es desprotegido y posteriormente el grupo carboxilo del residuo siguiente (E35) es acoplado al  $\alpha$ -amino de C36.

- 3) El paso 2) es repetido hasta llegar al aminoácido inicial, en este caso A1. En cada acoplamiento una pequeña alícuota es desprotegida para corroborar que la síntesis sea correcta, por medio de espectrometría de Masas.
- 4) Una vez completada la síntesis se procede a la escisión de la resina y posteriormente a la desprotección de los grupos protectores de cada aminoácido.
- 5) El producto de la reacción es purificado en un equipo de HPLC con una columna C18 y posteriormente una alícuota es evaluada en un espectro de masas.

### *6.1.2 Espectrometría de masas del péptido OspTx2b*

Se diluyó 0.2 mg de OspTx2b en 20  $\mu$ L de 0.1 % TFA en agua. El blanco fue 0.1% TFA en agua y se aplicó en un equipo de cromatografía líquida acoplada a masas (Shimadzu 2020 LC-Mass).

## 6. METODOLOGÍA

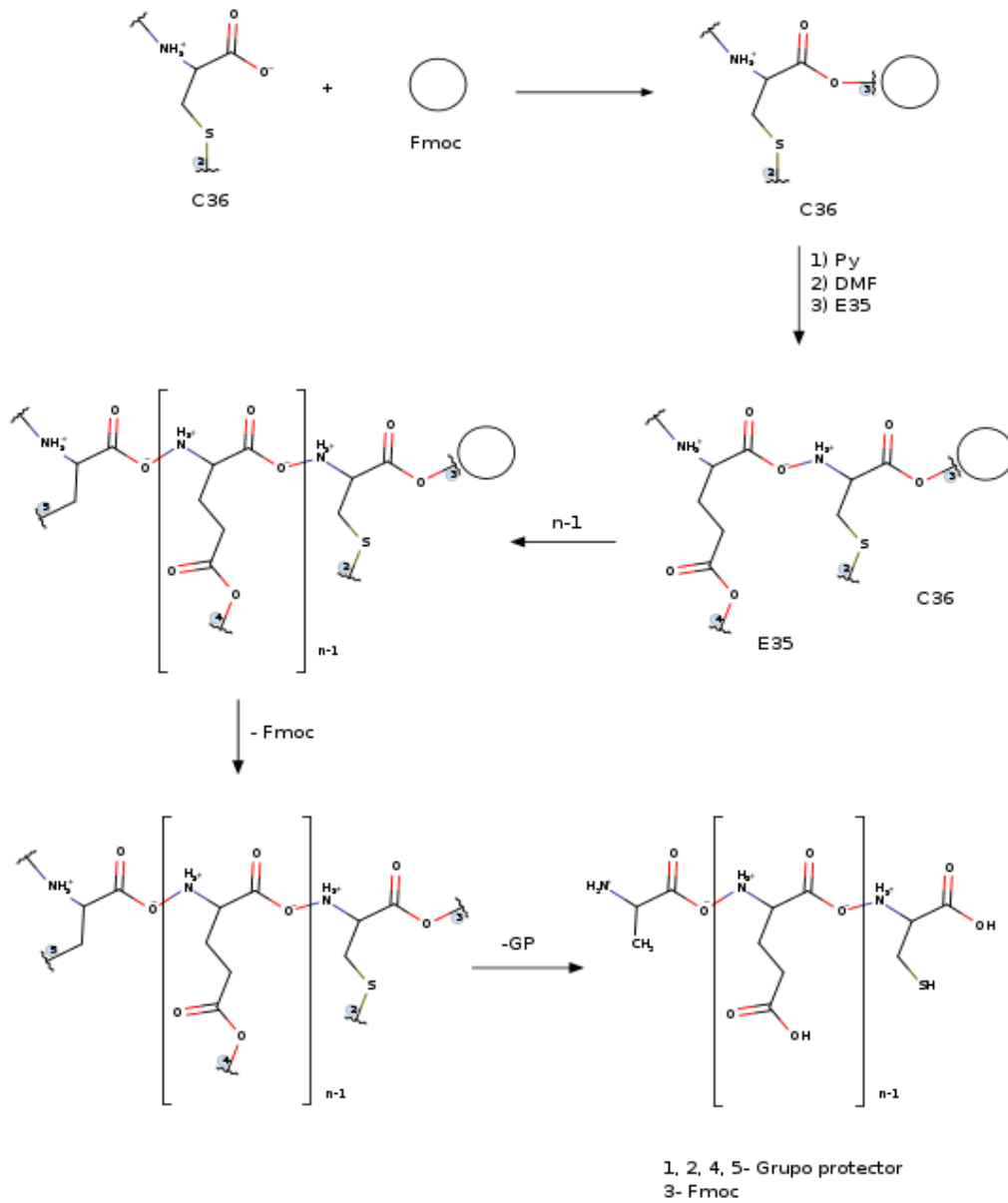


Fig. 19 Esquema de síntesis química en fase sólida de péptidos de OspTx2b.

### 6.1.3 Experimentos de RMN del péptido OspTx2b

Para evaluar las condiciones óptimas, se realizaron experimentos de RMN a diferentes pH (2.0, 3.0, 3.8, 4.0, 5.0, 6.0 y 7.2) y con diferentes temperaturas (10 y 20°C). Asimismo, se evaluaron dos concentraciones de OspTx2b (0.25 mM y 1 mM).

Se prepararon cuatro muestras de OspTx2b: la primera de ellas a 1 mM de OspTx2b disuelta en 100% de  $^2\text{H}_2\text{O}$  a pH 3.8. La segunda muestra de 1 mM con 5% de  $^2\text{H}_2\text{O}$ , y 0.01  $\text{NaN}_3$  a pH 3.8 con la que se realizó la mayoría de experimentos. La tercera muestra fue 0.25 mM con 5% de  $^2\text{H}_2\text{O}$ , y 0.01  $\text{NaN}_3$  a pH 3.8, esta muestra se utilizó para comparar las señales en diferentes concentraciones y posteriormente, a ésta última se adicionó 2% de dioxano para calibrar los espectros obtenidos, siendo la cuarta muestra.

Los experimentos fueron realizados en un equipo Bruker Avance III de 600 MHz en el laboratorio de Bioquímica del Profesor Raymond S. Norton en MIPS, Melbourne, Australia, a continuación, se enlistan los experimentos que se realizaron.

#### Experimentos 1D:

- ✓ Titulación de pH (de 3 a 7) en  $\text{H}_2\text{O}$
- ✓ Variación de temperatura (283 y 293 K)
- ✓ 20 mM Buffer de fosfatos a pH 5.0
- ✓ 20 mM Buffer de fosfatos a pH 3.8

#### Experimentos 2D a pH 5.0:

- ✓ 2D TOCSY, tiempo de mezclado de 80 ms and 40 ms
- ✓ 2D TOCSY, tiempo de mezclado de 70 ms temperaturas (10 y 20°C)
- ✓ 2D NOESY, tiempo de mezclado de 150 ms y 250 ms (10 y 20°C)
- ✓ DQF-COSY y NOESY en  $\text{D}_2\text{O}$



Experimentos 2D a pH 3.8:

- ✓ 2D TOCSY tiempo de mezclado de 70 ms y 100 ms (10 y 20 °C)
- ✓ 2D NOESY tiempo de mezclado de 150 ms y 250 ms (10 y 20°C)
- ✓ DQF- COSY y NOESY en D<sub>2</sub>O
- ✓ <sup>15</sup>N-HSQC
- ✓ <sup>13</sup>C-HSQC

Los espectros TOCSY y NOESY fueron adquiridos a diferentes tiempos de mezclados para tener datos con tiempos cortos y tiempos largos. Los datos fueron procesados con el programa Topsin de Bruker. Mientras que Ccpnmr Analysis 2.4 fue el programa que se utilizó para la asignación de los sistemas de espín de cada residuo.

### 6.1.4 Cálculo de estructura del péptido *OspTx2b*

Las asignaciones de los sistemas de espín y secuencial, se realizaron siguiendo la estrategia de Wagner y Wüthrich<sup>83</sup>. Los sistemas de espín fueron identificados con los experimentos DQF-COSY y TOCSY. Mientras que con los espectros NOESY en pH 5.0 y posteriormente pH 3.8 se llevó a cabo la asignación secuencial, mediante el análisis de las correlaciones HN-HN, HN-H $\alpha$  y HN-H $\beta$ .

Una vez obtenida la asignación secuencial, se asignaron las señales de NOE vecinales y las producidas por interacciones a larga distancia. De esta manera, se obtuvo información estructural. Teniendo en cuenta que la intensidad del NOE es inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia entre los dos núcleos que generan esta señal se obtuvieron distancias.

El cálculo de estructura terciaria se realizó utilizando el programa CYANA, empleando la lista de desplazamientos químicos establecida (la asignación fue del 100%). Además de la

lista de los puntos de cruce integrados del espectro 2D H-H NOESY (distancias), se utilizaron restricciones de distancia entre los átomos de azufre que se encuentran formando enlaces disulfuro, y las mediciones de los acoplamientos J fueron utilizados para obtener restricciones de los ángulos de torsión<sup>62</sup>.

### 6.2 Producción de péptido rBcsTx1

Durante el curso de esta investigación, además de trabajar con OspTx2b, se trabajó con rBcsTx1. Y aunque no se concluyó con este trabajo, se presentan los resultados obtenidos.

El primer paso fue la búsqueda de una secuencia de aminoácidos que perteneciera a una toxina de anémona, la cual hubiera sido caracterizada biológicamente, para poder comparar la función de la toxina nativa con la obtenida recombinantemente. La secuencia de aminoácidos elegida fue BcsTx1 extraída de NCBI es ACIDRFPTGTCKHVKKGGSC KNSQKYRINC AKTCGLCH.

El segundo paso fue el diseño del vector. Con la finalidad de facilitar su expresión, se utilizó el plásmido pET32a, debido a que posee una etiqueta (tag) de Tiorredoxina que facilita la formación de enlaces disulfuro, además de poseer otra etiqueta de Histidina la cual ayuda a llevar a cabo la purificación.

Secuencia de la proteína de fusión:

MSDKIIHLTDDSFDTDLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQN  
PGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGHMH~~HHHHH~~SSGL  
VPRGSGMKETA~~AAK~~FERQHMDSPDLGTDDDDKAMADIGSEF**ACIDRFPTGTCKHVKKGGS**  
**CKNSQKYRINCAKTCGLCH**

Peso Molecular de la proteína de fusión: **22 137.10 Da.**

Secuencia del inserto:

**AMADIGSEF-ACIDRFPTGTCKHVKKGGSCCKNSQKYRINCAKTCGLCH**

Peso Molecular del inserto: **5 079.89 Da.**

Se probaron diferentes cepas de *E. coli* con el fin de encontrar las condiciones óptimas para realizar el proceso de transformación del plásmido rBcsTx1, debido a que esta toxina se trabaja por primera vez en este vector y no está reportada su clonación ni expresión. La Tabla 6 muestra las cepas utilizadas, así como las características específicas de cada una.

Tabla 6 Características de las diferentes cepas utilizadas para la producción de r-BcsTx1.

CEPA	CARACTERÍSTICAS
Rosseta 2	Optimiza la expresión en codones poco comunes.
BL21 (DE3)	Es la más utilizada debido al alto porcentaje de inducción.
Origami	Ayuda a la formación de enlaces disulfuro

### 6.2.1 Expresión del plásmido pET32a-BcsTx1

Una vez obtenidas colonias en la caja de Petri, se dejaron crecer los cultivos incubándolos con ampicilina 200 rmp a 37°C por 6 h. Una vez alcanzado la OD<sub>600</sub> de 0.8-0.9, se agregó 1 mM de IPTG y se dejó incubar por 6 h a 25°C debido a que se observó una mejor expresión a esas condiciones.

#### 6.2.1.1 Rompimiento de pared celular del plásmido pET32a-BcsTx1

Realizada la expresión se centrifugó el medio a 4000 rmp por 40 min, el pellet fue resuspendido en 15 mL de Buffer 20 mM Fosfato de Sodio, 0.5 M NaCl, 30 mM Imidazol pH 7.4 y se agregó 5 mg de lisozima, debilitando así la pared celular. Una vez resuspendido el pellet, se sonicó por 12 ciclos 10 s con descansos de 20 s produciendo la lisis de las células.

Cuando la solución se tornó viscosa, se centrifugó a 15 000 rpm por 30 min a 4°C, el sobrenadante fue filtrado (0.20 µm) y posteriormente se aplicó al equipo de purificación. Se

tomó una muestra del pellet para observar si la proteína se encontraba en cuerpos de inclusión en geles de SDS-PAGE y comprobar que el rompimiento de células fuera efectivo.

### *6.2.2 Purificación de la proteína de fusión Trx-r-BcsTx1*

Debido a que la proteína de fusión posee una etiqueta de Histidina, se decidió realizar como primer paso una purificación por afinidad, con una columna de Ni-HisTrap, a continuación se muestran las condiciones en las que se llevó a cabo la cromatografía (ver Anexos).

Columna Ni<sup>2+</sup>- NTA GE (5 mL)

Equipo FPLC GE. Flujo 1.0 mL/min

Buffer de equilibrio 20 mM Fosfato de Sodio, 0.5 M NaCl, 20 mM Imidazol pH 7.4

Buffer de elución 20 mM Fosfato de Sodio, 0.5 M NaCl, 500 mM Imidazol pH 7.4

Una vez que se realizó la purificación, se concentró la fracción de interés con concentradores de corte 5 kDa, hasta obtener un volumen de 1.5 mL.

### *6.2.3 Cuantificación por espectrometría UV*

Por medio del programa <http://protcalc.sourceforge.net/> se obtuvo el coeficiente de extinción de la toxina recombinante  $\epsilon = 0.7082$  mol/L, por lo que se calculó la concentración de toxina por UV, de acuerdo a la Ley de Lambert y Beer.

### *6.2.4 Corte con enteroquinasa de la proteína de fusión Trx-r-BcsTx1*

Una vez calculada la concentración de toxina, se hizo reaccionar con 1.5 unidades de enteroquinasa de porcino por 72 h a 4°C, posteriormente se realizaron geles de acrilamida SDS-PAGE para asegurar el corte de la toxina.

### 6.2.5 Gel de acrilamida SDS-PAGE 15 y 18%

Se realizaron geles de acrilamida/bis al 15 y al 18%, según el método de Laemmli (1970) y fueron teñidos con Comassie (ver Anexo 2), con el fin de observar los pesos moleculares de las fracciones obtenidas.

### 6.2.6 Inoculación de medio mínimo M9 del péptido r-BcsTx1

Cuando las condiciones óptimas en medio rico LB fueron encontradas, se empezó la inoculación en medio mínimo (este medio es marcado con  $^{13}\text{C}$ -glucosa y  $^{15}\text{N}$ -cloruro de amonio). Debido a que se observó baja cantidad de proteína obtenida se cambió la metodología. Se inoculó desde un inicio en medio M9 y se probaron otras cepas como Rosetta y Origami, para evaluar la mejora de la expresión.

Posteriormente se llevó a cabo la purificación de la proteína. Solamente se utilizó la columna de afinidad debido a que se observó la pérdida de péptido al llevar a cabo la purificación en la columna de exclusión molecular.

### 6.2.7 Experimentos de RMN del péptido r-BcsTx1

La muestra denominada r-BcsTx1sm, representa la toxina r-BcTx1 sin marcar, la concentración de dicha muestra fue de 5 mM. Se tomaron 500 mL de muestra y se realizó el experimento de 1H, TOCSY y NOESY en un equipo de 700 MHz.

### 6.2.8 Pruebas en canales iónicos de potasio del péptido r-BcsTx1

En un trabajo en colaboración con el Dr. Emilio Salceda y Dr. Enrique Soto de la UABP, se entregó 28 mg de r-BcsTx1sm para realizar estudios sobre canales iónicos.

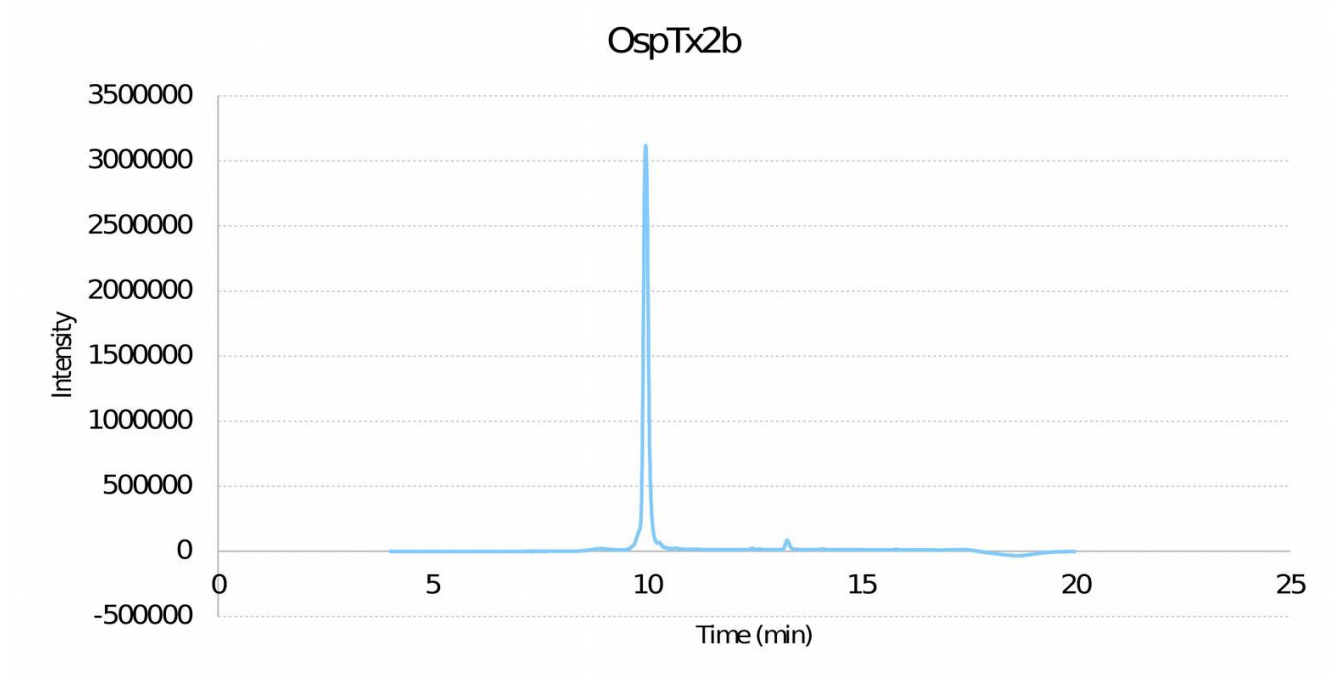
## 7. RESULTADOS

### 7.1 Resultados del péptido OspTx2b

#### 7.1.1 Espectrometría de masas del péptido OspTx2b

Se obtuvieron cerca de 100 mg de OspTx2b, de los cuales 34 mg fueron enviados para pruebas electrofisiológicas en canales de potasio. El aspecto de OspTx2b fue un sólido de color blanco de textura muy fina.

Para corroborar la presencia de OspTx2b después de la purificación, se determinó la masa molecular por medio de un equipo Mass-LC Shimadzu. Se utilizaron 2  $\mu$ L de OspTx2b a 1 M para el análisis. En el cromatograma 1 se puede observar un sólo pico de OspTx2b, por lo que el porcentaje de contaminantes es mínimo.



Cromatograma 1 de OspTx2b sintetizada químicamente por PEPTIDES International, en el cromatograma se observa un solo pico mayoritario.

## 7. RESULTADOS

Por otro lado, el espectro de masas obtenido se observa en la Figura 20, en el cual se observan los fragmentos de las masas moleculares observadas (3781.25 m/z) que coinciden con las masas moleculares esperadas (3780.3 m/z). Por lo que se concluyó que la síntesis se realizó de manera correcta.

Tabla 7 Fragmento de masa molecular esperadas y observadas de OspTx2b

CARGA	ESPERADA	OBSERVADA
MASA MOLECULAR	3780.3	3871.25
M+2	1889.6	1891.3
M+3	1259.4	1261.1
M+4	944.3	946.2
M+5	755.3	757.2

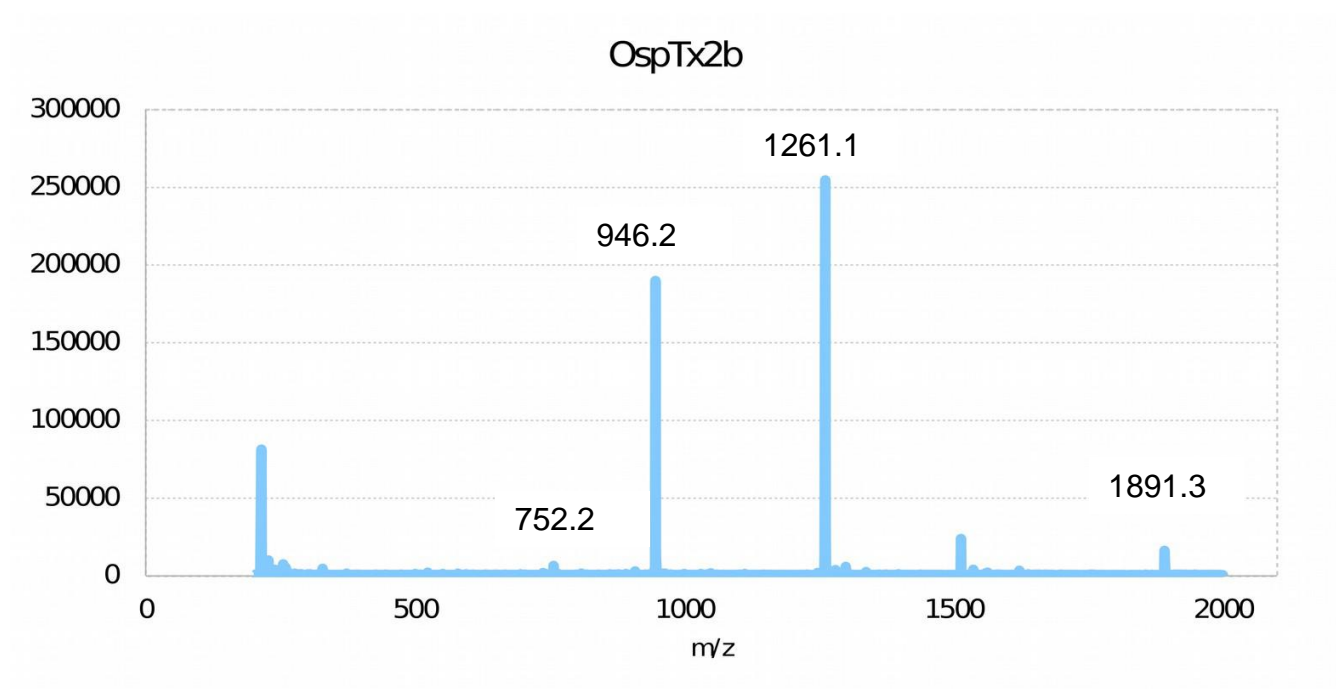


Fig. 20 Espectro de masas de OspTx2b. Las masas obtenidas en el espectro, corresponden con las masas moleculares esperadas

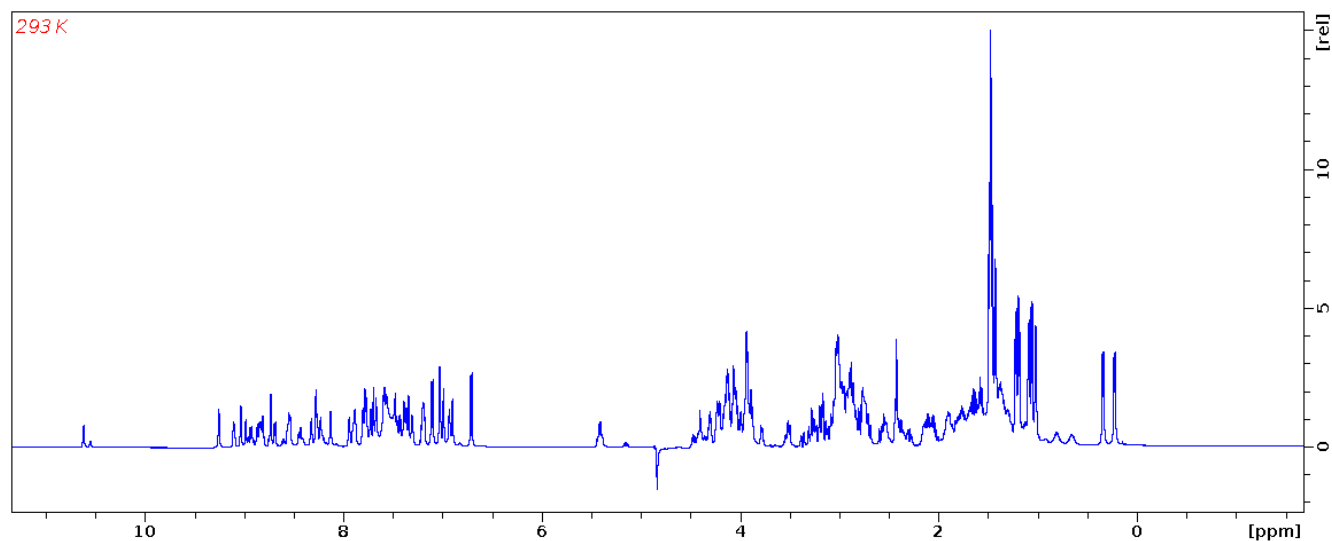


## 7.1.2 Resultados de RMN del péptido OspTx2b

En la Figura 21 se muestra el espectro en 1D de OspTx2b, en el cual se puede observar que el péptido OspTx2b está plegado debido a que las señales en la región de NH se encuentran bien definidas. Las condiciones en las que fue tomado el experimento se describen en la Tabla 8.

Tabla 8 Parámetros de OspTx2b para RMN.

PARÁMETROS	VALORES
Concentración	250 $\mu$ M
Disolvente	H <sub>2</sub> O
pH	6.0
D <sub>2</sub> O	5%
Temperatura	20°C

Fig. 21 Espectro de <sup>1</sup>H de OspTx2b (1mM) a 25°C, pH 5.9.

Se tomaron varios experimentos con diferentes parámetros (pH, temperaturas y concentraciones) con el fin de optimizar las condiciones para obtener mejores espectros de dos dimensiones, en la Figura 22 y Figura 23 se muestran los resultados de las titulaciones.

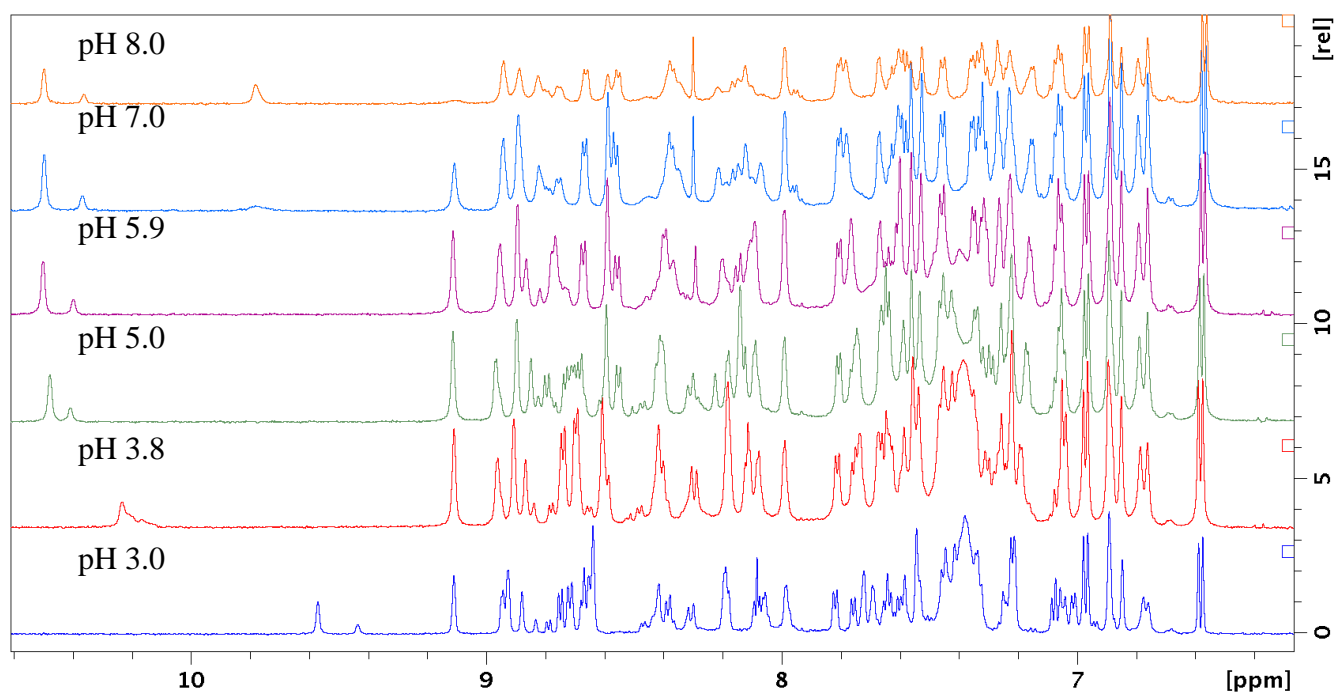


Fig. 22 Espectro de RMN <sup>1</sup>H de la titulación ácido-base de OspTx2b. OspTx2b (1 mM) fue diluida en H<sub>2</sub>O (5% de <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O) a 25°C: La titulación se realizó con pH desde 3.0 hasta 8.0. se observa el cambio de los desplazamientos químicos en la región del NH.

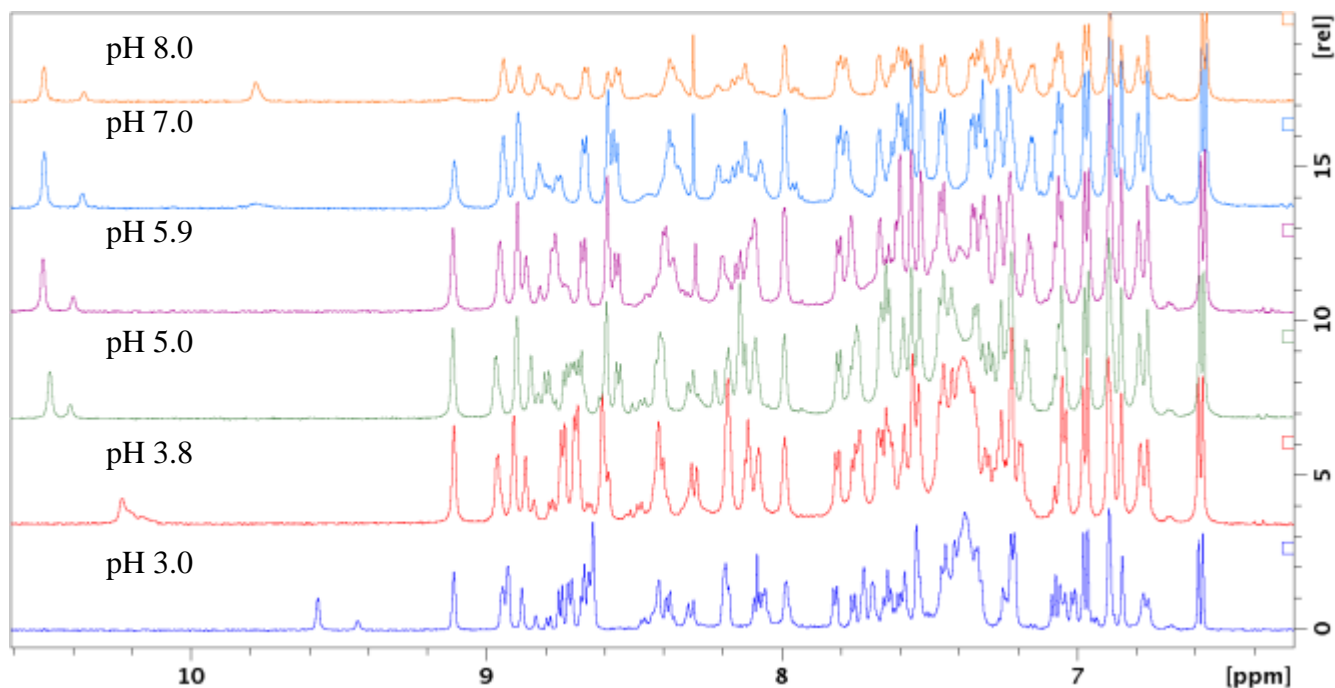


Fig. 23 Espectro de RMN <sup>1</sup>H de la titulación ácido-base OspTx2b (región NH) en los cuales se pueden observar cambios en los desplazamientos químicos de acuerdo a la variación del pH. Condiciones de OspTx2b: 1 mM, 25°C, disuelto en H<sub>2</sub>O (5% <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O).

## 7. RESULTADOS

---

El espectro seleccionado para realizar la asignación de señales fue de pH 5.0, sin embargo, debido a que algunos aminoácidos mostraban traslapamiento de señales, se tomaron experimentos a diferentes pH, siendo pH 3.8 en el que se podían identificar mejor las señales anteriormente traslapadas y de esta manera completar la asignación.

Por otra parte, se realizaron experimentos en dos diferentes temperaturas 283 y 293 K, para tratar de mejorar el espectro, especialmente las señales de los aminoácidos Leu 6 y Lys 31, así como Lys 15, Gly 34 y Cys 36 que mostraban traslapamiento. Algunas señales mejoraron al bajar la temperatura, sin embargo, otras áreas mostraban pérdida de señal. Con lo cual se decidió trabajar con 283 K.

La asignación de los residuos (sistema de espines) específicos fue obtenida de los experimentos en 2D DQF-COSY y TOCSY<sup>83</sup>. Mientras que la asignación secuencial fue obtenida con el espectro 2D NOESY. Por otra parte, los ángulos diedros fueron obtenidos de los valores de los acoplamientos escalares ( $^3\text{JHN-H}\alpha$ ), y las restricciones de distancias fueron obtenidas de las intensidades de las señales de NOE. Para el cálculo de la estructura se utilizó el programa CYANA<sup>82</sup>, y posteriormente XPLOR<sup>83</sup>. Se realizaron experimentos de TOCSY con la muestra en 100%  $2\text{H}_2\text{O}$ , con el fin de predecir las amidas involucradas en puentes de hidrógeno.

Los experimentos de dos dimensiones mostraron señales que pertenecían a una segunda conformación, esto se observó para residuo del Cys 29 al Glu 35; estas múltiples conformaciones complicaron la asignación de señales de NOE principalmente.

En la Figura 24 se muestra un espectro traslapando las señales de TOCSY y NOESY en la región de "finger print" (comprende la región HN y H $\alpha$ ), en donde se puede observar que la Thr 32 tiene dos conformaciones, una mayoritaria la cual concuerda con toda la asignación secuencial y otra minoritaria (señalada en la figura 3.5) en la cual la asignación secuencial comienza a partir del aminoácido 29 hasta el 35.

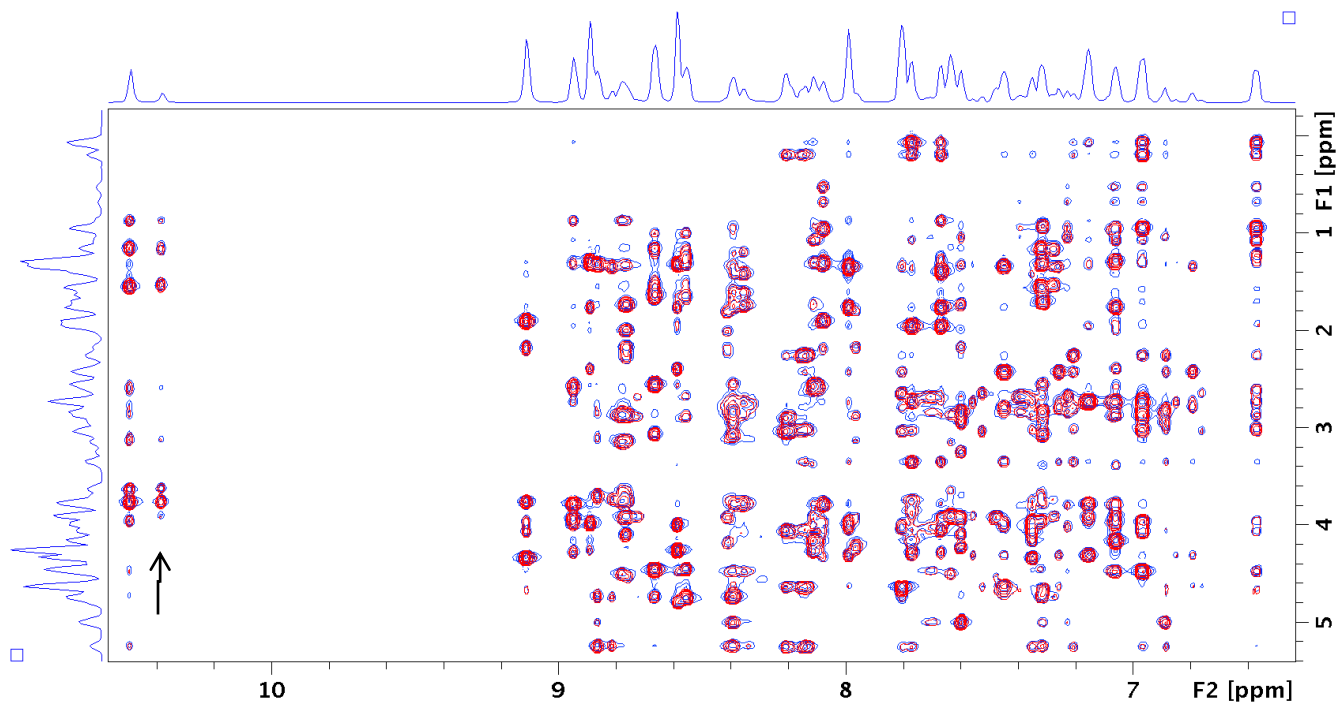


Fig. 24 Espectro TOCSY (azul) y NOESY (rojo) de OspTx2b, en el que se pueden observar las distintas conformaciones, principalmente en el T32 señalado.

En la Tabla 9 se muestra la asignación de las señales correspondientes a la conformación mayoritaria y en la Tabla 10, se muestran la asignación de la conformación minoritaria.

Tabla 9. Desplazamientos Químicos de OspTx2b

<b>DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS (ppm)</b>						
<b>RESIDUO</b>	<b>NH</b>	<b>H<math>\alpha</math></b>	<b>H<math>\beta</math></b>	<b>H<math>\gamma</math></b>	<b>H<math>\delta</math></b>	<b>H<math>\epsilon</math></b>
A1	-	3.93	1.34			
C2	8.74	4.73	2.70, 2.90			
K3	8.55	4.47	1.64	1.01	1.24	2.90
D4	8.68	4.73	3.08, 2.57			
N5	8.42	4.7	2.96, 2.84		6.89, 7.59	
L6	8.14	3.80	1.33	0.95	0.52, 0.67	
P7	-	4.27	2.41, 2.56	1.99	3.40, 3.80	
A8	8.59	4.01	1.32			
A9	8.90	4.00	1.30			
T10	7.07	3.91	4.17	1.08		
C11	8.11	4.28	2.60			
S12	8.95	3.93	3.79			
N13	7.17	4.32	2.74		7.55, 6.86	
V14	7.75	3.37	1.97	0.20, 0.09		
K15	7.67	4.06	1.77, 1.42	1.26		
A16	7.99	3.99	1.35			
N17	7.45	4.63	2.80, 2.44		7.25, 6.79	
N18	7.80	4.62	3.05, 2.65		6.76, 7.53	
N19	8.13	2.26, 3.02	3.03, 2.27		7.20, 6.97	
C20	8.18	4.08	2.86, 3.04			
S21	7.76	4.17	3.86, 3.75			
S22	7.34	4.35	4.08, 3.98			
E23	9.12	3.80	1.95	2.29		
K24	7.29	4.67	1.69, 1.57	0.94	1.32	
Y25	7.05	4.49	2.75, 2.87		6.97	6.57
K26	8.40	3.82	1.76, 1.63	1.62	1.37	
T27	7.63	4.02	4.10	1.05		
N28	7.63	5.01	2.87, 2.70		6.89, 7.23	
C29	8.30	5.28	3.15, 2.76			
A30	8.84	3.76	1.33			
K31	7.33	3.97	1.57	1.34	1.17	2.82
T32	10.48	3.65	3.77	0.89		
C33	8.70	4.50	3.14, 2.88			
G34	7.65	3.92, 3.92				
E35	8.80	4.22	1.75, 2.22	2.40, 2.40		
C36	7.61	4.26	3.23			

Tabla 10 Desplazamientos Químicos de OspTx2b conformación minoritaria

DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS (ppm)				
RESIDUO	NH	H $\alpha$	H $\beta$	H $\gamma$
C29	8.77	4.82	2.93, 2.69	
A30	8.61	4.5	1.6	
K31	7.26	3.91	1.54	1.19
T32	10.41	3.64	3.77	
C33	8.07	4.25	3.15, 2.91	
G34	7.52	3.91		
E35	8.47	4.27	1.85	

En la Figura 25, se muestra el espectro NOESY en el área de HN de la amida. Las señales a corta distancia entre los protones de HN<sub>i</sub> y HN<sub>i+1</sub> de la cadena principal, que presenta el espectro son características de las conformaciones de alfa hélice.

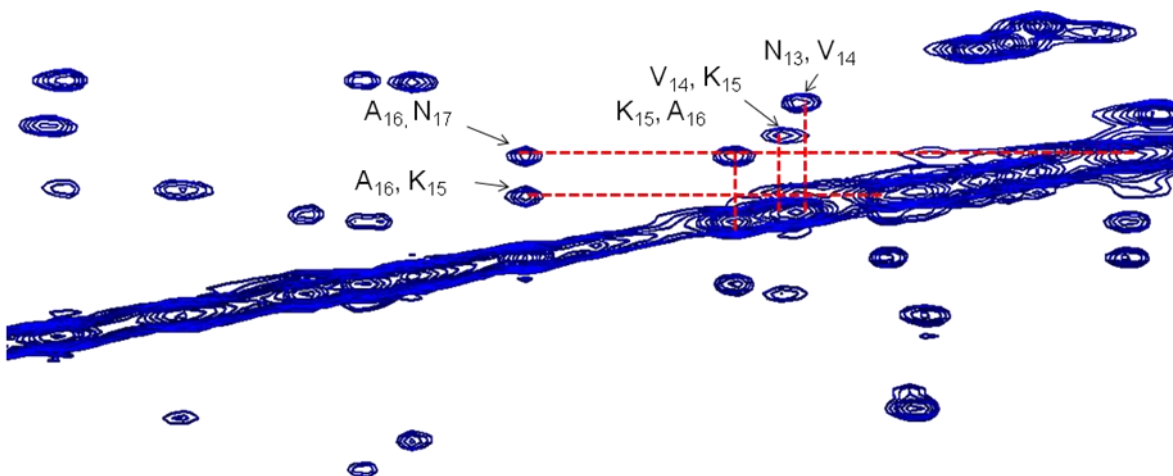


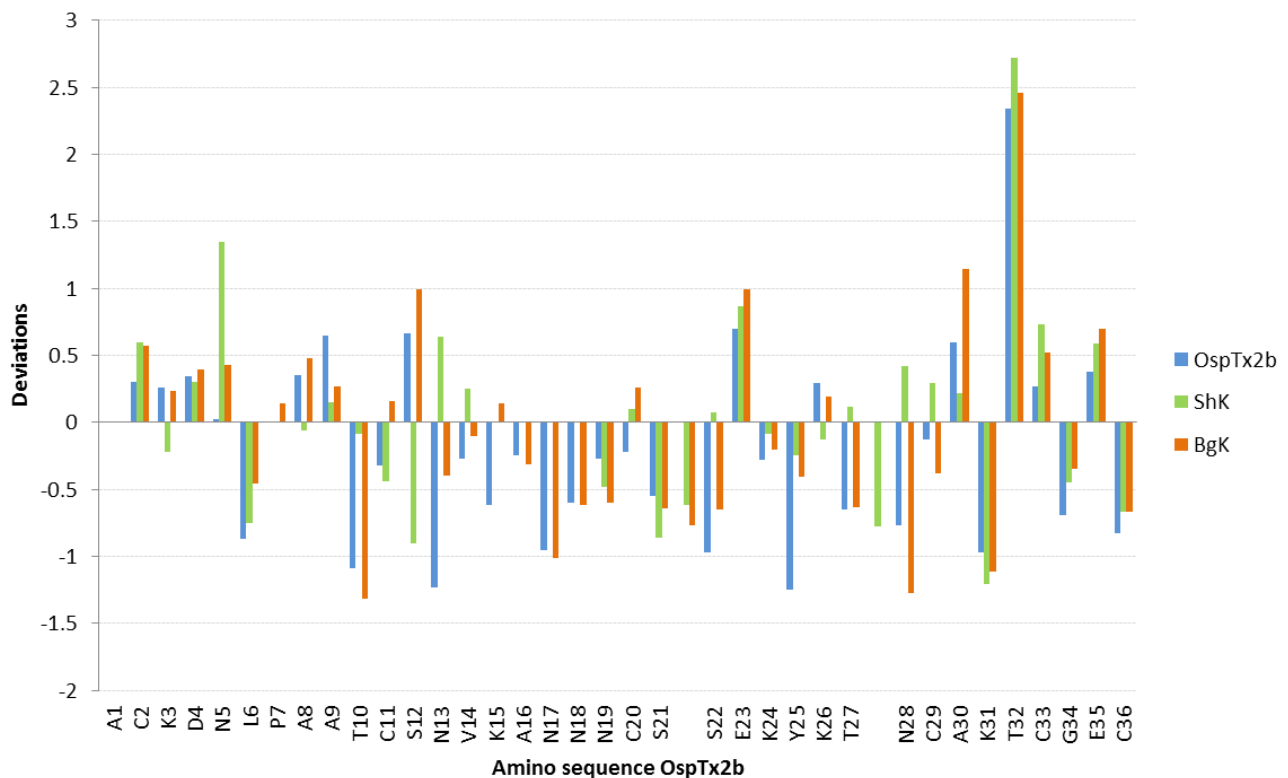
Fig. 25 Espectro 2D NOESY de OspTx2b, región HN amida.

Se puede observar en las Figuras 26 y 27, la comparación de los desplazamientos químicos de la región denominada "finger print" (región HN y H $\alpha$ , respectivamente), de OspTx2b, ShK y BgK. Esta región es importante para la determinación de la estructura secundaria debido que en la región HN, es donde se observan las interacciones de los enlaces hidrógenos, estos a su vez tienden a ser de muy corto alcance y altamente

## 7. RESULTADOS

direccional, por lo que pequeños cambios de desplazamientos químicos en HN, seguidos de H $\alpha$ , pueden tener grandes efectos en la estructura calculada<sup>85,86</sup>.

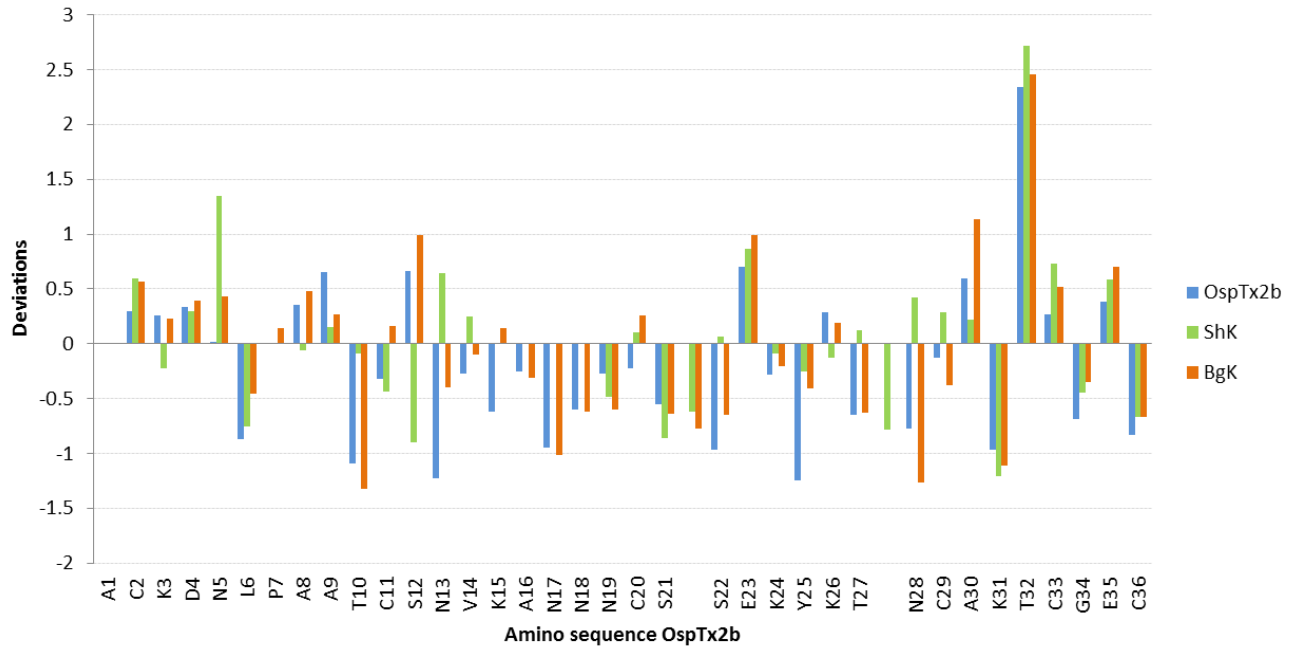
Las desviaciones se obtuvieron haciendo una sustracción del valor de los desplazamientos químicos reportados de la conformación desplegada<sup>86</sup> con respecto a los desplazamientos obtenidos experimentalmente en los péptidos plegados.



OspTx2b A**C**KDNLPAAT C**S**NVKANN**N**C S-SEKYKT-N**C**A K**T**C**G**E**C**  
 ShK R**S**CIDTIPK**S**R C**T**A**F**----**Q**C KHSMKYRL**S**F**C** R**K**T**C**G**T**C  
 BgK -**V**C**R**D**W**F**K**E**T**A C**R**H**A**K**S**L**G****N**C R**T**S**Q**K**Y**R**A**-**N**C A**K**T**C**E**L**C

Fig. 26 Comparación de los valores del desplazamiento químicos en la región NH de las toxinas OspTx2b, ShK y BgK con respecto a los valores obtenidos de las proteínas desplegadas

Al comparar las desviaciones de H $\alpha$ , se muestra una tendencia muy similar al caso anterior, por lo que esto nos da una idea de que la estructura secundaria de OspTx2b es muy similar a ShK y BgK.



OspTx2b A C K D N L P A A T C S N V K A N N N C S - S E K Y K T - N C A K T C G E C  
 ShK R S C I D T I P K S R C T A F - - - - Q C K H S M K Y R L S F C R K T C G T C  
 BgK - V C R D W F K E T A C R H A K S L G N C R T S Q K Y R A - N C A K T C E L C

Fig. 27 Comparación de los valores del desplazamiento químicos en la región H $\alpha$  de las toxinas OspTx2b, ShK y BgK con respecto a los valores obtenidos de las proteínas desplegadas

### 7.1.3 Cálculo de estructura del péptido OspTx2b

En la Figura 28 se observan las veinte mejores estructuras de OspTx2b de acuerdo a sus energías, las cuales fueron resultado del procesamiento y el refinamiento de los datos adquiridos por RMN<sup>87</sup>.



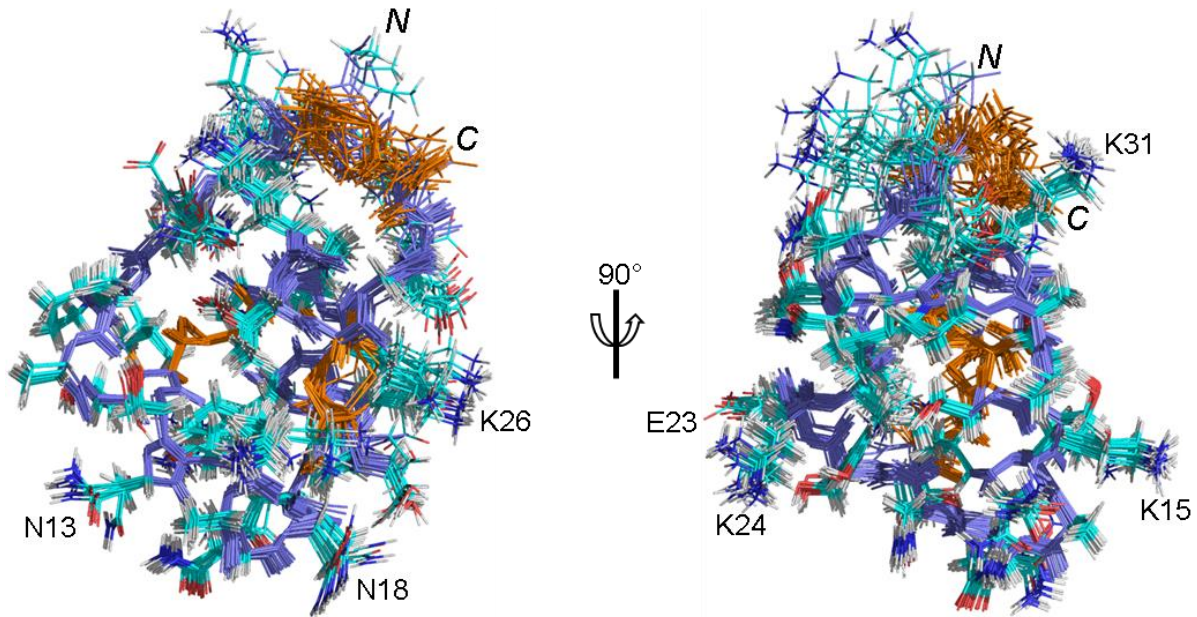


Fig. 28 Veinte mejores estructuras basada en las menores energías de OspTx2b (PDB id: 6BUC).

La estructura tridimensional determinada por RMN de OspTx2b consta de dos hélices alfa que van desde Ala 8 al Ala 16, y la segunda hélice se forma de Ala 30 a Cys 33. Las señales de corto alcance de NOE en la región HN, confirman la presencia de estas hélices alfa (Figura 29). Los enlaces disulfuro que forman Cys 2 y Cys 36 generan que el N y C-terminal se encuentren cerca. Por otra parte, las hélices se mantienen cercanas, debido al enlace formado por la Cys 11 y Cys 29.

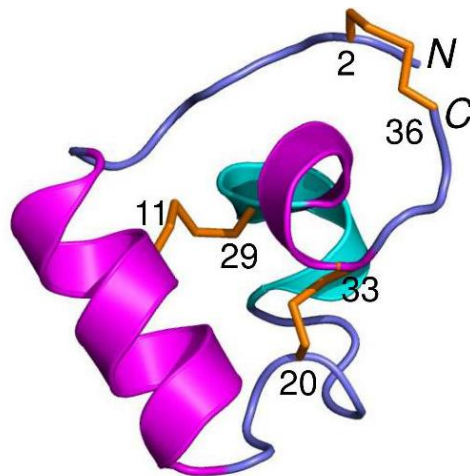


Fig. 29 Estructura de OspTx2b en base a los experimentos de RMN. En color magenta se observan las alfa hélices (8-16, 30-33), en naranja los enlaces disulfuro y en cyan los giros helicoidales (25-29).

## 7.2 Resultados del péptido r-BcsTx1

La toxina BcsTx1, tiene 37 aminoácidos y tres enlaces disulfuro. Orts en 2013 mostró que esta toxina tiene una alta afinidad por los canales rKv1.2, rKv1.6, hKv1.3 Shaker IR y rKv1.1. Se reportó también la primera caracterización de una fracción neurotóxica, proveniente del veneno de *Bunodosoma caissarum*, el estudio se realizó comparando dos poblaciones provenientes de diferentes zonas geográficas de Brasil.

En la Tabla 11, se observan las características de la toxina BcsTx1, cuya secuencia de aminoácidos es la siguiente:

AMADIGSEF-ACIDRFPTGTCKHVKKGGSCCKNSQKYRINCAKTCGLCH

Tabla 11. Características de la proteína de fusión pET-32a-BcsTx1

Características BcsTx1	Valor
Número de aminoácidos	205
pI	6.9
Fórmula	C <sub>963</sub> H <sub>1520</sub> N <sub>274</sub> O <sub>297</sub> S <sub>14</sub>
Total de átomos	3068
Peso molecular	2 2137.1
Peso molecular oxidado	2 2131.1
Coeficiente de extinción molar a 280 nm (mg/mL)	
Cisteínas reducidas	0.7
Cisteínas aparedas	0.7

## 7.2.1 Plásmido pGS- 21a- BcsTx1

El primer plásmido construido fue pGS-21a-BcsTx1 por la compañía GenScrip, este plásmido tenía la particularidad de tener una etiqueta de Glutación S-Transferasa, esta etiqueta ayuda a la formación de enlaces disulfuro. No obstante, se observó un bajo rendimiento en la expresión (Figura 30) y en la purificación, a pesar de que se probaron distintas de temperaturas de inducción (25 y 37°C) así como, diferentes concentraciones de IPTG (0.2, 0.5, 0.8 y 1 mM), por lo cual, se decidió cambiar el inserto al vector a pET-32a-BcsTx1, que también fue construido por GenScrip, esto con la intención de mejorar la expresión y purificación.

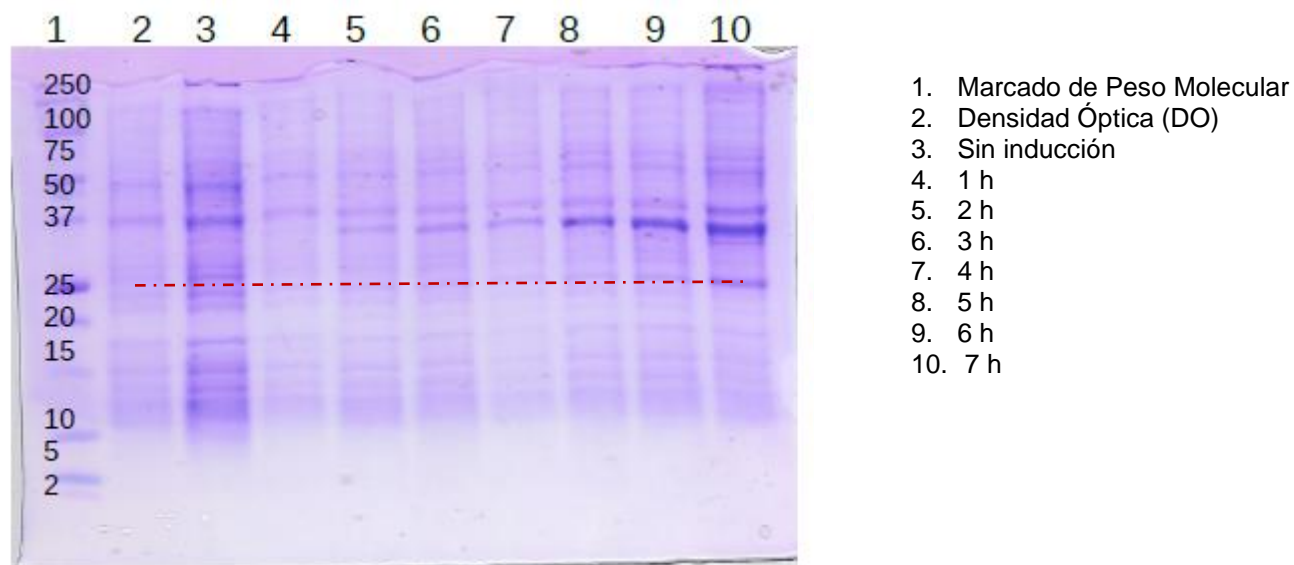


Fig. 30 Cinética de expresión de pGS- 21a- BcsTx1 en Rosetta (la línea roja representa la línea de banda esperada aproximadamente 22 kDa).

Por otra parte, el plásmido que se diseñó fue en el vector pET-32a (Novagen). Este vector tiene la característica de poseer una etiqueta de Tiorredoxina.

En la siguiente Figura 31 se observa la secuencia de la proteína de fusión, de color rosa se observa la secuencia de Tiorredoxina (Trx), de color amarillo, la etiqueta de Histidina, color lila, el sitio de corte de Enteroquinasa y de color verde la secuencia de la toxina BcsTx1.

```

    10      20      30      40      50      60
MSDKIIHLTD DSFDTDVLKA DGAILVDFWA EWCGPCKMIA PILDEIADEY QGKLTVAKLN
    70      80      90     100     110     120
IDQNPGTAPK YGIRGIPTLL LFKNGEVAAT KVGALSKGQL KEFLDANLAG SSGGHMHHHH
    130     140     150     160     170     180
HHSSGLVPRG SGMKETAALK FERQHMDSPD LGTDDDDKAM ADIGSEFACI DRFPTGTCKH
    190     200
VKKGGGSKNS QKYRINCAKT CGLCH
  
```

Fig. 31 Secuencia de proteínas de fusión

De manera ilustrativa se muestra a continuación, la constitución de la proteína de fusión por diagrama de bloques.



Fig. 32 Diagrama de bloques proteína de fusión

### 7.2.2 Optimización de crecimiento y expresión del plásmido *r-BcsTx1*

Las condiciones de cultivo, como la temperatura de crecimiento, temperatura de inducción y la concentración del inductor, pueden optimizar la expresión de la proteína recombinante, debido a que tanto los hospederos y los vectores de expresión presentan distintos niveles de producción de una proteína recombinante, bajo las mismas condiciones de cultivo. Es por ello que se modificaron condiciones como: vectores, tipos de células, concentraciones de IPTG, temperaturas y tiempos de incubación, con el fin de obtener las condiciones de mayor crecimiento y mejor expresión.

## 7.2.3 Plásmido pET-32a-BcsTx1

Se realizó una prueba de purificación, en la cual 300  $\mu$ L de extracto crudo fueron añadidos a una mini columna de afinidad, después de haber sido inducido con 1 mM de IPTG, con el fin de constatar la presencia de la proteína de fusión Trx-r-BcsTx1, el peso molecular de esta proteína es de 22 kDa, y como se puede apreciar en la Figura 33, lo cual nos indica que la proteína de fusión se expresa.

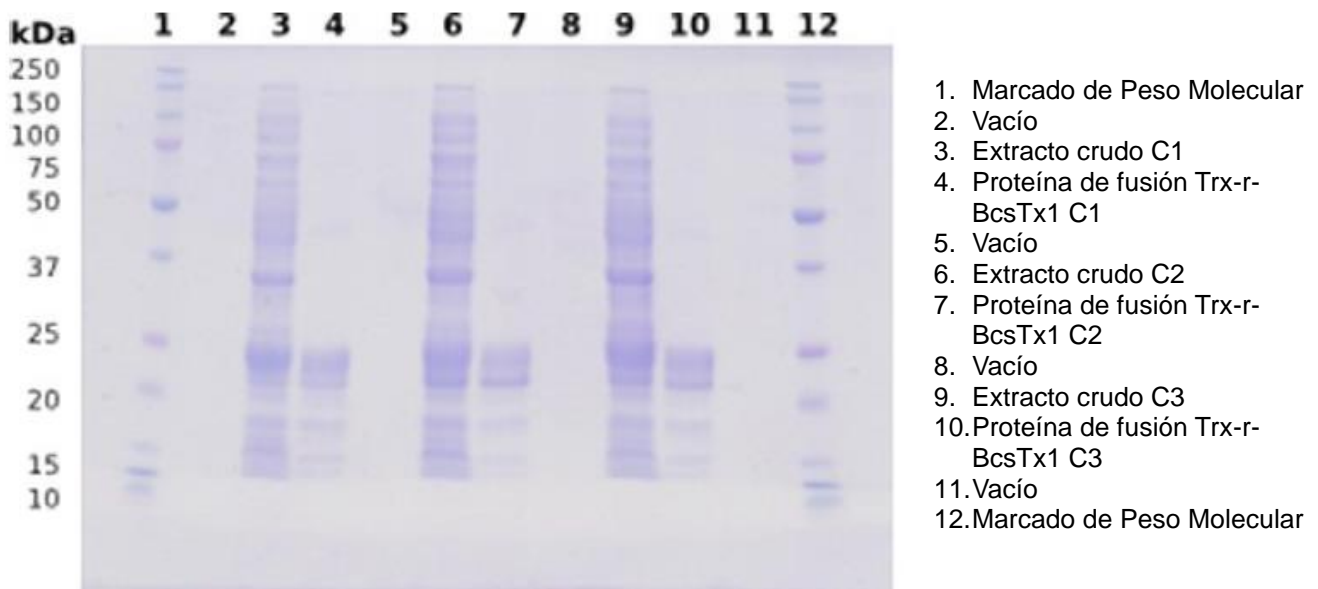


Fig. 33 Prueba de purificación de las tres diferentes colonias de Trx-rBcsTx1.

Se realizaron distintos ensayos con el plásmido pET-32a-BcsTx1, variando la temperatura de inducción (25 y 37°C) y el tipo de cepa (Rosetta, BL21), aunado a ello, se realizó una cinética de expresión para observar el tiempo óptimo de la expresión.

El crecimiento de 1L de cultivos se realizó a 37°C, debido a que a esta temperatura la bacteria *E. coli*, tiene el crecimiento óptimo, una vez alcanzada la DO<sub>600</sub> de 0.9, se añadió 1 mM de IPTG, una muestra (500 mL) fue incubada a 25°C y otra (500 mL) a 37°C, la cinética se siguió por 14 h seguidas.

### 7.2.4 Cinética de expresión en BL21 del plásmido pET-32a-BcsTx1

A continuación, se observan los geles realizados en las 7 primeras horas de expresión. En la Figura 34, se muestra la cinética de expresión del plásmido pET-32a-BcsTx1 en la cepa de BL21 a 25°C, debido a que el peso molecular esperado es de 22 kDa, observamos que en el carril 6 y 7, es decir, a las 4 y 5 h de inducción se obtiene la mejor expresión, el carril 10, pertenece a otra proteína que se utilizó como control.

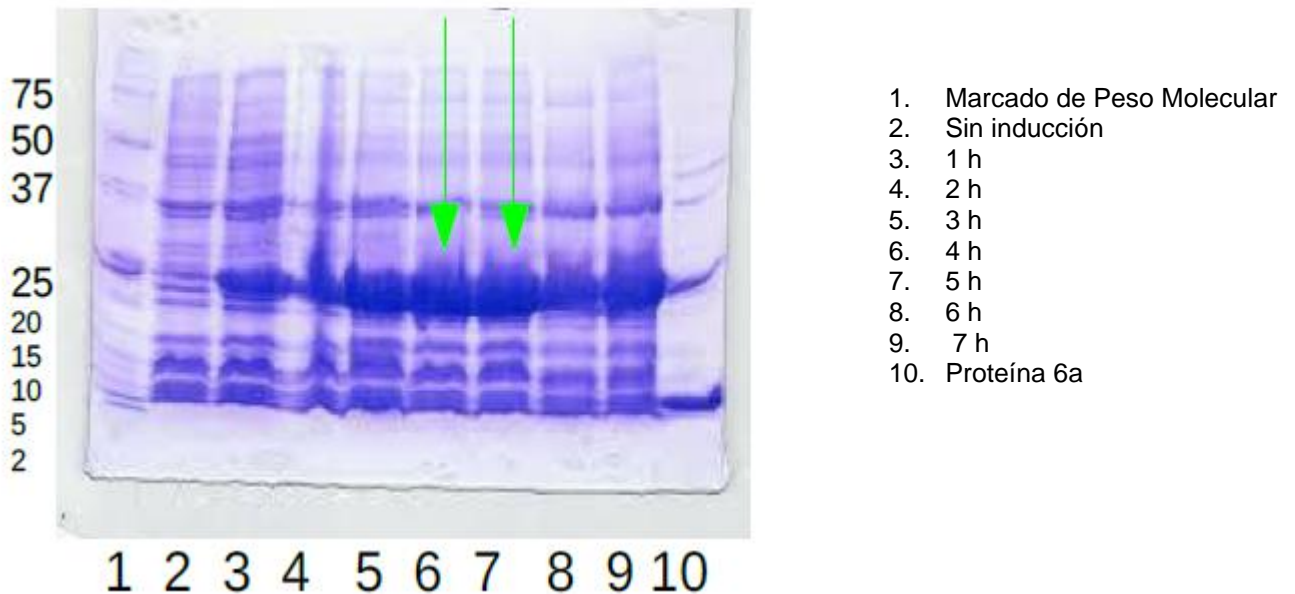


Fig. 34 Cinética de expresión de pET-32a-BcsTx1 en cepa BL21 a 25°C

Por otro lado, en la Figura 35 podemos observar el mismo plásmido en la misma cepa a 37°C, aquí se observan en los carriles 4 y 5 (2 y 3 h respectivamente), la mejor expresión.

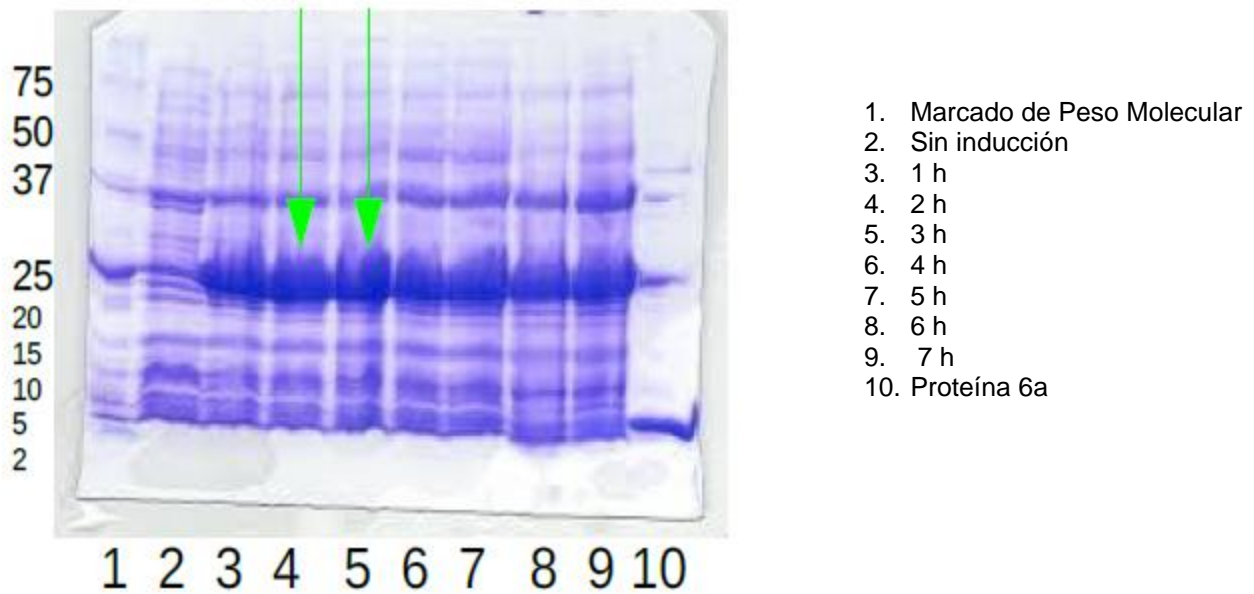


Fig. 35 Cinética de expresión de pET-32a-BcsTx1 en cepa BL21 a 37°C.

En algunos casos, la disminución de la temperatura óptima de crecimiento, puede reducir respuestas metabólicas indeseables para la síntesis de proteínas foráneas y de esta manera mejorar el rendimiento y/o solubilidad de proteínas de interés<sup>88</sup> es por ello que se eligió realizar la inducción a 25°C, por 5 h en BL21.

#### 7.2.5 Cinética de expresión en Rosetta del plásmido pET-32a-BcsTx1

Se probó la cepa de Rosetta, también a dos diferentes temperaturas 25 (Figura 36) y 37°C (Figura 37), en los geles realizados, nos dimos cuenta que a 25°C la inducción por 6h, la temperatura óptima fue a 37°C, durante 6 h para Rosetta.



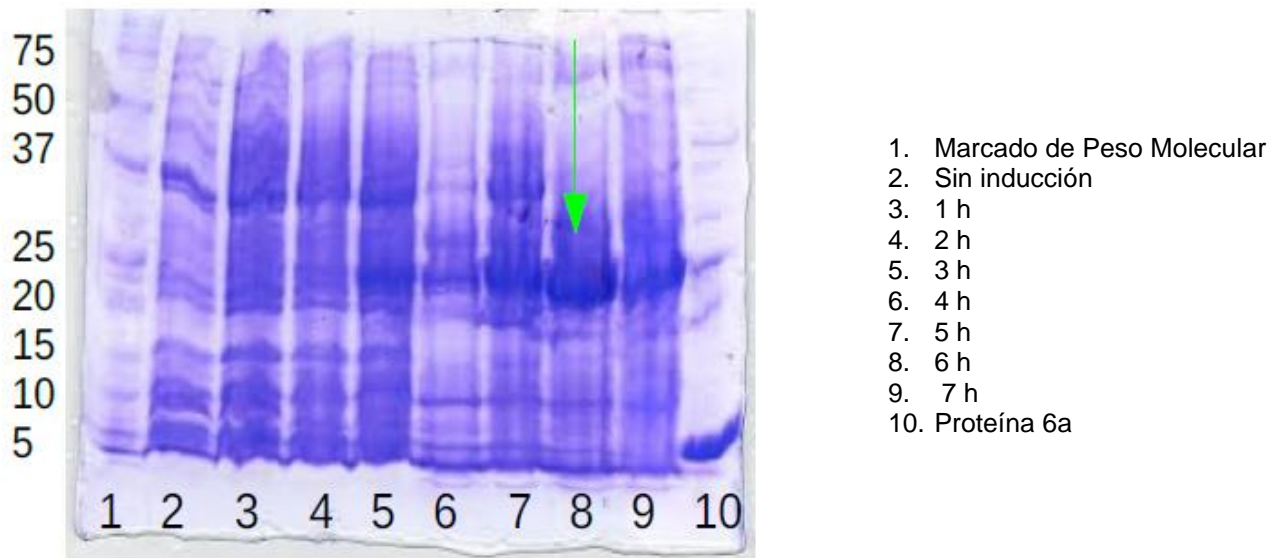


Fig. 36 Cinética de expresión de pET-32a-BcsTx1 en cepa Rosetta a 25°C.

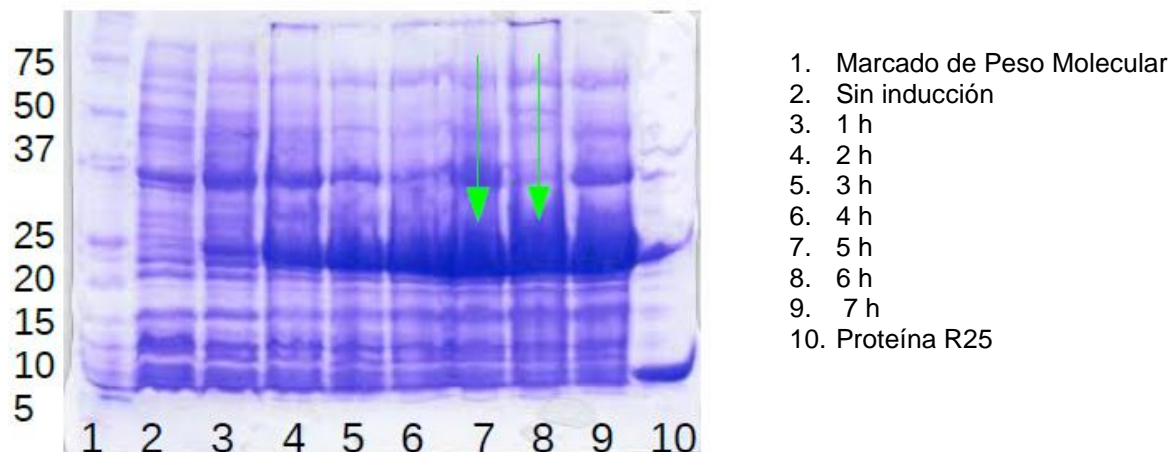


Fig. 37 Cinética de expresión de pET-32a-BcsTx1 en cepa Rosetta a 37°C

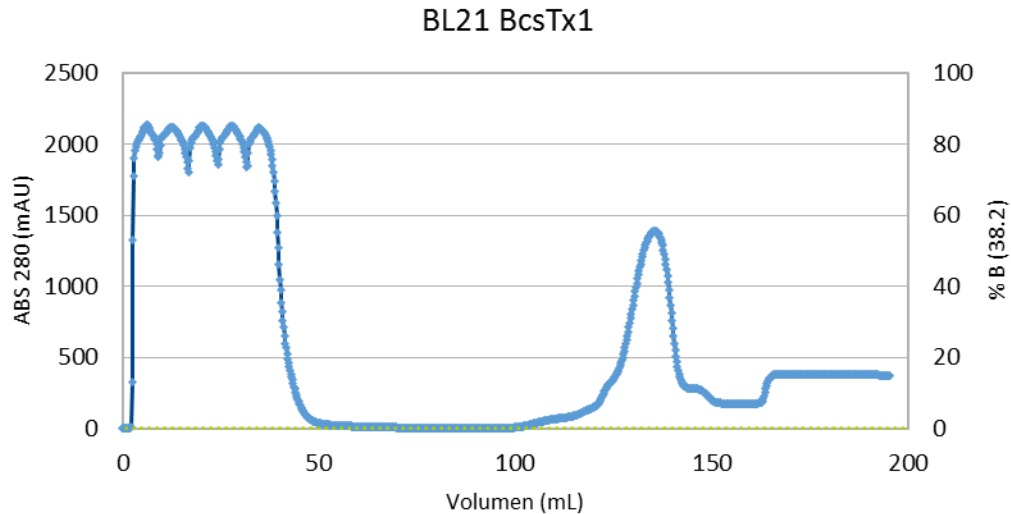
### 7.2.6 Purificación por afinidad en BL21 de la proteína de fusión Trx-r-BcsTx1

Una vez sonicada la muestra, se procedió a centrifugar a 15 000 rpm (rotor 5427-R) por 30 min, a -4°C y el sobrenadante fue filtrado con una membrana de 0.22 µm, posteriormente se inyectaron 20 mL aproximadamente al equipo de FPLC, y se hizo pasar el sobrenadante a una columna de afinidad (His Trap Ni- 5 mL), debido a que el loop utilizado es de 5 mL, se dividió el total del volumen en cinco inyecciones, como se puede observar en



## 7. RESULTADOS

el perfil cromatográfico 2, en la purificación se hizo un gradiente con un buffer de elución inicial de 0.2 M y final de 0.5 M Imidazol.



Cromatograma 2 Extracto crudo cepa BL21 inyectado a columna de afinidad.

Posteriormente se realizó un gel a acrilamida SDS-PAGE al 15%, para observar los posibles contaminantes de la muestra extraída de la primera purificación (Fig. 38). Se observan las fracciones 50 y 52 con mayor cantidad de proteína, estas bandas se observan entre 20 y 25 kDa, por lo que suponemos que es la proteína de fusión cuyo peso molecular es de 22 kDa.

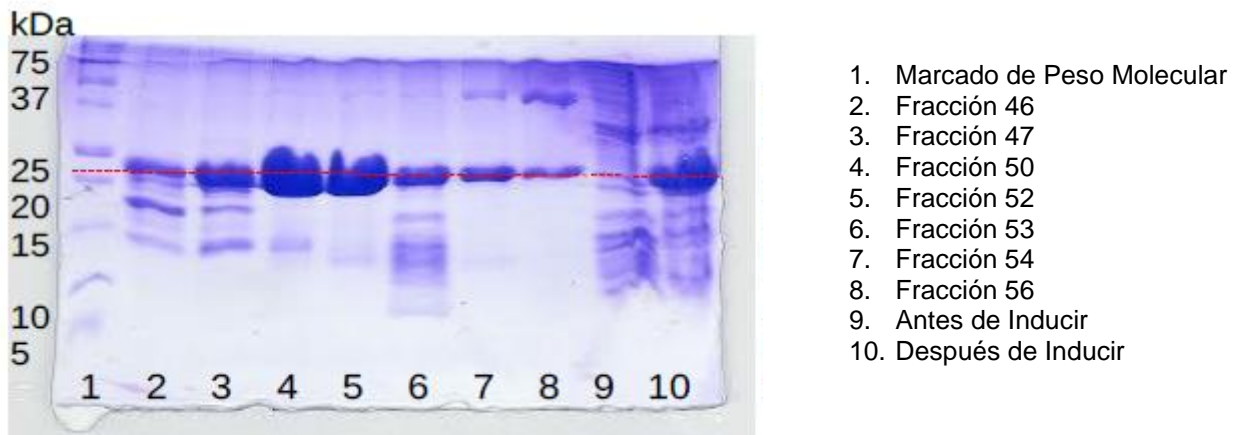
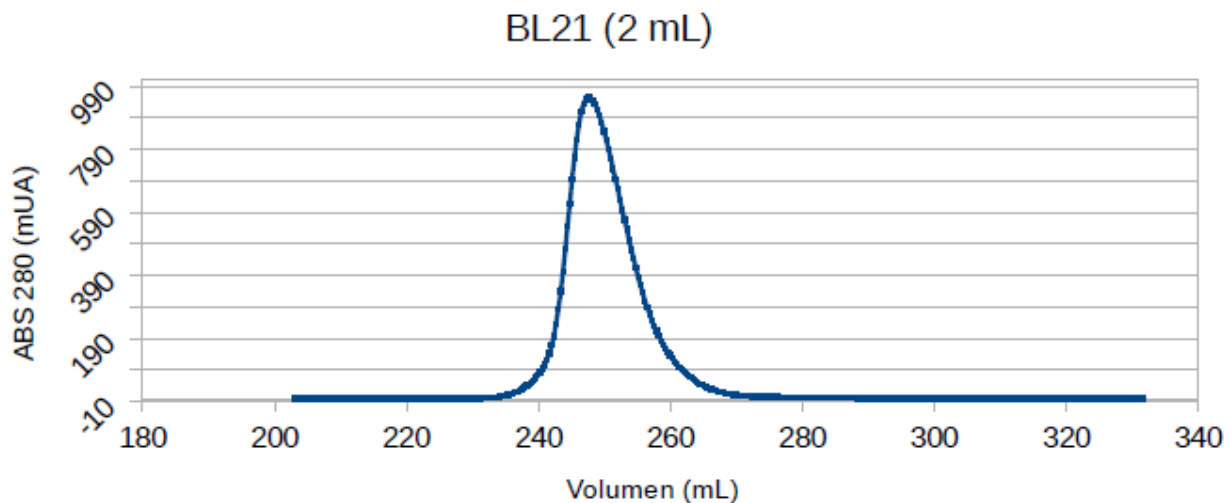


Fig. 38 Purificación por columna de afinidad de BL21.

### 7.2.7 Exclusión molecular en BL21 de la proteína de fusión Trx-r-BcsTx1

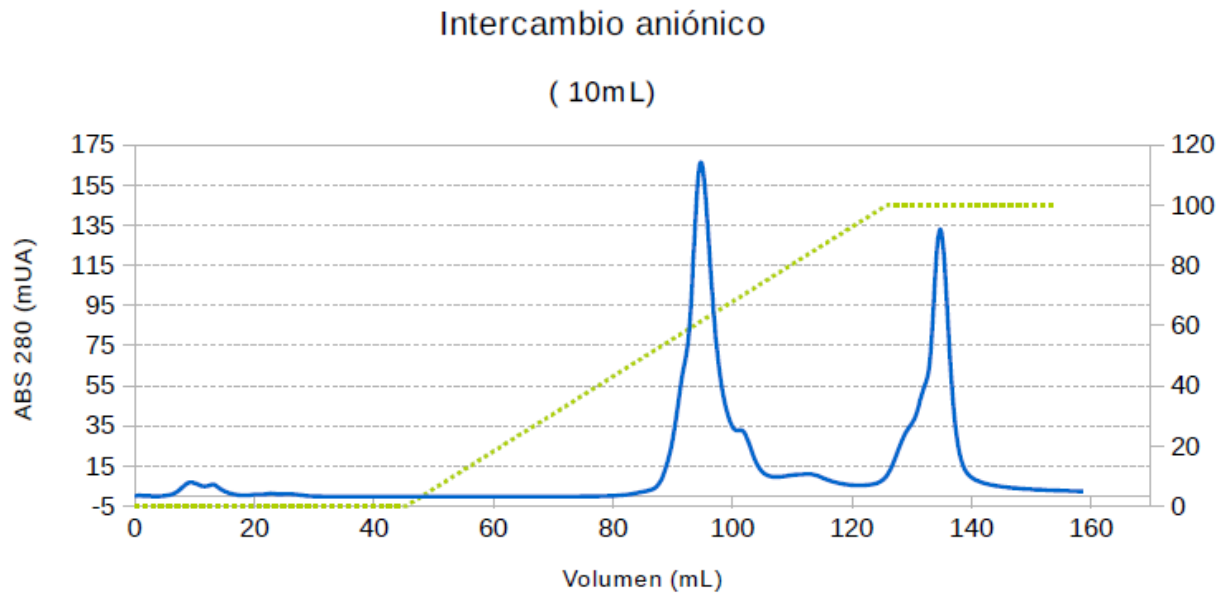
Una vez concentrada la proteína de fusión, se procedió a purificar por Exclusión Molecular, antes de llevar a cabo el corte, para poder eliminar las bandas menores de 20 kDa que aparecen en los geles y para hacer el cambio al tampón de corte. En el cromatograma 3 se observa la curva obtenida, posteriormente se tomó una alícuota antes de proceder al corte con enteroquinasa, más adelante, en el apartado de corte se observan.



Cromatograma 3 Inyección de las fracciones 50,51 y 52 procedentes de columna de afinidad.

### 7.2.8 Intercambio aniónico en BL21 de la proteína de fusión Trx-r-BcsTx1

Debido a que después de llevar a cabo la purificación por exclusión molecular (las características de la cromatografía, ver Anexos), se seguían observando bandas menores de 20 kDa, se decidió intentar por cromatografía por Intercambio aniónico, a continuación, se presentan los resultados de la cromatografía (cromatograma 4).



Cromatograma 4 Cromatografía por Intercambio aniónico de fracciones procedentes de BL21.

En la Figura 39 se muestra el gel SDS-PAGE (18%), en el cual se observan las mismas bandas que en las purificaciones precedentes por lo cual llegamos a la conclusión que estas bandas se deben a una degradación de la proteína. A partir de esta observación se tomó la decisión de sólo purificar por afinidad, cambiar el buffer de corte mediante centricones y llevar a cabo el corte con Enteroquinasa, posterior al tiempo de incubación, volver a pasar por la columna de afinidad.

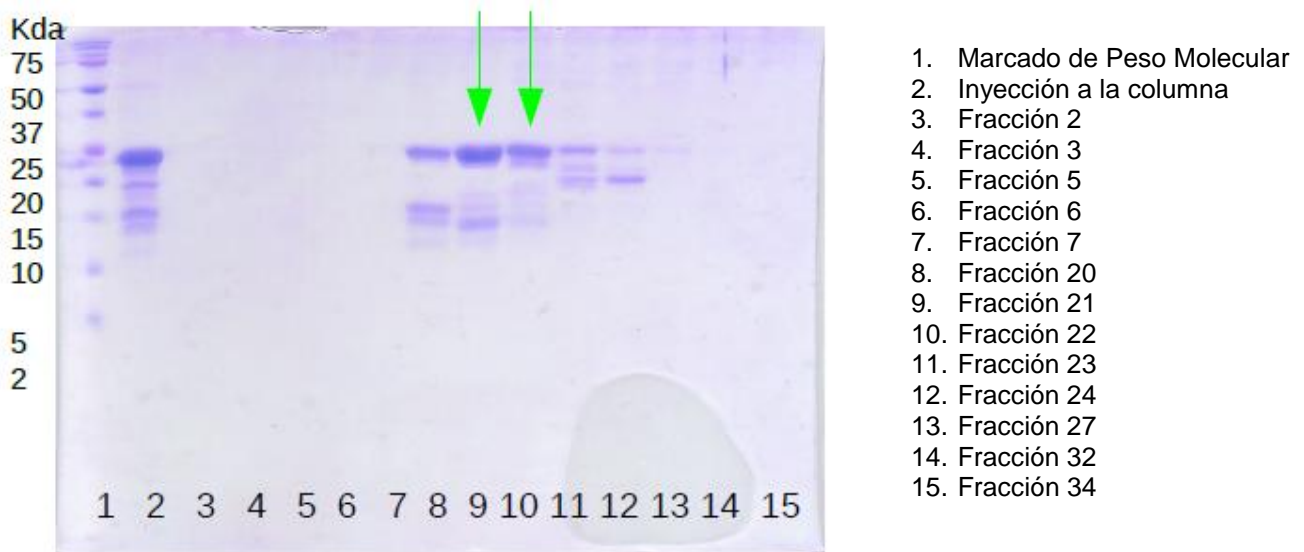
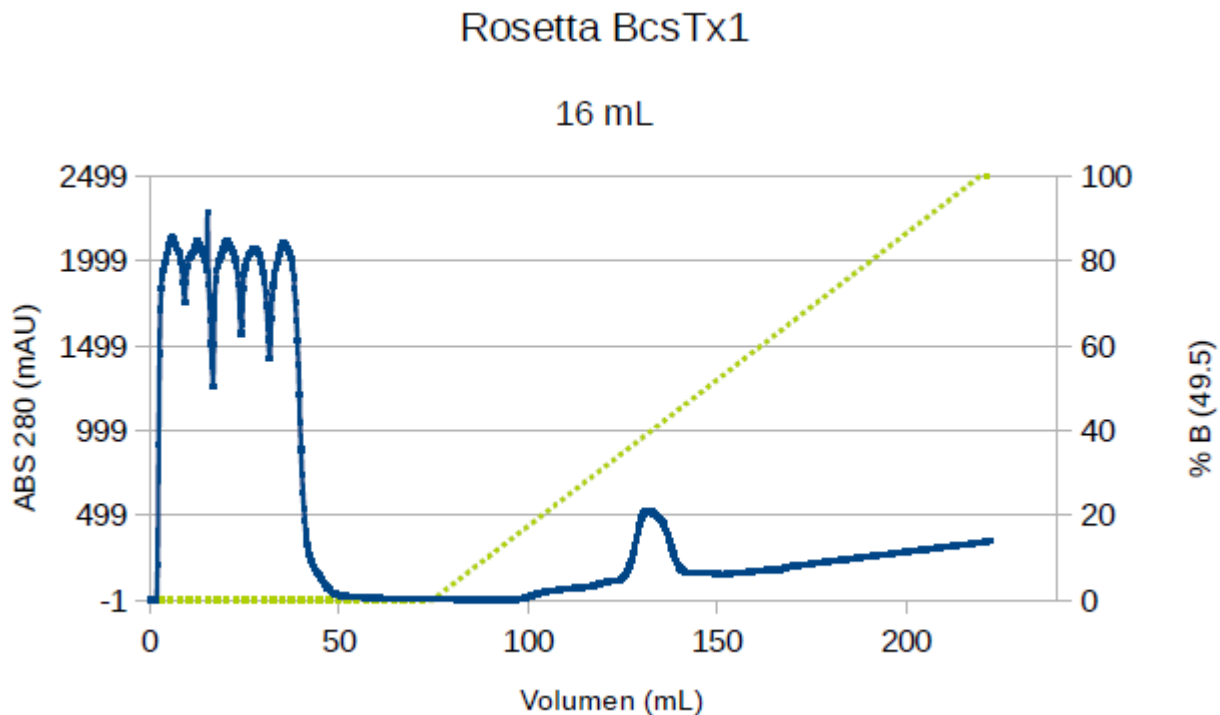


Fig. 39 Gel SDS-PAGE 18% Fracciones de Intercambio Aniónico en BL21

Después de probar la expresión en diferentes cepas como BL21, Origami y Rosetta, observamos que Rosetta dio mejores resultados, debido a que la gran parte de la proteína expresada se encontraba en fase soluble, por ello se decidió trabajar con Rosetta, para facilitar la purificación.

### 7.2.9 Purificación de Rosetta de la proteína de fusión Trx-r-BcsTx1

A continuación, se muestran los resultados obtenidos con la cepa de Rosetta, como anteriormente se mencionó esta cepa sirve para expresar codones raros y ayuda a la formación de enlaces disulfuros, sin embargo, claramente se puede ver la diferencia en la amplitud del pico con respecto al cromatograma 3.2, cuya intensidad es mayor que en el cromatograma 5, no obstante, faltaría realizar un análisis para saber si los enlaces disulfuro en ambas cepas se forman de acuerdo al modelo por homología de BgK y dependiendo de esto poder elegir una cepa u otra.



Cromatograma 5 Extracto crudo cepa Rosetta inyectado a columna de afinidad.

En la Figura 40 se observan las bandas de las fracciones obtenidas en la cromatografía de afinidad, siendo las fracciones 54-57 las que mayor absorbancia presentan (rectángulo rojo), además de que estas bandas oscilan entre los 20 y 25 kDa, que concuerda con lo esperado en el peso de la proteína de fusión de 22 kDa.

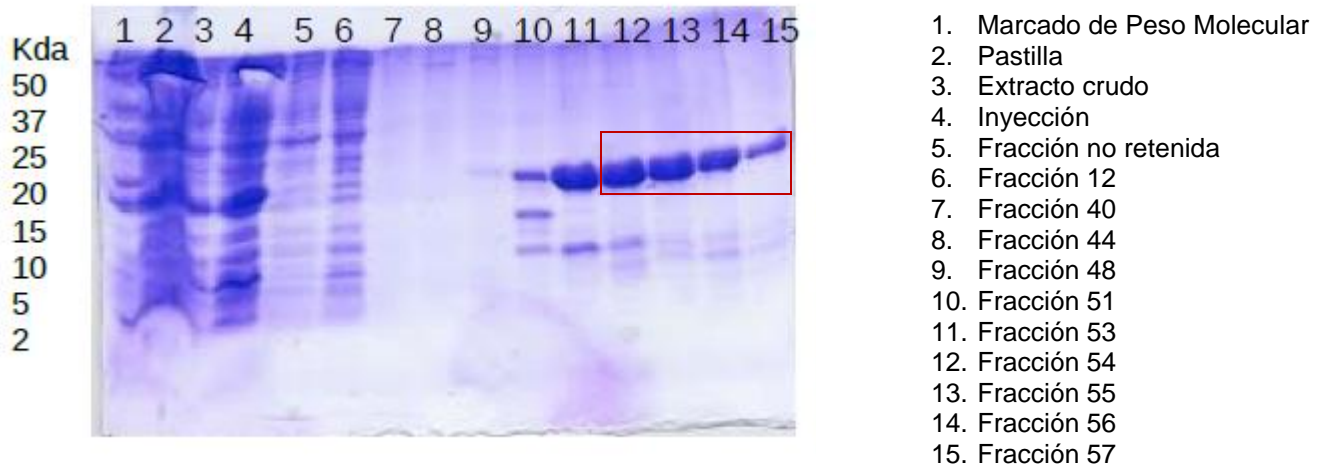


Fig. 40 Purificación por columna de afinidad de Rosetta

### 7.2.10 Corte con enteroquinasa de la proteína de fusión *Trx-r-BcsTx1*

Se probaron dos temperaturas de corte, se observó que la mejor temperatura fue de 4°C, debido a que, en la reacción de 25°C, en la solución se observó la presencia de un precipitado color blanco, cabe mencionar que este precipitado no se observó en la reacción de 4°C. Además, se siguió la cinética de reacción, con el objetivo de conocer el tiempo óptimo de corte de la proteína de fusión (no se muestran datos).

En la Figura 41, se observa la reacción de las dos diferentes temperaturas a las cuales se llevó a cabo el ensayo. Las bandas obtenidas tienen pesos moleculares de aproximadamente 5 y entre 10 y 15 kDa. Las alícuotas de los carriles 2 y 6 proceden de la muestra después de la cromatografía por exclusión.

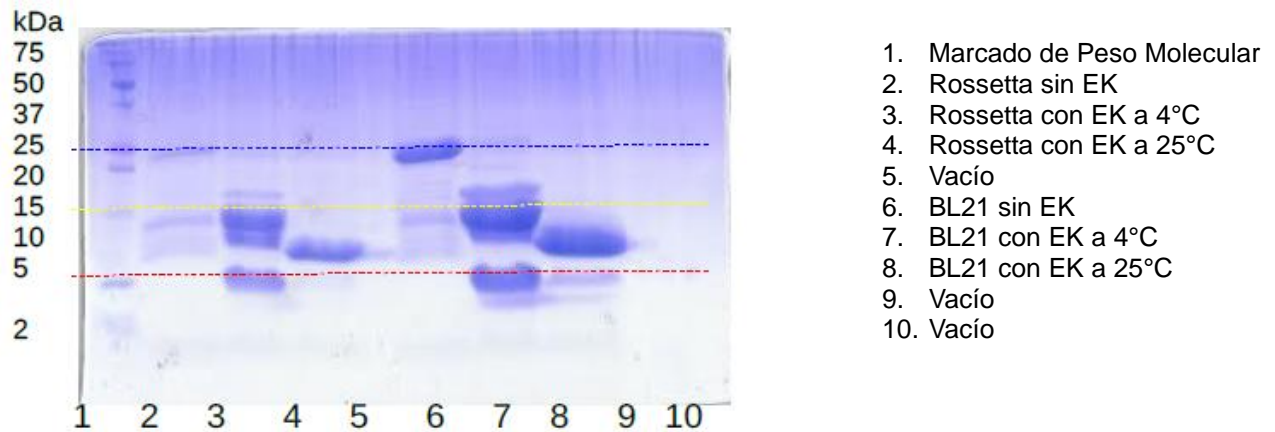


Fig.41 Gel SDS-PAGE 15% Reacción de corte con Enteroquinasas.

### 7.2.11 Purificación del recombinante *BcsTx1*

Una vez realizado el corte con Enteroquinasas, se observaron dos bandas, una entre 15-10 kDa y la otra debajo de 10 kDa, sin embargo, separar estas dos bandas se volvió complicado.

Como se puede observar en la Figura 42, en el carril 2, se observa la proteína cortada, después de 72 h de reacción, posteriormente esta muestra se aplicó a la columna de Niquel nuevamente, con el fin de separar las bandas, debido a que según la construcción del plásmido, la etiqueta de Tiorredoxina tiene una etiqueta de histidina, sin embargo, en las bandas del carril 4 y 5 se observa la separación de la proteína con menos peso molecular y un remanente de la proteína de mayor tamaño, en las bandas 9 y 10 se muestra la mayor cantidad de proteína entre 10 y 15 kDa.

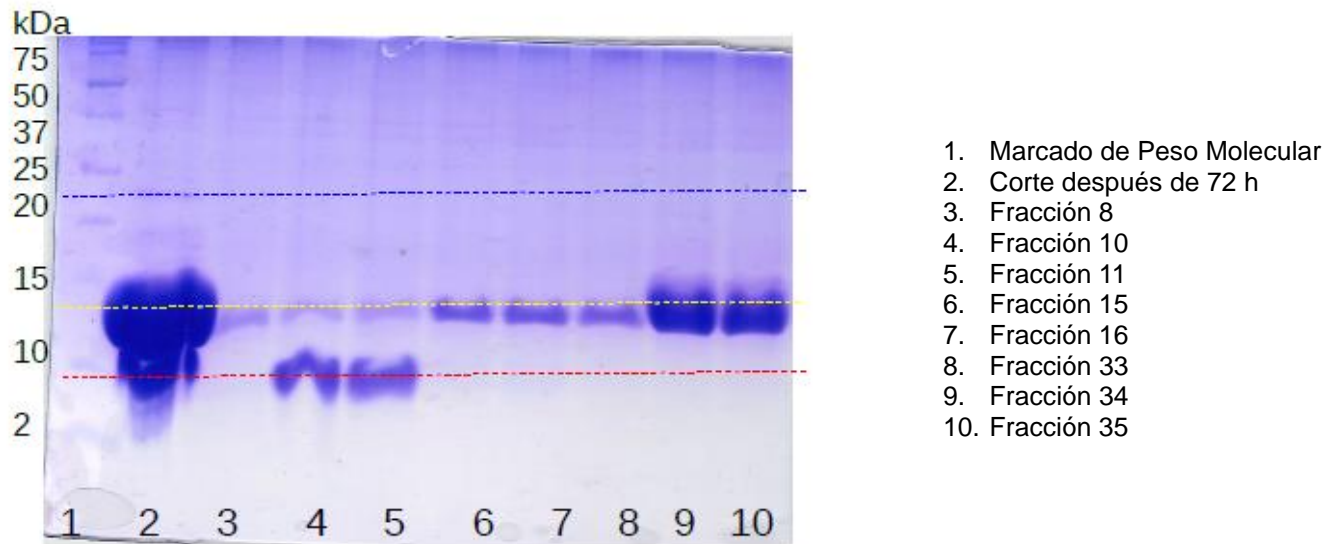


Fig. 42 Gel SDS-PAGE 18% Purificación por afinidad de la proteína previamente cortada.

Las fracciones 10 y 11 se concentraron en centricones de 2 kDa, y se pasaron nuevamente por columna de afinidad de forma manual, cambiando la concentración de buffer de equilibrio, para tratar de retirar la banda de 10 y 15 kDa, pero no se pudo observar la separación de esta banda (Figura 43). Se juntaron las fracciones 8, 9 y 10 y se decidió realizar un experimento en el equipo de 700 MHz en 1D de Hidrógeno.

### 7.2.12 Obtención del recombinante *BcsTx1*

El proceso se llevó a cabo con 1 L de medio TY2X y al final de todo el procedimiento se obtuvo 300  $\mu$ L de proteína.

### 7.2.13 Espectrometría de masas del recombinante *BcsTx1*

La banda señalada en la Figura 43, se envió a analizar en un equipo de Espectrometría de Masas, en el laboratorio de Proteómica en el Centro de Ciencias Genómicas, UNAM.

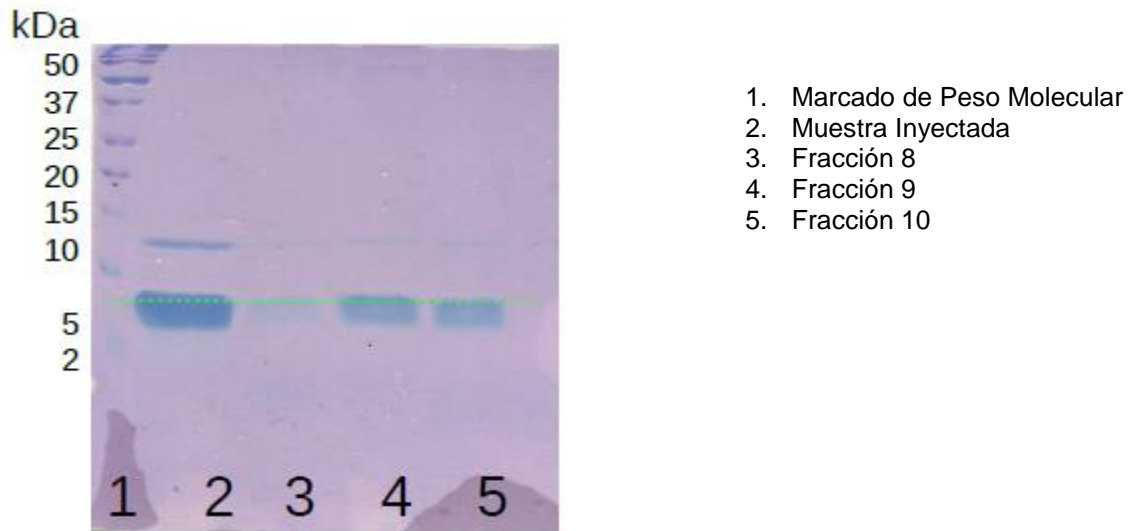


Fig. 43 Gel SDS-PAGE 18% Purificación por afinidad de la proteína cortada

La banda fue tratada con tripsina, la masa nominal fue de 5419 kDa y se observó que los cortes realizados por la enzima, coinciden con la secuencia esperada, por lo que se concluye que la banda enviada es la toxina BcsTx1. Estos experimentos se llevaron a cabo con la colaboración del Dr. Sergio Encarnación Guevara y M.C. Magdalena Hernández Ortiz del Instituto de Ciencias Genómicas de la UNAM, se utilizó el servidor de Mascot para su análisis.

#### 7.2.14 Resultados de RMN del recombinante BcsTx1

La muestra denominada BcsTx1sm (sin marcar), luego de ser caracterizada por Espectrometría de masas se aplicó al equipo de RMN 700 MHz (Figura 44), para realizar experimentos homonucleares con diferentes tiempos de mezclado TOCSY (35 y 80 ms) y NOESY (100 y 200 ms).

Con estos espectros se empezó la asignación de los 47 aminoácidos. Como se puede observar en la Figura 44, en la región de los N-H $\alpha$ , no se observan muchas señales, por lo que sugiere que r-BcsTx1sm no está plegada correctamente.



Además de que la cantidad obtenida no es suficiente y tampoco es pura para poder llevar a cabo experimentos en el equipo de RMN, donde la pureza que se requiere es del 97% como mínimo.

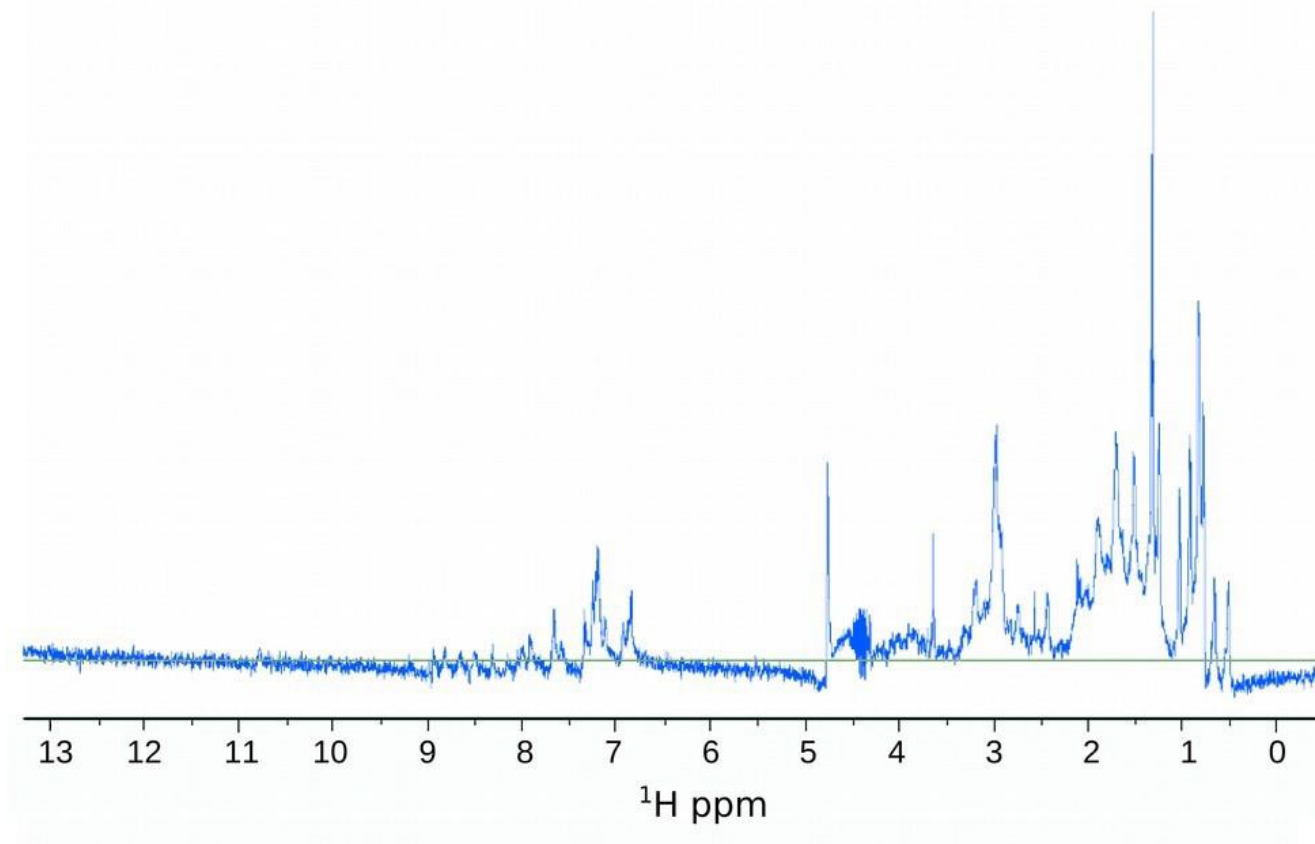


Fig. 44 Espectro de RMN 1H de r-BcsTx1sm

### 7.2.15 Respuesta en canales de potasio del recombinante BcsTx1

La concentración máxima probada de BcsTx1 fue de 3  $\mu$ M, se observó un efecto inhibitor (un promedio de alrededor del 50%) sobre corrientes de potasio totales en neuronas del ganglio de la raíz dorsal de rata. El efecto es parcialmente reversible luego de dos a tres minutos de lavado. Los registros electrofisiológicos se muestran en la Figura 45.

Por otro lado, se probó sobre corrientes de sodio, a menor concentración, sin embargo, no mostró tener ningún efecto.

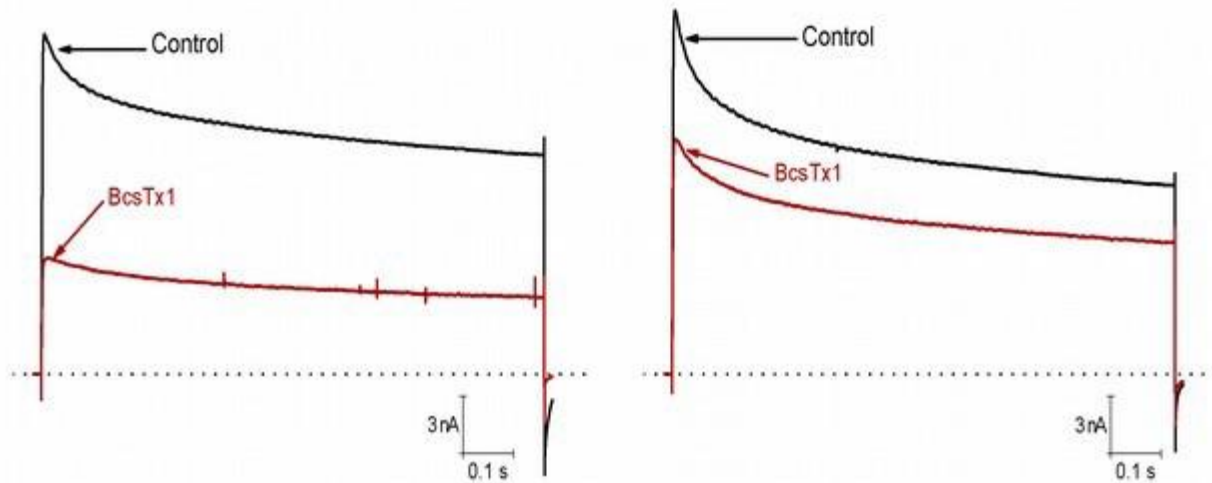
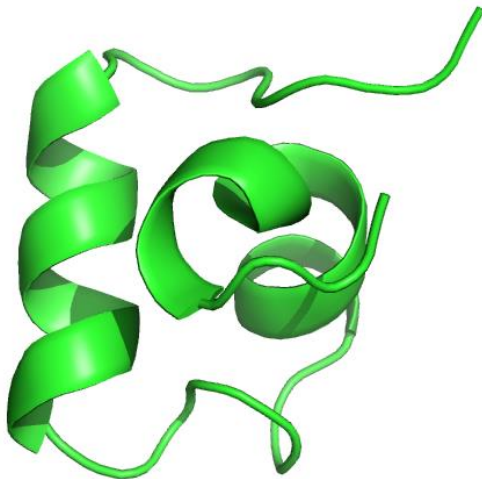


Fig. 45 Respuesta de r-BcsTx1sm en canales de potasio.

Con el servidor Swiss-Model se realizó un modelo por homología de BcsTx1. El porcentaje de identidad entre BcsTx1 y la estructura calculada de OspTx2b es del 54%. El resultado del modelo y del alineamiento de BcsTx1 y OspTx2b se muestra en la Figura 46.

A)



B)

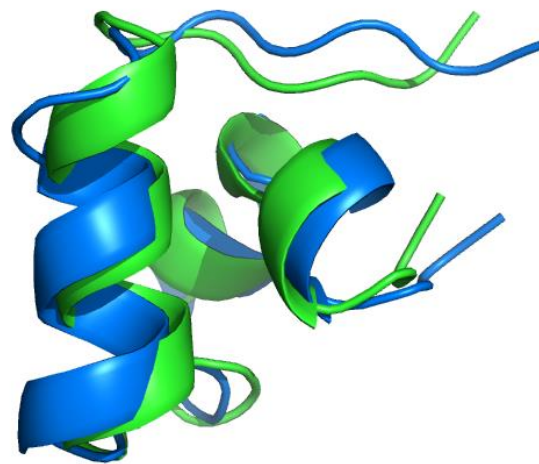


Fig. 46 A) Modelo de BcsTx1 obtenido por Swiss-Model. B) Alineación de la estructura de BcsTx1 (verde) y OspTx2b (azul).

### 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El proceso de purificación de toxinas obtenidas del animal, es largo y las cantidades puras que se logran obtener son muy bajas. Estas cantidades limitan el estudio y no permiten caracterizar estructuralmente estos compuestos. En la actualidad es posible el uso de sistemas de producción recombinantes y/o la síntesis química para la obtención de mayores cantidades de muestra. Para poder llevar a cabo estas metodologías es necesario conocer la secuencia de aminoácidos que constituyen a la toxina.

En este trabajo se decidió estudiar a BcsTx1 y a OspTx2b. Toxinas de las cuales se conocía la secuencia de aminoácidos y cuya función estaba predicha como bloqueadores del canal Kv1.3<sup>50,52,89</sup>, por lo que la estructura teóricamente podría ser similar a las toxinas ShK y BgK. rBcsTx1 se trabajó de forma recombinante, mientras que OspTx2b se sintetizó químicamente.

La síntesis química de OspTx2b fue exitosa, obteniéndose buenas cantidades de este péptido.

El espectro de RMN de OspTx2b mostró la presencia de dos poblaciones, una mayoritaria y otra minoritaria. Estas dos poblaciones no se observaron en el cromatograma de purificación, ni en el espectro de masas, lo que indica que se trata de la misma secuencia en dos conformaciones distintas; la segunda conformación en cantidades muy bajas. Esta segunda conformación complicó el proceso de asignación de las señales NOE, debido a que había algunas señales que se sobrelapan con otras, ocasionando dificultad para discernir una señal de la conformación mayoritaria o minoritaria.

Los aminoácidos que se encuentran en la conformación minoritaria son desde Thr 32 a Glu 35, así como Ala 9. Se identificaron estas señales y se trató de ser lo más minucioso en la asignación de señales de NOE. La variación de pH y de temperatura ayudó a

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

---

diferenciar algunas de las señales de las diferentes conformaciones, así como, identificar señales de residuos que se encontraban traslapados.

Los espectros utilizados para realizar la asignación de OspTx2b fueron con pH 3.8 y 5.0. Estos pH fueron elegidos debido a que toxinas como ShK y BgK se obtuvieron bajo condiciones similares, pH 5.0 y 3.9, respectivamente. Además de acuerdo al experimento de titulación, las señales se observaban mejor definidas entre pH de 4.0 y 5.0. Al observar cuidadosamente las señales en la parte del amino, nos dimos cuenta que a partir del pH 6.0 se observa una pequeña señal alrededor de 9.8 ppm, en pH 7.2 es más evidente. En el espectro de 2D NOESY, nos percatamos que esta señal pertenece al H del grupo OH- de la Thr 32, así mismo identificamos el H del grupo OH- de la Ser 22 muy cerca de 5.5 ppm.

La titulación de pH nos permitió observar cuales son los residuos que cambian su estado de protonación<sup>90</sup>. El cambio más evidente, en desplazamiento químico, es la Thr 32 a pH 3.8, el desplazamiento químico fue de 10.2 ppm, mientras que a pH 8.0 cambia a 10.48 ppm, debido a que a pH menor el grupo hidroxilo de la Thr es protonado.

Por otra parte, al comparar los desplazamientos químicos en los experimentos con distintas temperaturas, se observó que, al aumentar la temperatura, los valores de desplazamientos químicos cambian a campos más altos. Se ha descrito para muchos sistemas, que existe una correlación entre la temperatura y el estado de plegamiento-desplegamiento de una proteína<sup>91</sup>. Al aumentar la temperatura los enlaces de hidrógenos intramoleculares se extienden y el alargamiento de los enlaces de hidrógenos debilitan la polarización del electrón <sup>1</sup>HN, esto causa que los desplazamientos químicos se muevan a campos más altos. En este caso, se observó la pérdida de algunas señales a medida que la temperatura aumentaba, esto puede indicar que algunas regiones tienen a perder enlaces de hidrógenos.

La estructura de OspTx2b obtenida es similar a la estructura de BgK (RMSD 0.661) esto era de esperarse debido a que tienen un porcentaje de identidad del 43%, sin embargo, en resultados preliminares se observó que OspTx2b era más potente que BgK en la inhibición

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

---

del canal  $K_v1.3$ , pero al realizar un estudio más minucioso se observaron resultados diferentes<sup>42,92</sup>.

OspTx2b está formada por dos alfa hélices, una formada a partir de Ala 8 a Ala 16, y la segunda de Ala 30 a Cys 33. La presencia de NOEs de corto alcance entre los protones  $H\alpha(i)$  y  $HN(i+3)$ , así como los protones  $H\alpha(i)$  y  $H\beta(i+3)$  en el espectro, nos daban una clara idea de que la estructura adoptaría una conformación de hélice. Por otra parte, se puede observar (Figura 47) que los enlaces disulfuro ayudan a mantener la proximidad espacial a la estructura, tal es el caso de los enlaces formados por la Cys 2 y la Cys 36. Los pares de cisteína Cys 11 y Cys 29, unen a las dos hélices, la Cys 20 y Cys 33 mantiene la proximidad hacia el centro de la molécula resultando así en una estructura d forma globular. Se ha reportado que existen otras conformaciones estructurales de algunas toxinas, esto debido a las distintas formas en las que se unen los enlaces disulfuro<sup>74,93,94</sup>, sin embargo, en OspTx2b solamente logramos detectar una conformación para los enlaces disulfuro, con lo cual la conformación menor no se debe a este proceso.

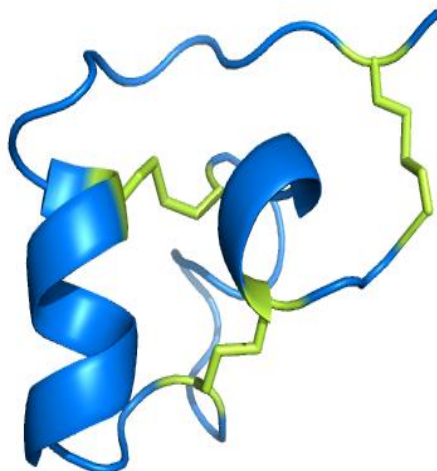


Fig. 47 Estructura tridimensional de OspTx2b

En la Figura 48 se muestra el alineamiento de las secuencias de toxinas de distintos organismos ShK, BgK, BcsTx1 y OspTx2b. Se puede observar que los residuos Asp 4, Lys 24 y Tyr 25 (en OspTx2b), así como las seis cisteínas están conservadas. Estas

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

características se han observado en las toxinas bloqueadoras de canales  $K_v$  1.3, por lo que se considera que estos aminoácidos juegan un papel muy importante al interactuar con el canal. Aún se desconoce el mecanismo de acción y el papel que realiza cada uno de estos aminoácidos con certeza<sup>15, 42, 79, 95</sup>.

OspTx2b	ACKDNLPAATCSNVKANNNC-SSEKYKTN---CAKTCGEC	
ShK	RSCIDTIPKSRCTAFQ----CKHSMKYRLSF--CRKTCGTC	(35%)
BgK	VCRDWFKETACRHAKSLGNCRYSQKYRAN---CAKTCELC	(43%)
BcsTx1	ACIDRFPTGTCKHVKKGGSCKNSQKYRIN---CAKTCGLCH	(54%)

Fig. 48 Alineación de secuencias de toxinas bloqueadoras de canal  $K_v$ 1.3

La estructura de este tipo de toxinas en general, consiste en dos alfa hélices, estas hélices están unidas entre sí, por un enlace disulfuro. Los enlaces disulfuro brindan la estructura globular, así como, una alta estabilidad a la molécula<sup>42,89</sup>.

ShK es una toxina proveniente de la anémona *Stichodactyla helianthus*, que ha sido estudiada extensivamente, debido a la potencia que ha mostrado en canales de potasio sensibles al voltaje, principalmente en  $K_v$ 1.3 (11 pM) y  $K_v$ 1.1 (16 pM) en células de mamífero. Se han sintetizado cerca de 380 análogos de esta toxina buscando así un derivado que sea específico para inhibir sólo el canal  $K_v$ 1.3<sup>79,96</sup>.

En ShK se ha observado que los residuos Ser 20, Lys 22, Tyr 23 y Arg 24, son muy importantes en la interacción con el canal  $K_v$ 1.3<sup>96</sup>, en OspTx2b los residuos Ser 22, Lys 24 y Tyr 25 se conservan mientras que la Arg 24 esta remplazada por Lys 26, no obstante, ambos residuos son básicos por lo que no representa un cambio radical en el potencial electrostático<sup>114</sup>.

Mutaciones en los aminoácidos Lys 22 y Lys 25 en ShK y BgK, respectivamente revelan que Lys es un residuo crítico para interacción con el canal  $K_v$ 1.3<sup>47</sup>. Al mutar la Lys por Ala se ha visto que el efecto bloqueador es cerca de 80 veces menor que al de la toxina nativa<sup>97</sup>. El mecanismo de acción aún no ha sido elucidado, pero se ha propuesto que esta lisina es la que origina la interacción con la superficie del canal, posiblemente provocando la obstrucción de la permeabilización de los iones del canal<sup>79,98</sup>. Un modelo propuesto del

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

complejo toxina-canal propone que, este es estabilizado por los enlaces salinos generados entre los residuos ácidos de las paredes del canal y los residuos básicos que se encuentran en la toxina, generando el bloqueo del canal<sup>37</sup>. En la Figura 49, se observa la posición de Lys-Tyr en OspTx2b, ShK y BgK.

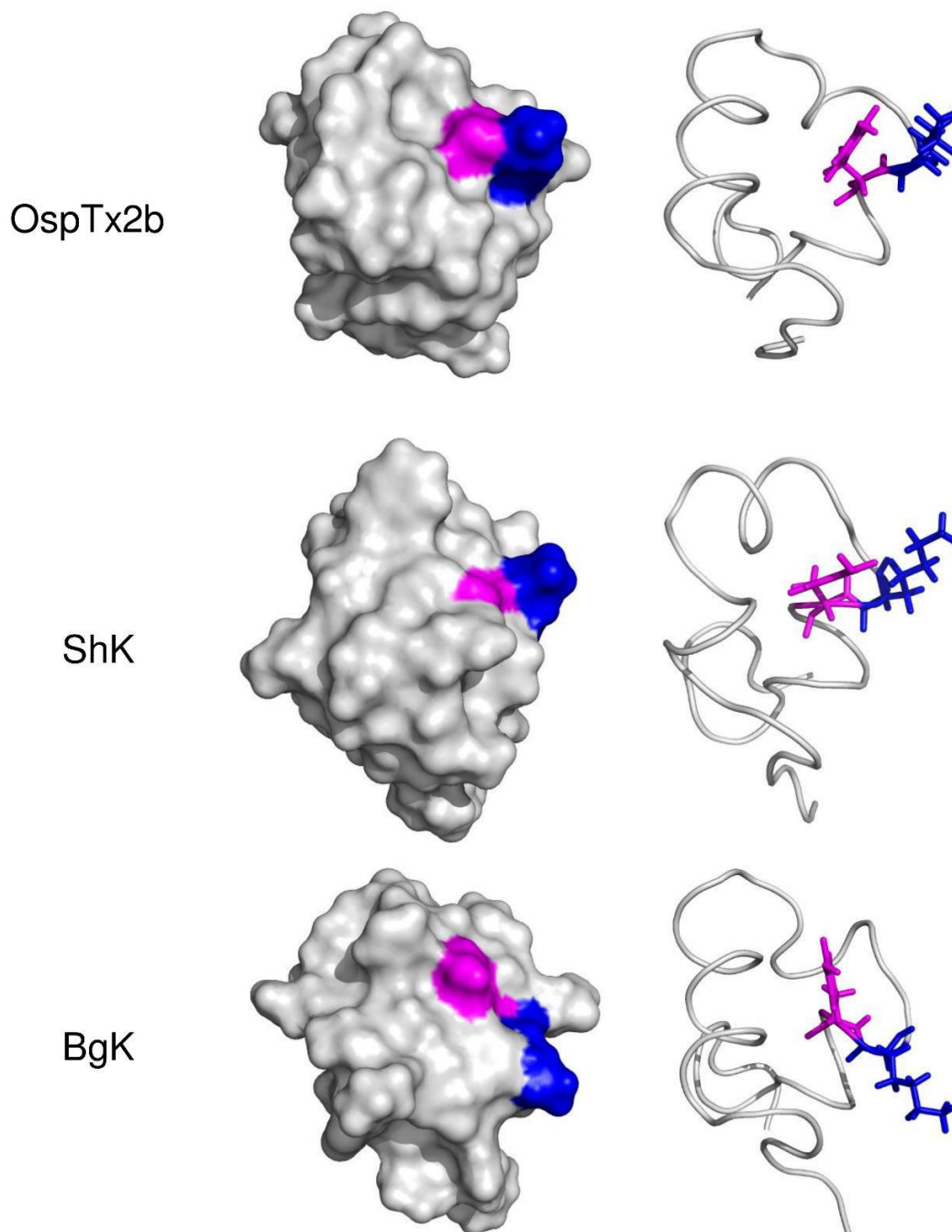


Fig. 49 Representación de las estructuras A) OspTx2b (PDB id 6BUC), B) ShK (PDB id 1ROO) y C) BgK (PDB id 1BGK). Localización de Lys (azul)- Tyr (magenta). La localización de Lys-Tyr en OspTx2b es muy similar a ShK.

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

---

En comparación OspTx2b con respecto a ShK y BgK, se observa que OspTx2b tiene un punto isoeléctrico (pI) más bajo 7.98, mientras que para ShK el pI es de 9.30 y para BgK es de 8.76. Aunado a esto, en OspTx2b se observa que junto al residuo Lys 24 se encuentra el ácido glutámico Glu 23, cuyo pI es de 3.22, comparado con la Met (pI 5.75) o Gln (pI 5.65) que se observan en las secuencias de ShK y de BgK, respectivamente. Este aminoácido, le confiere una alta acidez. Sin embargo, al realizar la titulación, se observa poca movilidad en los desplazamientos químicos en el residuo Glu 23 lo cual nos podría indicar que es estabilizado por la Lys 24 (pI 9.74).

Se realizó un docking para observar la posible interacción de OspTx2b y el canal de potasio KcsA. En este modelo se observan cuatro subunidades del KcsA, en las cuales el Asp 81 de cada subunidad es el que forma un filtro hacia el interior del canal. Se obtuvieron varios complejos entre KcsA y OspTx2b, se eligió uno de estos complejos basado en la bibliografía<sup>96</sup>.

En este complejo (Figura 50), se observa la interacción del Asp 81 de subunidad 1 con el Asn 5 de OspTx2b. Asp 81 de la subunidad 2 interacciona con el Glu 23. En este complejo, se observa que la relación entre la Lys 24 de OspTx2b y el Asp 81 de las subunidades 2 y 3, es muy fuerte. Varios estudios (anteriormente citados), mencionan la importancia de la secuencia Lys-Tyr para el bloqueo de canales. En cuatro de los complejos obtenidos se observa una interacción entre Lys 24 y Asp 81 de diferentes subunidades, lo cual nos confirma que Lys 24 es vital para la interacción entre OspTx2b y KcsA.

El Asp 81 de la subunidad 3 tiene, además de Lys 24, otra interacción con el Asp 19 de OspTx2b y finalmente se observa una cercanía de Asp 81 de la subunidad 4 con la Thr 10.



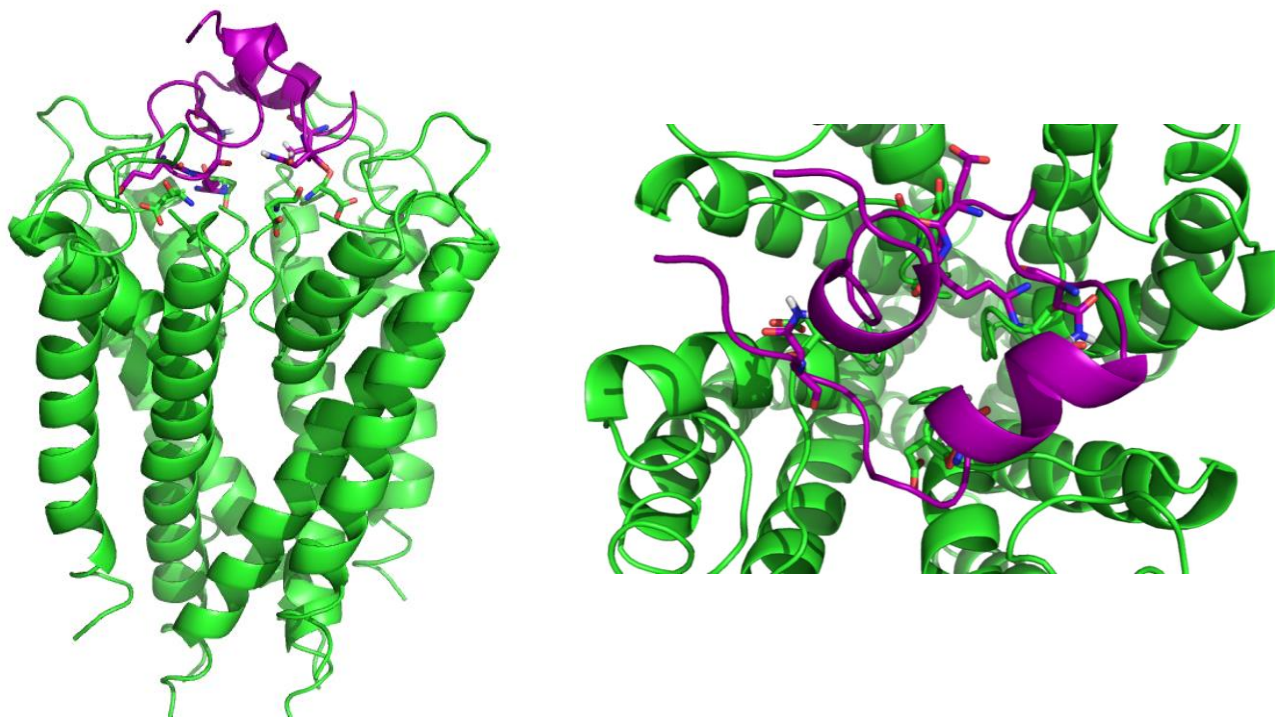


Fig. 50 Docking del complejo OspTx2b (en púrpura) y el canal de potasio KcsA (verde).

Por otra parte, las mutantes de BgK en los residuos en Phe 6, His 13, Lys 25, Tyr 26, y Thr 33 mostraron un cambio significativo en la interacción con el canal, siendo la más importante la realizada en la Lys 25<sup>42</sup>. En OspTx2b estos aminoácidos corresponden a Leu 6, Asn 13, Lys 24, Tyr 25 y Thr 32. En la Lys 24 y al Tyr 25 se observó un cambio de posición cuando se realizó la titulación de pH, esto nos podría sugerir la posibilidad de que estos aminoácidos pudieran interaccionar con el canal.

Es interesante observar que además de las diversas toxinas de anémoma que han mostrado bloqueo en el canal de potasio, se han observado péptidos que conservan este “dominio ShKT” y pueden causar filariasis, una enfermedad asociada con el elefantismo<sup>52</sup>.

Contrario a lo esperado, OspTx2b no presentó bloqueo de canales Kv expresados en ovocitos de *Xenopus* así como canales Kv, KCa y Nav expresados en linfocitos de humanos. Estos resultados no llevan a pensar que la función no solo es gobernada por la presencia de ciertos aminoácidos como el par Lys-Tyr, sino también se ve influenciada por la disposición espacial y otros residuos funcionalmente importantes.

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

---

En BgK la presencia de Phe 6, Lys 7, His 13 y Gln 24, se consideran importantes para el bloqueo, en el caso de OspTx2b, estos residuos son reemplazados por Leu 6, Pro 7, Asn 13 y Glu 23, respectivamente. A pesar que Leu 6, es un aminoácido hidrofóbico, quizá la presencia de un grupo aromático es requerida para unirse al canal. Por otra parte, Pro 7 podría reducir la flexibilidad.

Además, se realizaron pruebas de actividad anti-bacterial y anti-fúngica (*C. albicans* y *C. neoformans*), en los cuales tampoco se obtuvo actividad.

En el caso de rBcsTx1, se tuvieron que encontrar las condiciones óptimas para su producción. En el vector pGS-21a, la expresión fue muy escasa, y posteriormente se cambió al vector pET32a, el cual en varios artículos se había utilizado para la expresión de toxinas recombinantes<sup>89</sup>. Este vector tiene una etiqueta de tiorredoxina, la cual le otorga un ambiente oxidativo al citoplasma de la célula, permitiendo la formación de enlaces disulfuro. Además, los vectores pET se caracterizan por altos niveles de expresión, llevan a cabo la inducción con IPTG y son compatibles en cepas específicas como Tuner, Rosetta y Origami.

Se probaron dos tipos de células para transformar la toxina, entre ellas Rosetta, Origami y BL21. En el caso de Rosetta y Origami, la cantidad obtenida de r-BcsTx1 fue menor, pero se observó que el producto estaba más puro, es decir, se notaban pocas bandas en los geles de SDS-PAGE correspondientes a contaminantes. Con BL21, la cantidad fue mayor, pero se aprecian bandas correspondientes a contaminantes en los geles SDS-PAGE. Por lo cual se decidió trabajar con células BL21 en muestras no marcadas isotópicamente.

Para la purificación de rBcsTx1 se intentó utilizar distintas columnas de cromatografía con el fin de obtener el péptido más puro para llevar a cabo experimentos de RMN, sin embargo, la cantidad que se perdía era más del 30% en cada paso de purificación por lo cual se decidió solo trabajar con la columna de afinidad antes y después del corte con enteroquinasa.

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

---

Se obtuvieron cerca de 6 mg de rBcsTx1 los cuales fueron enviados a análisis de masas, los resultados confirman que la masa molecular observada concuerda con la esperada. Por otra parte, se envió a Dr. Emilio Salceda de la BUAP una muestra para pruebas electrofisiológicas, las cuales revelaron un efecto bloqueador reversible. Esta prueba se realizó en canales de potasio, pero no se realizaron pruebas puntuales en canales  $K_v1.3$ , por lo cual no pueden ser comparables con los resultados obtenidos con la toxina nativa<sup>15</sup>. La concentración probada en estudios electrofisiológicos fue de 3  $\mu\text{M}$  de rBcsTx1.

Cuando se tenían las condiciones establecidas en la proteína no marcada, se intentó realizar el mismo procedimiento en proteína marcada con  $^{15}\text{N}$ , sin embargo, la proteína de fusión se fue a cuerpo de inclusión, ese resultado fue comprobado con geles SDS-PAGE. Los cuerpos de inclusión son agregados citoplasmáticos insolubles de la proteína producidos normalmente en un bajo número de copias, están formados por artefactos estructurales como enlaces disulfuro no nativos, intra o intermolecular<sup>99</sup>. Se intentó recuperar la toxina de los cuerpos de inclusión desplegada y volver a plegarla, pero no se tuvo éxito. Nos dimos cuenta que al cambiar la cepa por Rosetta, la cantidad de proteína que se iba a cuerpos de inclusión era menor, pero desafortunadamente la cantidad que se obtenía no era suficiente para realizar estudios de RMN.

En el caso de BcsTx1 los resultados no fueron los esperados, a pesar de intentar diversas modificaciones en el método de expresión<sup>100</sup>, ésta no era lo suficiente para poder obtener buenas cantidades y una muestra suficientemente pura para poder adquirir espectros de RMN, debido a que el péptido tendía a precipitarse a través del tiempo. Se logró tomar un experimento de 1D en la cual se observa que rBcsTx1 se encontraba desplegado por las señales que se observaron en la región NH. Se intentó volver a purificar, pero las concentraciones eran muy bajas y no se observaban señales en el espectro.

### 9. CONCLUSIONES

- 1) El objetivo general descrito al principio de este trabajo “Determinar la estructura terciaria de la toxina OspTx2b, proveniente de la anémona *Oulactis* sp., y de la toxina BcsTx1 por medio de la técnica Resonancia Magnética Nuclear (RMN)”, se cumplió parcialmente.
- 2) Los estudios de electrofisiología de la recombinante r-BcsTx1 demuestran que el bloqueo en canales de Potasio es menor que el descrito en la toxina nativa.
- 3) La obtención del péptido OspTx2b fue directa mediante el estudio del transcriptoma, esto representa una gran ventaja, debido a que se requiere de pocos organismos y es una forma rápida para encontrar secuencias específicas de interés.
- 4) OspTx2b es una proteína que resultó no tener efecto como bloqueador de canales de potasio Kv1.3. A pesar de que la homología entre BgK, ShK y OspTx2b es de más del 30% y constitución de los enlaces disulfuros es igual a las descritas para toxinas bloqueadoras de canales Kv.
- 5) La estructura de OspTx2b está formada por dos  $\alpha$  hélices que están estabilizada por los enlaces disulfuro, éstos enlaces dan a la toxina una forma globular, esta estructura es muy similar a BgK y ShK.

### 10. PERSPECTIVAS

- 1) En el caso de rBcsTx1 la expresión por el método recombinante fue deficiente, por lo que el método alternativo para obtener mayores cantidades sería por síntesis química.
- 2) El estudio de toxinas basado en información obtenida del transcriptoma puede ser muy útil y puede reducir el tiempo de purificación con respecto a un extracto crudo.
- 3) México posee una enorme variedad de anémonas, por lo que, las caracterizaciones biológicas y estructurales en especies endémicas podrían revelar el descubrimiento de nuevas sustancias.

---

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Phelan, M. A. & Blanquet, R. S. (1985). Characterization of nematocyst proteins from the sea anemones *Aiptasia pallida* (CNIDARIA : ANTHOZOA). 8115, 661–666.
2. Greenwood, P. G. (2009). Acquisition and use of nematocysts by cnidarian predators. *Toxicon* 54, 1065–70.
3. Pantin, B. y. C. F. A. (1942). The excitation of nematocysts.
4. Westfall, J. A., Mccallum, J. D. & Carlin, R. W. (2001). Neuroglandular Synapses in the Pharynx of the Sea Anemone *Aiptasia pallida* (Cnidaria , Anthozoa ) 141, 134–141.
5. Frazão, B., Vasconcelos, V. & Antunes, A. (2012). Sea anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) toxins: an overview. *Mar. Drugs* 10, 1812–51.
6. Ständker, L., Lászlo, B., Garateix, A., Christ, T., Ravensd, U., Salceda, E., Soto, E., Johna, H., Forssmanna, W. G., Aneiros, A. (2006). A new toxin from the sea anemone *Condylactis gigantea* with effect on sodium channel inactivation. *Toxicon* 48, 211–20.
7. Hutton, D. M. C. & Smith, V. J. (1996). Antibacterial Properties of Isolated Amoebocytes from the Sea Anemone *Actinia equina*. *Biol. Bull.* 191, 441.
8. Barhanin, J., Hugues, M., Schweitz, H., Vincent, J. & Lazdunski, M. (1981). Structure-Function Relationships of Sea Anemone Toxin I1 from *Anemonia sulcata* \*. 256, 5764–5769.
9. Beress, L., Beress, R. and Wunderer, G. (1975). Isolation and characterization of three polypeptides with neurotoxic activity from *Anemonia sulcata*. *FEBS Lett.* 50, 311–314.
10. Fautin, D. G. (2009). Structural diversity, systematics, and evolution of cnidae. *Toxicon* 54, 1054–64.
11. Pease, J. H. B. (1989). NMR Studies of Toxin I11 from the Sea Anemone.
12. Daly, M. Brugler, M. R., Cartwright, P., Collins, A. G., Dawson, M. N., Fautin, D. G., France, S. C., Mcfadden, C. S., Opresko, D. M., Rodriguez, E., Romano, S. L. (2007). The phylum Cnidaria : A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus \*. 182, 127–182.
13. Macrander, J., Broe, M. & Daly, M. (2016). Tissue-Specific Venom Composition and Differential Gene Expression in Sea Anemones. *Genome Biol. Evol.* 8, 2358–2375.

14. Vetter, I., Hodgson, W. C., Adams, D. J. & McIntyre, P. (2015). Venoms-Based Drug Discovery: Bioassays, Electrophysiology, High-Throughput Screens and Target Identification. *Venoms to Drugs - Venom as a Source for the Development of Human Therapeutics*.
15. Orts, D. J. B., Peigneur, S., Madio, B., Cassoli, J. S., Montandon, G. G., Pimenta, A. M. C., Bicudo, J. E. P. W., Freitas, J. C., Zaharenko, A. J. & Tytgat, J. (2013). Biochemical and electrophysiological characterization of two sea anemone type 1 potassium toxins from a geographically distant population of *Bunodosoma caissarum*. *Mar. Drugs* 11, 655–79.
16. Jouiaei, M., Yanagihara, A. A., Madio, B., Nevalainen, T. J., Alewood, P. F., Fry, Bryan G. *et al.* (2015). Ancient venom systems: A review on cnidaria toxins. *Toxins (Basel)*. 7, 2251–2271.
17. Honma, T., Kawahata, S., Ishida, M., Nagai, H., Nagashima, Y. & Shiomi, K. (2008). Novel peptide toxins from the sea anemone *Stichodactyla haddoni*. *Peptides* 29, 536–44.
18. Honma, T. & Shiomi, K. (2006). Peptide toxins in sea anemones: structural and functional aspects. *Mar. Biotechnol. (NY)*. 8, 1–10.
19. Honma, T., Hasegawa, Y., Ishida, M., Nagai, H., Nagashima, Y. & Shiomi, Kazu. (2005). Isolation and molecular cloning of novel peptide toxins from the sea anemone *Antheopsis maculata*. *Toxicon* 45, 33–41.
20. Honma, T., Iso, T., Ishida, M., Nagashima, Y. & Shiomi, K. (2003). Occurrence of type 3 sodium channel peptide toxins in two species of sea anemones (*Dofleinia armata* and *Entacmaea ramsayi*). *Toxicon* 41, 637–639.
21. Shiomi, K. (2009). Novel peptide toxins recently isolated from sea anemones. *Toxicon* 54, 1112–8.
22. Anderluh, G. & Maček, P. (2003). Dissecting the Actinoporin Pore-Forming Mechanism. *Structure* 11, 1312–1313.
23. Razpotnik, A., Krizaj, I., Kem, W. R., Macek, P. & Turk, T. (2009). A new cytolytic protein from the sea anemone *Urticina crassicornis* that binds to cholesterol- and sphingomyelin-rich membranes. *Toxicon* 53, 762–9.

24. Kristan, K., Podlesek, Z., Hojnik, V., Gutiérrez-Aguirre, I., Guncar, G., Turk, D., Gonzalez-Mañas, J. M., Lakey, J. H., Macek, P. & Anderluh, Gregor *et al.* (2004). Pore formation by equinatoxin, a eukaryotic pore-forming toxin, requires a flexible N-terminal region and a stable beta-sandwich. *J. Biol. Chem.* 279, 46509–17.
25. García-Linares, S., Richmond, R., García-Mayoral, M. F., Bustamante, N., Bruix, M., Gavilanes, J. G., Martínez-Del-Pozo, Alvaro. (2014). The sea anemone actinoporin (Arg-Gly-Asp) conserved motif is involved in maintaining the competent oligomerization state of these pore-forming toxins. *FEBS J.* 281, 1465–78.
26. García, T., Martínez, D., Palmero, A., Soto, C., Tejuca, M., Pazos, F., Menendez, R., Alvarez, C. & Garateix, A. (2009). Pharmacological effects of two cytolytins isolated from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *J. Biosci.* 34, 891–898.
27. Tejuca, M., Anderluh, G. & Dalla Serra, M. (2009). Sea anemone cytolytins as toxic components of immunotoxins. *Toxicon* 54, 1206–14.
28. Nevalainen, T. J., Peuravuori, H. J., Quinn, R. J., Llewellyn, L. E., Benzie, J. H., Fenner, P. J., Winkel, K. D. (2004). Phospholipase A2 in cnidaria. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 139, 731–5.
29. Mechaly, A. E., Mechaly, Ariel E., Bellomio, A., Gil-Cartón, D., Morante, K., Valle, M., González-Mañas, J. M. & Guérin, D. M. (2011). Structural insights into the oligomerization and architecture of eukaryotic membrane pore-forming toxins. *Structure* 19, 181–91.
30. Tanaka, K., Caaveiro, J. M. M., Morante, K., González-Mañas, J. M. & Tsumoto, K. (2015). Structural basis for self-assembly of a cytolytic pore lined by protein and lipid. *Nat. Commun.* 6, 6337.
31. Wanke, E., Zaharenko, A. J., Redaelli, E. & Schiavon, E. (2009). Actions of sea anemone type 1 neurotoxins on voltage-gated sodium channel isoforms. *Toxicon* 54, 1102–11.
32. Sánchez-Rodríguez, J. & Cruz-Vazquez, K. (2006). Isolation and biological characterization of neurotoxic compounds from the sea anemone *Lebrunia danae* (Duchassaing and Michelotti, 1860). *Arch. Toxicol.* 80, 436–41.
33. Kass-Simon, G. & Pierobon, P. (2007). Cnidarian chemical neurotransmission, an updated overview. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 146, 9–25.



34. Catterall, W. *et al.* (2007). Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon* 49, 124–41.
35. Hessinger, D. A. (1989). Cell form complexes and adjacent receptor- effector in anemone. 21, 17–24.
36. Gutman, G. A. *et al.* (2003). International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of Voltage-Gated Ion Channels : Potassium Channels. **55**, 583–586.
37. Chen, R. & Chung, S.-H. (2015). Computational Studies of Venom Peptides Targeting Potassium Channels. *Toxins (Basel)*. **7**, 5194–211.
38. Gomez-Lagunas, F., Melishchuk, A. & Armstrong, C. M. (2003). Block of Shaker potassium channels by external calcium ions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 347–51.
39. Schweitz, H., Bruhn, T.; Guillemare, E., Moinier, D., Lancelin, J.M., Béress, L. & M. L. (1995). Kalicludines and Kaliseptine two different classes of sea anemone toxins for voltage- sensitive K<sup>+</sup> channels. *J. Biol. Chem.* **270**, 25121–25126.
40. Chem, J. B. (1978). Sea anemone toxin and scorpion toxin share a common receptor site associated with the action potential sodium ionophore. W A Catterall and L Beress Sea Anemone Site Associated Toxin and Scorpion Toxin with the Action Potential Share a Common Receptor Sod.
41. Norton, R. S. (2013). *Sea Anemone Peptides. Handbook of Biologically Active Peptides* Elsevier Inc.
42. Dauplais, M. *et al.* (1997). On the Convergent Evolution of Animal Toxins. *J. Biol. Chem.* **272**, 4302–4309.
43. Manoleras, N. & Norton, R. S. (1994). Three-dimensional structure in solution of neurotoxin III from the sea anemone *Anemonia sulcata*. *Biochemistry* **33**, 11051–61.
44. Gendeh, G. S. *et al.* (1997). A new potassium channel toxin from the sea anemone *Heteractis magnifica*: isolation, cDNA cloning, and functional expression. *Biochemistry* **36**, 11461–11471.
45. Mouhat, S., Jouirou, B. & Mosbah, A. (2003). Diversity of Folds in Animal Toxins Acting on Ion Channels. 13–15.
46. Chen, R. & Chung, S. H. (2014). Binding modes of two scorpion toxins to the voltage-gated potassium channel kv1.3 revealed from molecular dynamics. *Toxins (Basel)*. **6**, 2149–2161.
47. Nelson, D.; Cox, M.; Cuchillo, C. (2000). “Principios de Bioquímica”. 3a ed. Ed. Omega. pp. 423,428-430, 441-444.
48. Lange, A., Giller, K., Hornig, S., Martin-Eauclaire, M.F. Pongs, O. Becker, S. & Baldus, M.. (2006). Toxin-induced conformational changes in a potassium channel revealed by solid-state

- NMR. *Nature* **440**, 959–962.
49. Zhao, R., Dai, H., Mendelman, N., Cuello, L. G. Chill, J. H. & Goldstein, S: A. N.. (2015). Designer and natural peptide toxin blockers of the KcsA potassium channel identified by phage display. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E7013-21.
50. Pennington, M. W. *et al.* (2009). Engineering a stable and selective peptide blocker of the Kv1.3 channel in T lymphocytes. *Mol. Pharmacol.* **75**, 762–73.
51. Chi, V. *et al.* (2012). Development of a sea anemone toxin as an immunomodulator for therapy of autoimmune diseases. *Toxicon* **59**, 529–46.
52. Chhabra, S. *et al.* (2014). Kv1.3 channel-blocking immunomodulatory peptides from parasitic worms: Implications for autoimmune diseases. *FASEB J.* **28**, 3952–3964.
53. Mirshafiey, A. (2007). Venom therapy in multiple sclerosis. *Neuropharmacology* **53**, 353–61
54. Beeton, C. *et al.* (2006). Kv1. 3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. 1–6.
55. Kwan, A. H., Mobli, M., Gooley, P. R., King, G. F. & MacKay, J. P. (2011). Macromolecular NMR spectroscopy for the non-spectroscopist. *FEBS J.* **278**, 687–703
56. Amero, C. (2014). Introducción a la Resonancia Magnética Nuclear. Ed. Prado. México.
57. Rule, G. S., Hitchens, T. K. (2006). Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy. Springer Science & Business Media.
58. Hore, P. J. (2015). Nuclear Magnetic Resonance. Oxford Chemistry Primer. Oxford University Press.
59. Muskett, F. (2011). Sample Preparation, Data Collection and Processing. *Protein NMR Spectrosc. Pract.* 1–8.
60. Steven P. Mielke and V.V. Krishnan. (2009). Characterization of protein secondary structure from NMR chemical shifts. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* **54**, 141–165.
61. Nesbitt, G. J. (1992). Principles of NMR. *TrAC Trends Anal. Chem.* **11**, XVIII.
62. Wagner, G. *et al.* (1987). Protein Structures in Solution by Nuclear Magnetic Resonance and Distance Geometry the Polypeptide Fold of the Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor Determined using Two Different. *J. Mol. Bio* **196**, 611–639.
63. Malmodin, D. & Billeter, M. (2005). High-throughput analysis of protein NMR spectra. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **46**, 109–129
64. Lian, L. & Roberts, G. (1957). Introduction.
65. Perras, F. A. (2016). Quantitative structure parameters from the NMR spectroscopy of quadrupolar nuclei. *Pure Appl. Chem.* **88**, 95–111.
66. Braunschweiler, L. & Ernst, R. R. (1983). Coherence transfer by isotropic mixing: Application

- to proton correlation spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **53**, 521–528.
67. Antonio Rosato, Roberto Tejero, and G. T. M. (2013). Quality Assessment of Protein NMR Structures. *Curr Opin Struct Biol* **23**, 715–724.
68. Lian, L. & Barsukov, I. L. (2011). Resonance Assignments. *Protein NMR Spectrosc. Pract. Tech. Appl.* 55–81.
69. Antuch, W., Berndt, K. D., Chávez, M. a, Delfín, J. & Wüthrich, K. (1993).The NMR solution structure of a Kunitz-type proteinase inhibitor from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Eur. J. Biochem.* **212**, 675–84.
70. Hemmi, H. *et al.* (2005).Structural and functional study of an *Anemonia elastase* inhibitor, a 'nonclassical' Kazal-type inhibitor from *Anemonia sulcata*. *Biochemistry* **44**, 9626–36
71. Zhu, J. *et al.* (2010).Solution structure of BmKalphaTx11, a toxin from the venom of the Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 627–33.
72. Minagawa, S., Ishida, M., Nagashima, Y. & Shiomi, K. (1998).Primary structure of a potassium channel toxin from the sea anemone *Actinia equina*. *FEBS Lett.* **427**, 149–151.
73. Driscoll, P. C., Gronenborn, A. M., Beress, L. & Clare, G. M. (1989).Determination of the Three-Dimensional Solution Structure of the Antihypertensive and Antiviral Protein BDS-I from the Sea Anemone *Anemonia sulcata* : A Study Using Nuclear Magnetic Resonance and Hybrid Distance Geometry-Dynamical Simulated Annealing +. 2188–2198.
74. Turk, T. & Kem, W. R. (2009).The phylum Cnidaria and investigations of its toxins and venoms until 1990. *Toxicon* **54**, 1031–7.
75. García-Linares, S. *et al.* (2013).Three-dimensional structure of the actinoporin sticholysin I. Influence of long-distance effects on protein function. *Arch. Biochem. Biophys.* **532**, 39–45.
76. Castrillo, I. *et al.* (2009). <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, and <sup>15</sup>N NMR assignments of the actinoporin Sticholysin I. *Biomol. NMR Assign.* **3**, 5–7
77. Tudor, J. E., Pennington, M. W. & Norton, R. S. (1998).Ionisation behaviour and solution properties of the potassium-channel blocker ShK toxin. *Eur. J. Biochem.* **251**, 133–141.
78. Kalman, K. *et al.* (1998).ShK-Dap 22, a Potent Kv1. 3-specific Immunosuppressive Polypeptide \*. **273**, 32697–32707.
79. Beeton, C., Pennington, M. W. & Norton, R. S. (2011).Analogues of the sea anemone potassium channel blocker ShK for the treatment of autoimmune diseases. *Inflamm. Allergy Drug Targets* **10**, 313–21.
80. Malpezzi, E. L. A., de Freitas, J., Muramoto, K. & Kamiya, H. (1993).Characterization of peptides in sea anemone venom collected by a novel procedure. *Toxicon* **31**, 853–864
81. Malpezzi, E. L. A., de Freitas, J., Muramoto, K. & Kamiya, H. (1993).Characterization of

- peptides in sea anemone venom collected by a novel procedure. *Toxicon* **31**, 853–864.
82. Vetter, I., Hodgson, W. C., Adams, D. J. & McIntyre, P. (2015). Venoms-Based Drug Discovery: Bioassays, Electrophysiology, High-Throughput Screens and Target Identification. Venoms to Drugs - Venom as a Source for the Development of Human Therapeutics.
83. Gao, B. Gao, Bingmiao Zhangsun, D., Hu, Y., Wu, Y., Sheng, L., Fang, L., Wu, X., Yu, J. & Luo, S. (2013). Expression and secretion of functional recombinant  $\mu$ O-conotoxin MrVIB-His-tag in *Escherichia coli*. *Toxicon* **72**, 81–9.
84. Soo, V., Hwang, J., Chen, T. & Yu, C. (1993). Methods in Interpretation of 2-D NMR Spectra of Polypeptides. *J. Comput. Chem.* **14**, 1164–1171.
85. Schwieters, C. Xplor-NIH : An Introduction.
86. Hinds, G. & Norton, S. CHAPTER 9 NMR Spectroscopy of Peptides and Proteins. **36**, 131–154.
87. David S. Wishart, Colin G. Bigam, Arne Holm\*, R. S. H. and B. D. S. (1995).  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects. *J. Biomol. NMR* **5**, 67–81.
88. Restano-cassulini, R. *et al.* (2006). Species Diversity and Peptide Toxins Blocking Selectivity of  $\alpha$ -go-go – Related Gene Subfamily K  $\text{Ca}^{2+}$  Channels in the Central Nervous System. **69**, 1673–1683.
89. Donovan, R. S., Robinson, C. W., Glick, B.R. (1996) Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *Journal of Industrial Microbiology* **16**, 145–154.
90. Chang, S. C. *et al.* (2012). Expression and isotopic labelling of the potassium channel blocker ShK toxin as a thioredoxin fusion protein in bacteria. *Toxicon* **60**, 840–50.
91. Platzer, G., Okon, M. & McIntosh, L. P. (2014). pH- dependent random coil  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , and  $^{15}\text{N}$  chemical shifts of the ionizable amino acids: A guide for protein pKa measurements. *J. Biomol. NMR* **60**, 109–129.
92. Baxter, N. J. & Williamson, M. P. Temperature dependence of  $^1\text{H}$  chemical shifts in proteins. *J. Biomol. NMR* **9**, 359–369 (1997).
93. Braud, S. *et al.* (2004). BgK, a disulfide-containing sea anemone toxin blocking  $\text{K}^+$  channels, can be produced in *Escherichia coli* cytoplasm as a functional tagged protein. *Protein Expr. Purif.* **38**, 69–78.
94. Salceda, E. (2009). Neurotoxinas : **74**, 29–37 *Elementos* **74**, 29-37.
95. Anderluh, G. & Macek P. (2002). Capítulo 8 Actinoporins, pore-forming toxins of sea anemones (Actiniaria) Pore-forming peptides and protein toxins. 132–148.

96. Norton, R. S., Pennington, M. W. & Beeton, C. (2015).CHAPTER 10. Case Study 2: Transforming a Toxin into a Therapeutic: the Sea Anemone Potassium Channel Blocker ShK Toxin for Treatment of Autoimmune Diseases. *RSC Drug Discov. Ser.*, 255–274.
97. Beeton, C., Chandy, K. G., Iadonato, S. P., Munoz-Elias, E. & Tarcha, E. J. 38. (2012).Development of the Sea Anemone Toxin ShK-186 for the Treatment of Autoimmune Diseases: PK and ADME Perspectives. *Toxicon* **60**, 114.
98. Kopito, R. R. (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* **10**, 524–530.
99. Lara, A. R. (2011). Revista Mexicana de Ingeniería Química. *Rev. Mex. Ing. Química* **10**, 209–223.
100. Hass, M. A. S. & Mulder, F. A. A. (2015).Contemporary NMR Studies of Protein Electrostatics. *Annu. Rev. Biophys.* **44**, 53–75
101. Messerli, S. M. & Greenberg, R. M. (2006). Cnidarian Toxins Acting on Voltage-Gated Ion Channels. *Mar. Drugs* **4**, 70–81.

**ANEXO 1 SUSTANCIAS**

## MEDIO DE CULTIVO YT2X

CANTIDAD	REACTIVO	VOLUMEN TOTAL
16 g	Peptonona de caseína	1 L
10 g	Extracto de levadura	
5 g	NaCl	

pH 7.0

## MEDIO DE CULTIVO CAJAS PETRI

CANTIDAD	REACTIVO	VOLUMEN TOTAL
10 g	Peptona de caseína	1 L
5 g	Extracto de levadura	
10 g	NaCl	
15 g	Agar	

pH 7.0

## MEDIO MÍNIMO M9

SUSTANCIA	CANTIDAD
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	15 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	64 g
$\text{NaCl}$	2.5 g
$\text{NH}_4\text{Cl}$	5.0 g
GLUCOSA	4 g
$\text{MgSO}_4$	1 mL
$\text{CaCl}_2$	1 mL
$\text{MnCl}_2$	1 mL
$\text{ZnSO}_4$	0.50 mL
$\text{FeCl}_3$	2 mL
Vitaminas	10 mL

## ANTIBIÓTICO

SUSTANCIA	CANTIDAD
Ampicilina	100 $\mu\text{g/mL}$
Kanamicina	30 $\mu\text{g/mL}$

## BUFFER DE PURIFICACIÓN

## CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD:

COLUMNA Hi Trap- Ni<sup>2+</sup> 5 mL (agarosa 6%, tamaño de partícula 34 µm, capacidad del metal ion ~15 µmol Ni<sup>2+</sup>/ml). Gradiente escalonado. Flujo 1 mL/min.

## Buffer de Equilibrio:

SUSTANCIA	CONCENTRACIÓN
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.02 M
NaCl	0.5 M
Imidazol	0.08 M

pH 7.4

## Buffer de Elución:

SUSTANCIA	CONCENTRACIÓN
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.02 M
NaCl	0.5 M
Imidazol	0.5 M

pH 7.4

## CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR:

COLUMNA Superdex 75 (agarosa y dextrano) Flujo 1.5 mL/min.

## Buffer de Equilibrio:

SUSTANCIA	CONCENTRACIÓN
Tris HCl	0.025 M
NaCl	0.05 M
CaCl <sub>2</sub>	0.002 M

pH 7.6



---

## CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO COLUMNA

Buffer de Equilibrio:

SUSTANCIA	CONCENTRACIÓN
Tris Base	0.02 M

pH 8.0

Buffer de Elución:

SUSTANCIA	CONCENTRACIÓN
Tris Base	0.02 M
NaCl	1 M

pH 8.0

## BUFFER DE CORTE

Buffer de Corte con Enteroquinasa (Ek)

SUSTANCIA	CONCENTRACIÓN
Tris HCl	0.025 M
NaCl	0.05 M
CaCl <sub>2</sub>	0.002 M

pH 7.6

**ANEXO 2 GELES SDS- PAGE AL 15% (3 kDa- 100 kDa)****GEL DE SEPARACIÓN**

<b>REACTIVO</b>	<b>CANTIDAD (total 10 mL)</b>
Agua	2.2 mL
Acrilamida/Bis-acrilamida (30%/0.8% w/v)	5 mL
1.5 M Tris (pH= 8.8)	3.6 mL
10 % (w/v) SDS	0.1 mL
10 % (w/v) Persulfato de Amonio	100 µL
TEMED	10 µL

**PRE- GEL**

<b>REACTIVO</b>	<b>CANTIDAD (total 5 mL)</b>
Agua	2.975 mL
Acrilamida/Bis-acrilamida (30%/0.8% w/v)	0.67 mL
0.5 M Tris (pH= 6.8)	1.25 mL
10 % (w/v) SDS	0.05 mL
10 % (w/v) Persulfato de Amonio	0.05 mL
TEMED	0.005 mL

**5X SAMPLE BUFFER (BUFFER DE CARGA)**

<b>REACTIVO</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>
SDS	10 % w/v
β- Mercaptoetanol	10 mM
Glicerol	20 % v/v
Tris- HCl, pH 6.8	0.2 M
Azul de Bromofenol	0.05% w/v

## BUFFER DE CORRIMIENTO 1X

<b>REACTIVO</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>
Tris-HCl	25 mM
Glicina	200 mM
SDS	0.1% (w/v)

### ANEXO 3 CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES

A partir de una alícuota de células, se realizaron células quimiocompetentes, para su uso posterior. Se probaron diferentes tipos de cepas con el fin de seleccionar la cepa con mejor expresión para r-BcsTx1Tx1, a continuación se describe la metodología:

Las siguientes soluciones se preparan y se mantienen en frío:

Solución 1: 100 mM Cloruro de Rubidio, 30 mM de Cloruro de Calcio, 50 mM de Cloruro de Manganeso (II), 30mM Acetato de Potasio, 15% Glicerol pH 5.8.

Solución 2: 10 mM MOPS, 10mM Cloruro de Rubidio, 75 mM Coruro de Calcio, 15% Glicerol pH 6.8.

1. Plaquear en una caja de petri sin antibiótico 1  $\mu$ L de la cepa a utilizar.
2. Dejarlas en la incubadora a 37 ° C, durante 14 h.
3. Esterilizar:
  - a) 2 L de H<sub>2</sub>O
  - b) 1 L de Medio 2XTY
  - c) Botes para centrifuga
4. Seleccionar una colonia y llevarla a 10 mL de medio y dejarlo crecer a 37 ° C toda la noche.
6. Inocular 1 L de medio con los 10 mL de precultivo, despues de 15- 20 min medir la DO<sub>600</sub> hasta llegar a 0.5.
7. Dejar en hielo por 5-10 min, y colocarlo 250 mL en botes para centrifuga esteriles.
8. Centrifugar por 5 min a 4 000 rpm a 4°C.
9. Resuspender el pellet en 60 mL de Solución 2 y mantener la suspensión por 90 min.
10. Centrifugar a 4000 rpm por 5 min.
11. Resuspender las células en 8 mL de Solución 1.
12. Tomar alíquotas de 100  $\mu$ L y congelar con N<sub>2</sub> (l).
14. Guardar alíquotas a -70 °C.

## ANEXO 4 TRANSFORMACIÓN

Se tomó una alícuota de las cepas BL21 ó Rosetta, se dejó descongelar por 15 min y se agregó 1  $\mu$ L de plásmido llamado pET32a-BcsTx1. Se transformó la mezcla por choque térmico, siguiendo la siguiente metodología:

1. Reposar la mezcla en hielo por 30 min
2. Calentar la mezcla por 1:30 min a 42 °C
3. Dejar la mezcla por 2 min en hielo
4. Agregar 400 mL de medio 2XTY (ver Apéndice) a la mezcla
5. Dejar incubar la muestra por 1 h a 37 °C a 200 rpm
6. Tomar 100  $\mu$ L/mL de la muestra y plaquear la muestra en una caja de petri con el antibiótico correspondiente.
7. Dejar incubar la caja petri por 37°C toda la noche.

### PUBLICACIONES

- ✓ Mayo 2015. Artículo de divulgación. Vórtice No. 6. “El mar: un almacén de fármacos” pp. 16-17.
- ✓ Synthesis, folding, structure and activity of a predicted peptide from the sea anemone *Oulactis sp.* with an ShKT fold. TOXCON5887. Toxicon.
- ✓ Identification, chemical synthesis, structure and function of a new KV1 channel blocking peptide from *Oulactis sp.* PEP224073. Peptide Science.

### TRABAJOS EN CONFERENCIAS

**Julio 2017** Presentación del cartel “Solution structure and functional characterization of a potassium channel blocking peptide OspTx2b from sea anemone *Oulactis sp.*” 20th International Society of Magnetic Resonance Conference (ISMAR), Québec, Canada.

**Febrero 2017** Presentación del cartel “Recombinant expression and structure determination of acrorhagin I, an intraspecies defense toxin from the sea anemone *Actinia equina*”. 42nd Lorne Conference on Protein Structure and Function. Victoria, Australia.

**Agosto 2015** Presentación del cartel “NMR Studies of Recombinant BcsTx1 Toxin”. 19th International Society of Magnetic Resonance Conference (ISMAR), Shanghai, China.

**Noviembre 2014** Presentación del cartel “Expression and isotopic labelling of sea anemone toxin BcsTx1”. XXX Congreso Nacional de Bioquímica. Guadalajara, Jalisco.

## 13. PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES DEL TRABAJO

---

**Octubre 2014** Presentación del cartel “Expresión y purificación de la toxina recombinante BcsTx1 proveniente de la anémona *Bunodosoma caissarum*”. VI Congreso del Posgrado en Ciencias. Cuernavaca, Morelos.