



# Universidad Nacional Autónoma de México

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas

“Estudio estructural por RMN de péptidos tipo escorpina y  
GS-Tt28”

Tesis

Para optar por el grado de  
**Doctor en Ciencias**

Presenta

**M. en C. David Flores Solís**

Tutor

Dr. José Federico del Río Portilla  
Instituto de Química UNAM

Ciudad de México, CU, agosto de 2016

## Agradecimientos

Me complace poder expresar mi gratitud en estas líneas a todas las personas e instituciones que contribuyeron a la integración de esta tesis de grado. Comienzo con el agradecimiento a los integrantes del jurado por su invaluable participación y esfuerzo durante la revisión de este trabajo escrito.

### **Miembros del jurado**

Presidente	Dra. Adela Rodríguez Romero	Instituto de Química, UNAM
Vocal	Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas	CINVESTAV, IPN
Vocal	Dra. Nuria Esturau Escofet	Instituto de Química, UNAM
Vocal	Dra. Karina Martínez Mayorga	Instituto de Química, UNAM
Secretario	Dr. Luis Fernando Olguín Contreras	Facultad de Química, UNAM

Extiendo el agradecimiento a los integrantes de mi comité tutor que semestre a semestre evaluaron el desarrollo de los proyectos y acompañaron las investigaciones hasta su culminación.

### **Comité tutor**

Dra. Adela Rodríguez Romero	Instituto de Química, UNAM
Dr. Gerardo Corzo Burguete	Instituto de Biotecnología, UNAM

Agradezco de la forma más profunda y franca a mi tutor, el Dr. José Federico del Río Portilla, por toda su sabiduría, paciencia y sobre todo por su entereza ética, demostrada día a día. Su personalidad plétórica de humanismo continúa siendo para mí una gran fuente de inspiración.

Los proyectos de investigación que integran esta tesis de grado fueron posibles gracias a los apoyos económicos otorgados por:

- El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT):
  - Beca de doctorado 240052.
  - Proyecto de investigación 166472.
- La Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM):
  - Proyecto PAPIIT IN207713.

## Lugar de trabajo, publicación y presentaciones en congresos

Este trabajo se realizó bajo la supervisión del Dr. José Federico del Río Portilla dentro el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México en los siguientes laboratorios:

- Laboratorio 1 del departamento de Química de Biomacromoléculas
- Laboratorio de Biología Molecular del departamento de Química de Biomacromoléculas.  
Responsable: Dra. Patricia Cano Sánchez
- Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear UNAM.  
Responsable: Dra. Nuria Esturau Escofet

Los resultados del capítulo 2 fueron publicados en el artículo "*Solution structure and anti-parasitic activity of scorpine-like peptides from Hoffmannihadrurus gertschi*"; aceptado para su publicación en la revista "*FEBS Letters*" el 7 de junio de 2016 (DOI: 10.1002/1873-3468.12255; Apéndice A.4).

Los avances y resultados experimentales incluidos en este trabajo fueron presentados en las siguientes conferencias:

- *56th Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference, April 19 - 24, 2015, Asilomar Conference Center, Pacific Grove, California; Poster session "Structural Aspects of Tt28: Diversity in the Folding of Alpha-toxins Confirmed by NMR Spectroscopy".*
- *57th Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference, April 10 - 15, 2016, Wyndham Grand Hotel, Pittsburgh, Pennsylvania; Poster session "Structural NMR and Anti-Parasitic Characterization of Scorpine-Like Peptides from the Scorpion Hadrurus gertschi".*

## Resumen

Esta tesis de grado contiene dos proyectos de investigación independientes donde se emplea resonancia magnética nuclear (RMN) para la determinación estructural de proteínas. En el primer capítulo de este trabajo se describen las generalidades que comparten ambos proyectos. En la sección 1.1 se da una introducción breve sobre alacranes profundizando en la descripción de los componentes proteicos del veneno y sus principales características. En la sección 1.2 se describe la estrategia para la determinación estructural de péptidos y proteínas por RMN resaltando los aspectos fundamentales. La última sección del capítulo incorpora al texto el diseño experimental para cubrir los objetivos de este trabajo, comenzando con la clonación y producción de péptidos recombinantes. La sección continua con la descripción de las estrategias de purificación cromatográficas y la caracterización de conectividades de los enlaces disulfuro por espectrometría de masas MALDI-TOF. La última parte de esta sección cierra el capítulo con la descripción de la metodología empleada por los doctores Oscar Rodríguez y Yanis Toledano para la realización de las pruebas de actividad antiparasitaria con los péptidos tipo escorpina.

El primero de los proyectos de investigación (capítulo 2) fue realizado sobre los péptidos tipo escorpina Hge36 y HgeD. Los péptidos tipo escorpina se han identificado en el veneno de alacranes pertenecientes a diferentes géneros. Su actividad biológica es diversa ya que puede ser tanto de agentes citolíticos como de péptidos antimicrobianos, o incluso pueden actuar como bloqueadores de canales iónicos de potasio. El plegamiento de este tipo de péptidos no se ha explorado completamente; sin embargo, se conoce que la diferenciación de su actividad está relacionada a dos regiones localizadas en los extremos amino y carboxilo terminal. A la región amino de los péptidos tipo escorpina se le atribuye la actividad citolítica y antimicrobiana, mientras que el extremo carboxilo se ha comparado y relacionado con secuencias de péptidos con actividad sobre canales iónicos. En este capítulo, queda manifiesto el tipo de plegamiento que adoptan los péptidos tipo escorpina del alacrán mexicano *Hoffmannihadrurus gertschi* Hge36 y su versión trunca HgeD. Los reportes estructurales de ambos péptidos son los primeros modelos de la subfamilia 3 de toxinas beta de alacrán. Con estos modelos se brinda una explicación sobre la modulación de la actividad biológica regulada por la presencia de cuatro aminoácidos localizados en el extremo amino terminal de Hge36. Finalmente, se reporta el uso de los péptidos como agentes antiparasitarios mediante los ensayos de actividad en *Taenia crassiceps*, *Entamoeba histolytica* y con las pruebas citotóxicas realizadas en linfocitos de sangre periférica humana.

El segundo proyecto, descrito en el capítulo 3, profundiza en los aspectos estructurales de Tt28; una toxina bloqueadora de canales iónicos de potasio (término abreviado como KTx) con especificidad por canales iónicos de potasio dependientes de voltaje del subtipo 1.3 (Kv1.3). Los resultados demuestran que el plegamiento de la toxina producida en *E. coli* es significativamente distinto al del péptido nativo, pero con algunas similitudes que dan la pauta para suponer que el mecanismo de plegamiento dentro de la bacteria modifica la conformación. Este proyecto queda abierto a la inducción del plegamiento nativo en la toxina recombinante ya que esto es la clave para determinar si la estructura nativa de Tt28 es similar a la de sus homólogos Tt2b y Ts16.

En suma, en esta tesis se subraya la relevancia de coleccionar evidencia a nivel molecular para establecer cuáles son las características estructurales que afectan directamente la función biológica de cada péptido. Con los resultados y el análisis de las estructuras se puede pensar en generar alternativas terapéuticas mimetizando la interacción de las toxinas sobre sus blancos celulares.

# Contenido

<u>AGRADECIMIENTOS</u>	<u>III</u>
<u>LUGAR DE TRABAJO, PUBLICACIÓN Y PRESENTACIONES EN CONGRESOS</u>	<u>IV</u>
<u>RESUMEN</u>	<u>V</u>
<u>CONTENIDO</u>	<u>VII</u>
<u>SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS</u>	<u>IX</u>
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	<u>X</u>
<u>LISTA DE TABLAS</u>	<u>XI</u>
<u>CAPÍTULO 1 ESTUDIO DE TOXINAS DE ALACRÁN POR RESONANCIA MAGNÉTICA</u>	
<u>NUCLEAR</u>	<u>1</u>
1.1 INTRODUCCIÓN: ALACRANES Y TOXINAS DE ALACRÁN	2
1.2 DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	5
1.2.1 FUNDAMENTOS	6
1.3 DISEÑO EXPERIMENTAL	24
1.3.1 BIOSÍNTESIS DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	24
1.3.2 PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA Y CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS	27
1.3.3 CORTE CON BROMURO DE CIANÓGENO	27
1.3.4 DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	28
1.3.5 ENSAYOS DE ACTIVIDAD	29
<u>CAPÍTULO 2 PÉPTIDOS TIPO ESCORPINA HGE36 Y HGED</u>	<u>32</u>
2.1 INTRODUCCIÓN: PÉPTIDOS TIPO ESCORPINA	33
2.2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	35
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
2.3.1 BIOSÍNTESIS	36
2.3.2 PURIFICACIÓN Y CONECTIVIDAD DE PUENTES DISULFURO	38
2.3.3 ESTRUCTURAS DE rHGE36 Y HGED RESUELTAS POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	40
2.3.4 ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA	48
2.4 CONCLUSIONES	54

<b>CAPÍTULO 3 GS-Tt28</b>	<b>55</b>
<b>3.1 INTRODUCCIÓN: UNA ALTERNATIVA DE PLEGAMIENTO</b>	<b>56</b>
<b>3.2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>58</b>
<b>3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>59</b>
3.3.1 BIOSÍNTESIS, PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN	59
3.3.2 ESTRUCTURA	62
<b>3.4 CONCLUSIONES</b>	<b>68</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>69</b>
<b>APÉNDICES</b>	<b>73</b>
<b>A.1 MEDIOS DE CULTIVO</b>	<b>73</b>
<b>A.2 DISOLUCIONES AMORTIGUADORAS</b>	<b>74</b>
<b>A.3 EXPERIMENTOS 3D Y ASIGNACIÓN DE LOS ESPECTROS DE rHGE36</b>	<b>76</b>
<b>A.4 PUBLICACIÓN DEL TRABAJO</b>	<b>81</b>

## Símbolos y abreviaturas

$^1\text{H}$	Hidrógeno	<b>DPFGE</b>	Double Pulsed Field Gradient Spin Echo
$^1\text{H}\alpha$	Hidrógeno en la posición <i>alfa</i>	<b>RP-HPLC</b>	Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography
$^1\text{H}\beta$	Hidrógeno en la posición <i>beta</i>	<b>IPTG</b>	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
$^1\text{HN}$	Hidrógeno de amida de un aminoácido	<b>KTx</b>	Toxina bloqueadora de canales iónicos de potasio.
$^2\text{H}$ ó <b>D</b>	Deuterio (isotopo)	<b>LB</b>	Luria Bertani
$^{13}\text{C}$	Carbono trece (isotopo)	<b>LHI-III</b>	Disolución amortiguadora para lavado de columnas HiTrap I-III
$^{13}\text{C}\alpha$	Carbono 13 en la posición <i>alfa</i>	<b>MALDI-TOF</b>	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight
$^{13}\text{C}\beta$	Carbono 13 en la posición <i>beta</i>	<b>MHz</b>	Mega Hertz
$^{15}\text{N}$	Nitrógeno quince (isotopo)	<b>NOE</b>	Nuclear Overhauser Effect
$^nJ_{ab}$	Constante de acoplamiento escalar “J” a “n” enlaces de distancia entre los núcleos “a” y “b”	<b>NOESY</b>	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
<b>aa</b>	Aminoácido(s)	<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico	<b>PDB</b>	Protein Data Bank
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico	<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonyl Fluoride
<b>BCI-II</b>	Disolución amortiguadora de Corte I o II	<b>PVDF</b>	Polyvinylidene fluoride
<b>BEI</b>	Disolución amortiguadora de Elución I o II	<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>BLI-II</b>	Disolución amortiguadora de Lisis I-II	<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>BMRB</b>	Biological Magnetic Resonance Bank	<b>RMSD</b>	Root Mean Square Deviation
<b>CAMQ</b>	Cromatografía de Afinidad Metal Quelato	<b>SDS-PAGE</b>	Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis
<b>COSY</b>	Correlated spectroscopy	<b>TCEP</b>	Tris (2-CarboxyEthyl) Phosphine
<b>CS- <math>\alpha</math> / <math>\alpha</math></b>	Cysteine Stabilized alpha-alpha motif	<b>TFA</b>	Trifluoroacetic Acid
<b>CS-<math>\alpha</math>/<math>\beta</math></b>	Cysteine Stabilized alpha-beta motif	<b>TOCSY</b>	Total correlated spectroscopy
<b><math>\delta</math></b>	Desplazamiento químico		



# Lista de figuras

FIGURA 1.1. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LAS ESPECIES DE ALACRANES EN EL PLANETA.....	2	FIGURA 2.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS PÉPTIDOS TIPO ESCORPINA.....	39
FIGURA 1.2. REPRESENTACIONES DEL ESPÍN NUCLEAR I Y DEL MOMENTO MAGNÉTICO M.....	7	FIGURA 2.4. DETERMINACIÓN DE LA CONECTIVIDAD DE LOS PUENTES DISULFURO EN rHG36.....	40
FIGURA 1.3. MAGNETIZACIÓN B <sub>1</sub> .....	8	FIGURA 2.5. GRÁFICOS DEL NÚMERO Y TIPO DE RESTRICCIONES PARA rHG36.....	42
FIGURA 1.4. MANIPULACIÓN DEL VECTOR MAGNÉTICO B <sub>1</sub> , RELAJACIÓN TRANSVERSAL Y DETECCIÓN DEL DECAIMIENTO LIBRE DE LA INDUCCIÓN (FID).....	9	FIGURA 2.6. CONTACTOS NOE EN rHG36.....	43
FIGURA 1.5. TRANSFORMADA DE FOURIER.....	10	FIGURA 2.7. ÍNDICE DE CARBONO 13 EN LA POSICIÓN ALFA ( <sup>13</sup> C <sub>α</sub> ).....	44
FIGURA 1.6. DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS DE LOS GRUPOS PROTONES DE UNA PROTEÍNA.....	11	FIGURA 2.8. RESTRICCIONES NOE PARA EL MODELO ESTRUCTURAL DE HGED.....	45
FIGURA 1.7. PATRONES COSY Y TOCSY DEL TRIPTÓFANO.....	12	FIGURA 2.9. CONTACTOS NOE EN HGED.....	45
FIGURA 1.8. RELAJACIÓN LONGITUDINAL DEL VECTOR MAGNÉTICO B <sub>1</sub> .....	13	FIGURA 2.10. REPRESENTACIÓN EN LISTONES DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE rHG36 (A) Y HGED (B).....	47
FIGURA 1.9. ACOPLAMIENTO DIPOLAR.....	14	FIGURA 2.11. PRUEBAS DE ACTIVIDAD EN CISTICERCOS (TAENIA CRASSICEPS; A-D) Y AMIBAS (ENTAMOEBIA HISTOLYTICA E-G).....	49
FIGURA 1.10. EFECTO DEL MOVIMIENTO MOLECULAR SOBRE EL FENÓMENO DE RELAJACIÓN TRANSVERSAL.....	15	FIGURA 2.12. GRÁFICAS DE CITOLOGÍA DE FLUJO.....	52
FIGURA 1.11. REPRESENTACIÓN MATRICIAL DE LOS DATOS NECESARIOS PARA GENERAR UN ESPECTRO EN 2 DIMENSIONES.....	16	FIGURA 3.1. ESTRUCTURAS DE Tt2B (A Y C) Y Ts16 (B Y D).....	57
FIGURA 1.12. ESQUEMA DE UNA SECUENCIA DE PULSOS PARA OBTENER UN ESPECTRO EN 2 DIMENSIONES.....	17	FIGURA 3.2. CINÉTICAS DE EXPRESIÓN A 30 °C Y 0.5 mM DE IPTG.....	60
FIGURA 1.13. COLECCIÓN DE ESPECTROS EN FUNCIÓN DE LOS VALORES DE T <sub>1</sub> .....	17	FIGURA 3.3. ESPECIES PARCIALMENTE REDUCIDAS DE GS-Tt28 GENERADAS VÍA REPLEGAMIENTO.....	61
FIGURA 1.14. ESQUEMA DE LA SECUENCIA DE PULSOS PARA GENERAR UN ESPECTRO EN 3 DIMENSIONES.....	18	FIGURA 3.4. PURIFICACIÓN DE GS-Tt28 POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (A) Y DETERMINACIÓN DE LA CONECTIVIDAD DE PUENTES DISULFURO (B).....	62
FIGURA 1.15. EXPERIMENTOS EN 3D.....	18	FIGURA 3.5. EXPERIMENTOS NOESY DE GS-Tt28 A DISTINTAS CONCENTRACIONES.....	63
FIGURA 1.16. EXPERIMENTO HNCO.....	19	FIGURA 3.6. REPRESENTACIÓN ESTEREORCÓPICA DE LA TOXINA GS-Tt28.....	64
FIGURA 1.17. EXPERIMENTO HN(CA)CO.....	20	FIGURA 3.7. REPRESENTACIÓN DE LISTONES DE LA ESTRUCTURA Y ALGUNAS CADENAS LATERALES DE GS-Tt28.....	65
FIGURA 1.18. ESQUEMAS DE PULSOS SUAVES Y FUERTES (RF) APLICADOS DURANTE LAS SECUENCIAS WATERGATE (PFGSE) Y DPGFSE.....	21	FIGURA 3.8. ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE Tt28, Tt2B Y Ts16.....	66
FIGURA 1.19. DISEÑO DE LOS PLÁSMIDOS pET32A-rHG36 (INCISO A) Y pET32A-GS-Tt28 (INCISO B).....	25	FIGURA 3.9. ESPECTROS DE HIDRÓGENO 1H DE A) Tt28 NATIVA Y B) GS-Tt28.....	67
FIGURA 2.1. CINÉTICAS DE EXPRESIÓN A 30 °C Y 0.5 mM DE IPTG.....	37		
FIGURA 2.2. GEL SDS-PAGE DE LA CINÉTICA DE CORTE ENZIMÁTICO DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN QUE CONTIENE A rHG36.....	38		

## Lista de tablas

TABLA 2.1. RESTRICCIONES DE DISTANCIAS OBTENIDAS EN EL PROGRAMA CYANA 2.1 PARA LA DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL POR RMN DE RHGE36 Y HGED.....	41
TABLA 2.2. DATOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL 50 (LC50) DE LOS PÉPTIDOS TIPO ESCORPINA CONTRA CISTICERCOS ( <i>TAENIA CRASSICEPS</i> ) .....	50
TABLA 2.3. DATOS PARA DETERMINAR LA LC50 DEL FÁRMACO PRAZINQUATEL E INFLUENCIA DEL VEHÍCULO DEL FÁRMACO (EXPERIMENTOS CONTROL). .....	51
TABLA 2.4. DATOS CRUDOS DE LA CITOLOGÍA DE FLUJO. ....	52
TABLA 3.1. RELACIÓN DE PESOS MOLECULARES Y FRAGMENTOS CARACTERÍSTICOS PARA DOS DE LAS CONECTIVIDADES PROBABLES DEL PÉPTIDO GS-Tt28.....	62
TABLA 3.2. RESTRICCIONES DE DISTANCIA OBTENIDAS EN CYANA2.1 PARA LA ESTRUCTURA DEL PÉPTIDO RECOMBINANTE GS-Tt28 .....	64
TABLA A.0.1. DISOLUCIONES AMORTIGUADORAS UTILIZADAS EN LA LISIS Y CORTE DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN. ....	75
TABLA A.0.2. DISOLUCIONES AMORTIGUADORAS UTILIZADAS EN LA PURIFICACIÓN LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN. ....	75

# Capítulo 1 Estudio de toxinas de alacrán por resonancia magnética nuclear

---

<b>1.1 INTRODUCCIÓN: ALACRANES Y TOXINAS DE ALACRÁN.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS POR RESONANCIA</b>	
<b>MAGNÉTICA NUCLEAR.....</b>	<b>5</b>
1.2.1 FUNDAMENTOS.....	6
<b>1.3 DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>24</b>
1.3.1 BIOSÍNTESIS DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES .....	24
1.3.2 PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA Y	
CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	27
1.3.3 CORTE CON BROMURO DE CIANÓGENO.....	27
1.3.4 DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL POR RESONANCIA MAGNÉTICA	
NUCLEAR .....	28
1.3.5 ENSAYOS DE ACTIVIDAD .....	29

---

## 1.1 Introducción: Alacranes y toxinas de alacrán

Los alacranes\* son organismos pluricelulares cuya aparición en la tierra data aproximadamente de 420 millones de años<sup>1</sup>. Pertenecen al reino animal dentro del filo *Arthropoda* subfilo *Chelicerata*. En la actualidad existen más de dos mil cien especies agrupadas en 190 géneros los cuales a su vez integran 16-19 familias, dependiendo de la clasificación. De las especies conocidas solo una pequeña fracción de ellas (alrededor de 50) son nocivas para los humanos. Los especímenes letales pertenecen principalmente a las familias *Buthidae* y *Hemiscorpiidae*; además de algunos especímenes recientemente identificados en la familia *Scorpionidae*. En la Figura 1.1 se muestra un mapa donde se enfatiza de color negro las zonas geográficas con la presencia de al menos una especie de alacrán.



Figura 1.1. Distribución geográfica de las especies de alacranes en el planeta. El hábitat se resalta en color negro. Con esta figura se puede destacar la capacidad de adaptación de las diferentes especies a los climas terrestres del planeta.

Los alacranes son los principales predadores de los artrópodos. Se alimentan de forma oportunista cazando insectos relativamente pequeños, utilizando principalmente los pedipalpos (tenazas) para rastrear y someter a su presa. Aunque son animales ponzoñosos, el veneno lo utilizan preferentemente para presas de mayor tamaño; o bien, en contra de depredadores y otros alacranes como un mecanismo de defensa.

---

\* En español, las palabras alacrán y escorpión poseen el mismo significado. El primer vocablo es la adaptación del término árabe al español; mientras que el segundo término proviene del latín *scorpio*.

Las sustancias tóxicas se sintetizan dentro de la vesícula del veneno localizada en el telson del animal (extremo posterior del cuerpo) en dos glándulas rodeadas por tejido muscular. El veneno es expulsado a través del aguijón mediante la contracción del músculo mencionado. Los compuestos tóxicos difunden rápidamente en el organismo atacado con un efecto dependiente de la cantidad de veneno introducida y de la toxicidad de las moléculas.

El envenenamiento por picadura de alacrán es un problema de salud pública en países con especies endémicas. En el año 2012 se registraron más de 2,600 muertes alrededor del mundo relacionadas con picaduras de alacrán, donde la población más susceptible fueron niños pequeños o personas con alguna enfermedad. La agresión de los alacranes en contra de humanos generalmente responde más a un mecanismo de defensa. La aparición de los componentes nocivos en contra de mamíferos puede deberse a la interacción ancestral que han mantenido los roedores y alacranes a lo largo de su evolución.

Los componentes del veneno varían de especie a especie, pero de modo general se ha logrado identificar la presencia de sales inorgánicas, polisacáridos, ácidos nucleicos, inhibidores de proteasas, fosfolipasas, histamina y serotonina dentro del veneno. Además de estos componentes, en la fracción tóxica del veneno se han identificado proteínas y péptidos con actividad citolítica o de bloqueo sobre alguno de los distintos tipos de canales iónicos de sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ), calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) o cloro ( $\text{Cl}^-$ )<sup>2</sup>. Los agentes citolíticos son generalmente péptidos de distintos tamaños cuya caracterización ha permitido desarrollar aplicaciones biotecnológicas interesantes; por ejemplo, la escorpina producida por el alacrán *Pandinus imperator* fue usada para interrumpir el ciclo de reproducción del parásito *Plasmodium berghei* originalmente en ensayos *in vitro*<sup>3</sup>. Este grupo de moléculas junto con las toxinas que afectan los canales iónicos de  $\text{Ca}^{2+}$  (CaTx) y  $\text{Cl}^-$  (ClTx) son parte minoritaria de la fracción tóxica del veneno. Las toxinas más abundantes actúan en canales de  $\text{Na}^+$  (NaTx) dependientes de voltaje ( $\text{Na}_v$ ) y sobre canales que regulan la entrada de  $\text{K}^+$  al interior de la célula (KTx).

Las NaTx son péptidos de 60-76 aminoácidos con puentes disulfuro también conocidas como “toxinas de cadena larga”. Esta familia se divide en toxinas  $\alpha$ -NaTx y  $\beta$ -NaTx de acuerdo al sitio que se unen en de los canales  $\text{Na}_v$ . Las toxinas de la familia  $\alpha$ - interactúan directamente con el sitio 3 y son más abundantes en los alacranes del viejo mundo (África-Europa-Asia); mientras que las toxinas de la familia  $\beta$ - interactúa en el sitio número 4 y se encuentran con mayor frecuencia en los alacranes del nuevo mundo (principalmente identificadas en las especies de Norteamérica)<sup>4,5</sup>. En general, el plegamiento de ambas familias está compuesto por una hélice alfa y tres hebras betas que forman una hoja antiparalela, elementos de estructura secundaria estabilizados por la presencia

de 4 puentes disulfuro. A este conjunto de elementos estructurales conformado por al menos una hélice alfa, una hoja beta estabilizado por puentes disulfuro se identifica como un motivo estructural CS- $\alpha/\beta$  (abreviado del término en inglés cistein stabilized alfa-helix beta-sheet motif).

Los péptidos bloqueadores de canales iónicos de potasio, también llamados “toxinas de cadena corta”, son las toxinas más abundantes en el veneno y por tanto las más estudiadas. Las KTx se dividen en 4 familias:  $\alpha$ -KTx,  $\beta$ -KTx,  $\gamma$ -KTx y  $\kappa$ -KTx. La familia alfa se integra por péptidos de 23 a 42 aminoácidos<sup>6</sup>. El plegamiento que caracteriza a esta familia es un motivo estructural CS- $\alpha/\beta$ , compuesto por una hélice alfa cercana al extremo amino terminal y complementado por una hoja beta antiparalela compuesta por 2-4 hebras orientada hacia el extremo carbonilo terminal. Los elementos de estructura secundaria se estabilizan por la presencia de 3-4 puentes disulfuro donde los últimos cuatro residuos de cisteína son altamente conservados con un patrón de espaciamiento CxxxC y CxC; donde la letra “x” representa a cualquier tipo de aminoácido exceptuando cisteína. La familia beta está conformada por péptidos de alrededor de 60 aminoácidos con el mismo motivo estructural CS- $\alpha/\beta$  (3 o 4 puentes disulfuro), diferenciándose de la familia alfa principalmente por la longitud de la cadena. En esta familia la hélice alfa está formada por los aminoácidos centrales de la cadena polipeptídica. La familia gamma son toxinas de 36 a 47 aminoácidos con un motivo CS- $\alpha/\beta$  que bloquean preferentemente los canales de potasio codificados en el gen “*ether-a-go-go*” (ERG)<sup>6</sup>; canales presentes en tejido cardíaco<sup>7</sup>. Finalmente, los péptidos de la familia kappa son cadenas polipeptídicas de corta extensión que adoptan un plegamiento compuesto por dos hélices alfa estabilizadas por dos puentes disulfuro<sup>8</sup> (motivo estructural CS- $\alpha/\alpha$ ).

Algunas toxinas destacan por su acción potente sobre canales iónicos muy específicos<sup>9,10</sup>, algunos de ellos localizados en las células de mamíferos. Esta particularidad es considerablemente valiosa para el desarrollo de nuevas y mejores alternativas terapéuticas<sup>11,12</sup>. El análisis de una molécula con éstas características comienza con la identificación del blanco molecular buscando medir la potencia (concentración necesaria de la toxina para afectar los canales) y la especificidad por algún tipo de canal. Lo anterior se logra mediante estudios de electrofisiología de péptidos purificados directamente de las muestras de veneno, caracterizándolos también por espectrometría de masas y secuenciación de la cadena polipeptídica. Las toxinas más potentes son los mejores candidatos para determinar la estructura tridimensional con la finalidad de identificar los grupos químicos expuestos en la superficie de la molécula que pueden estar involucrados en la interacción molecular con los canales. Finalmente, la elucidación del mecanismo de acción es la caracterización total del sistema lo cual requiere de datos experimentales de distintas técnicas. Una alternativa para

abordar esta interrogante es modelar la interacción entre la toxina y el blanco biológico en programas computacionales de dinámica molecular con los datos de estructura y actividad.

## 1.2 Determinación estructural de péptidos y proteínas por resonancia magnética nuclear

A través de los años, muchos científicos han contribuido al desarrollo de las herramientas espectroscópicas que se utilizan hoy para acceder al mundo microscópico de las proteínas. Los pioneros en estudiar la estructura de estas macromoléculas fueron Max Ferdinand Perutz y John Cowdery Kendrew; quienes en 1962 recibieron el premio Nobel en química por la determinación de la conformación tridimensional de la hemoglobina mediante difracción de rayos x<sup>13</sup>. Desde entonces y hasta la fecha, la cristalografía de proteínas es la metodología más recurrente en los estudios estructurales de proteínas. Ésta técnica consiste en la colecta de un patrón difracción de un monocristal proteico usando un haz de rayos x. El patrón es cuidadosamente analizado para traducir los datos en mapas de densidad electrónica y finalmente en un modelo estructural. El mayor esfuerzo en esta técnica se realiza frecuentemente en la búsqueda de las condiciones experimentales para la cristalización. Aunque muchas proteínas se estudian por esta vía, existen casos en que los cristales son especialmente difíciles de producir o donde simplemente no se tiene éxito.

Previo a los estudios de M. Perutz y J. Kendrew, Edward Mills Purcell<sup>14</sup> y Felix Bloch<sup>15</sup> descubrieron el fenómeno de resonancia magnética nuclear (RMN) mientras trabajaban con ondas de radiofrecuencia. Este fue el primer paso en el desarrollo de una nueva herramienta espectroscópica para estudiar la materia. Años más tarde a los descubrimientos de Bloch y Purcell, Richard R. Ernst revolucionó el uso de la RMN<sup>16,17</sup> al aplicar los conceptos de la transformada de Fourier (FT) para obtener espectros de alta resolución y a partir de ello plantear la obtención de experimentos en 2 dimensiones<sup>18</sup>. Los esfuerzos del doctor Ernst permitieron que más tarde el profesor K. Wüthrich<sup>19,20</sup> realizara el primer estudio estructural de una proteína en disolución utilizando RMN de alta resolución bidimensional. Esta sucesión de eventos creó una alternativa a la cristalografía de proteínas y al mismo tiempo abrió una nueva perspectiva para el estudio de otras macromoléculas importantes como los oligosacáridos y el ADN.

La metodología desarrollada por el profesor K. Wüthrich puede realizarse en una gran variedad de proteínas tomando en cuenta ciertas consideraciones experimentales. El procedimiento global consiste en la adquisición de espectros específicos y en el análisis iterativo de los datos

derivados de estos. La forma de realizar el estudio ha evolucionado con el desarrollo de nuevas secuencias de pulsos y la implementación de algoritmos computacionales para la integración de los datos como CARA<sup>21</sup>, CYANA<sup>22</sup>, XPLOR<sup>23</sup> y UNIO<sup>24</sup>; solo por mencionar algunos. Para utilizar adecuadamente este software semiautomático se requiere en ocasiones de enriquecimiento isotópico y experimentos sofisticados para que el proceso iterativo converja rápidamente. Sin embargo, el proceso en general sigue la misma estrategia propuesta inicialmente por el profesor Wüthrich donde el primer paso, antes de obtener espectro, es considerar la proteína bajo estudio y el equipo de RMN para realizar el estudio.

Por un lado, la proteína bajo estudio debe cumplir con algunas características de solubilidad y estabilidad. En la práctica, el valor óptimo de concentración de proteína para los experimentos se encuentra entre 1.0 y 10.0 mM. Aunque la utilización de equipos con un mayor campo magnético mejora considerablemente la sensibilidad, la utilización de una concentración menor a la señalada afecta drásticamente la calidad de la información dificultando la interpretación de los datos. Por otro lado, el tamaño de la proteína se debe tomar en cuenta con especial atención. El tipo y sobre todo la cantidad de aminoácidos en la macromolécula determinan el número de señales que pueden aparecer en los diferentes espectros. Un mayor número de átomos implica un incremento en la probabilidad de obtener señales traslapadas, más aún si tienen desplazamientos químicos muy similares. La superposición de señales se puede minimizar con la utilización de equipos de alto campo magnético. Sin embargo, cuando el traslape de las señales de un mismo núcleo es intrínseco a las características de la molécula, aumentar la intensidad campo es insuficiente y es necesario el enriquecimiento isotópico para facilitar el proceso de interpretación. En resumen, es necesario el uso de equipos con el mayor campo magnético disponible para hacer más eficiente el proceso y con la mayor cantidad de proteína posible. El uso de experimentos de doble o triple resonancia, explicados en la siguiente sección, facilita enormemente el proceso.

### 1.2.1 Fundamentos

El espín nuclear (letra  $I$ ) es la propiedad mecano cuántica fundamental en RMN. El movimiento intrínseco de los núcleos puede genera momentos magnéticos nucleares  $\mu$  por cada valor de multiplicidad del espín nuclear ( $2I + 1$ ). De tal modo,  $\mu$  toman valores desde  $-I$  hasta  $+I$  con incrementos discretos de una unidad. En condiciones normales, la separación entre los estados energéticos asociados a los momentos magnéticos del núcleo es imperceptible; esto significa que los estados se encuentran degenerados. Al aplicar un campo magnético, los momentos magnéticos  $\mu$  se alinean a favor y en contra del campo provocando que los estados energéticos se desdoble. La



energía de cada nivel se calcula con la expresión  $E_\mu = -\mu\hbar\gamma B_0$ ; donde  $\hbar$  es la constante de Planck en su forma reducida ( $h/2\pi$ ),  $\gamma$  la constante giromagnética del núcleo atómico y  $B_0$  la magnitud del campo magnético.

Cuando el núcleo atómico tiene un espín  $I = 0$ ;  $\mu$  es 0 en ausencia o presencia de un campo magnético  $B_0$ . En cambio, cuando el espín nuclear  $I$  es igual a  $\frac{1}{2}$  (caso de los isótopos  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ ),  $\mu$  puede tomar los valores  $-\frac{1}{2}$  y  $+\frac{1}{2}$ ; los cuales se distinguen respectivamente con las letras  $\beta$  y  $\alpha$ . Para el espín  $I = \frac{1}{2}$  bajo la influencia de  $B_0$ , el momento magnético  $\alpha$  ( $+\frac{1}{2}$ ) se alinea en la dirección del campo magnético y el momento magnético  $\beta$  ( $-\frac{1}{2}$ ) se opone; lo cual genera una separación energética que se calcula con la expresión  $\Delta E_{\alpha-\beta} = \hbar\gamma B_0$ . Con base en esta expresión es posible deducir que existe un valor de frecuencia específico para la transición energética entre los estados  $\alpha$  y  $\beta$  igualando la ecuación anterior con la expresión  $\Delta E = h\nu$ ; donde  $h$  es la constante de Planck y  $\nu$  la frecuencia de una onda electromagnética. De la combinación de las expresiones  $\Delta E_{\alpha-\beta}$  y  $\Delta E$  se deduce la expresión  $\nu = \gamma B_0/(2\pi)$ . A este valor de frecuencia se le conoce como la frecuencia de Larmor ( $\nu_L$ ). Por tanto, si un espín  $I = \frac{1}{2}$  dentro del flujo magnético  $B_0$  es irradiado con una onda electromagnética de frecuencia  $\nu_L$ , la condición de resonancia se cumple y ocurre una transición energética del estado  $\alpha$  al  $\beta$ . La Figura 1.2 ilustra el momento magnético  $\mu$  y la separación de niveles en función del campo  $B_0$  para el caso descrito.

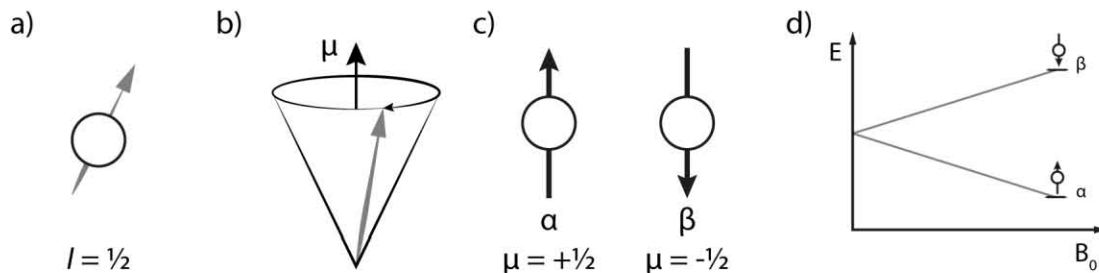


Figura 1.2. Representaciones del espín nuclear  $I$  y del momento magnético  $\mu$ . En el inciso a) se representa el caso de los núcleos  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ ; cuyo espín nuclear es  $I = \frac{1}{2}$ . En b) se muestra el momento magnético  $\mu$  generado por la rotación nuclear. En c) los dos valores de  $\mu$  para un espín  $I = \frac{1}{2}$ . El inciso d) muestra una gráfica donde se muestra la influencia del campo magnético  $B_0$  sobre de la separación entre los dos niveles energéticos de  $\mu$  de este caso. La constante giromagnética de cada núcleo amplifica o reduce la separación.

Al considerar una muestra de átomos con espín nuclear  $I = \frac{1}{2}$  y un campo  $B_0 \gg 0$ , se conoce que en el equilibrio el número de momentos magnéticos alineados con la dirección del campo ( $N_\alpha$ ) es ligeramente mayor al número de momentos en contra ( $N_\beta$ ); de acuerdo a ecuación

$N_{\mu} = \frac{1}{2}N \exp(-E_{\mu}/kT)^{\dagger}$ . La suma de todos los momentos magnéticos de la muestra de átomos genera el vector de magnetización  $B_I$ , cuyas propiedades dependen de la magnitud y dirección de  $B_0$ ; además de la constante giromagnética  $\gamma$ . La Figura 1.3 ilustra el comportamiento del ejemplo.

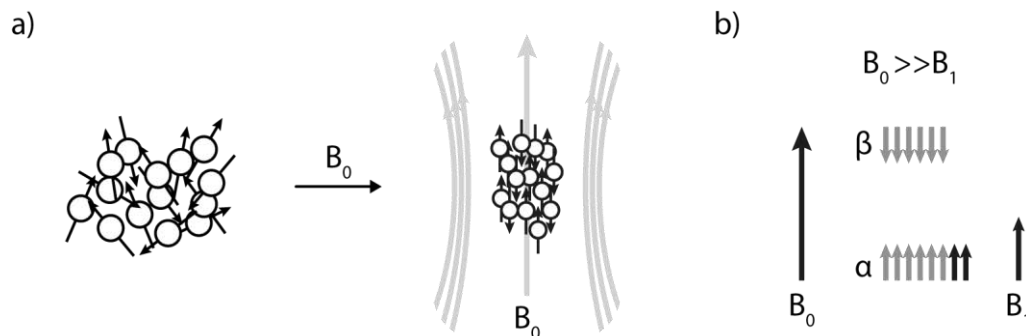


Figura 1.3. Magnetización  $B_I$ . En el inciso a) se representan los momentos magnéticos (flechas) de una muestra aleatoria de núcleos (esferas) en ausencia y presencia del campo magnético  $B_0$ . En b) se muestran todos los momentos magnéticos después de llegar al equilibrio. El vector de magnetización  $B_I$  es producto de la suma vectorial de los momentos magnéticos en los estados alfa y beta.

La información que proporcionan los núcleos atómicos activos en RMN ( $I \neq 0$ ) se extrae a través de radiaciones electromagnéticas controladas y detectando la corriente inducida por el vector  $B_I$  durante la relajación del sistema. La Figura 1.4 ilustra el proceso de excitación, relajación y detección. En la figura, la magnetización  $B_I$  es manipulada excitando los átomos con un pulso de radiofrecuencia (del orden de los mega Hertz; MHz). Al aplicar el pulso de forma controlada sobre el eje  $x$  el vector de magnetización  $B_I$  rota 90 grados en dirección de las manecillas del reloj dejándolo completamente alineado con la dirección del eje  $+y$  (inciso a). Inmediatamente después al pulso, el sistema comienza a relajarse. El vector magnético  $B_I$  rota sobre el plano “ $xy$ ”, nuevamente en sentido de las manecillas del reloj, induciendo una corriente eléctrica. El flujo de eléctrico se detecta arbitrariamente sobre el eje  $y$ . La magnitud de la corriente detectada es proporcional a la proyección del vector  $B_I$  sobre el eje de detección (incisos b y c). La corriente inducida genera una señal analógica que decae libremente (Free Induction Decay; FID) durante el proceso de relajación transversal, donde la magnetización de  $B_I$  proyectada sobre el plano  $xy$  tiende a alinearse nuevamente con el campo magnético  $B_0$  durante los ciclos de rotación. Al final,  $B_I$  recupera su estado de equilibrio inicial (inciso d) y la señal analógica del FID es digitalizada tomando valores discretos en un intervalo de tiempo definido por el experimentador.

---

<sup>†</sup>  $N_{\mu}$  es el número de núcleos de momento magnético  $\mu$ ;  $N$  es el número total de átomos susceptibles al campo ( $I = \frac{1}{2}$ );  $E_{\mu}$  la energía del momento magnético  $\mu$ ;  $k$  la constante de Boltzman y  $T$  la temperatura.

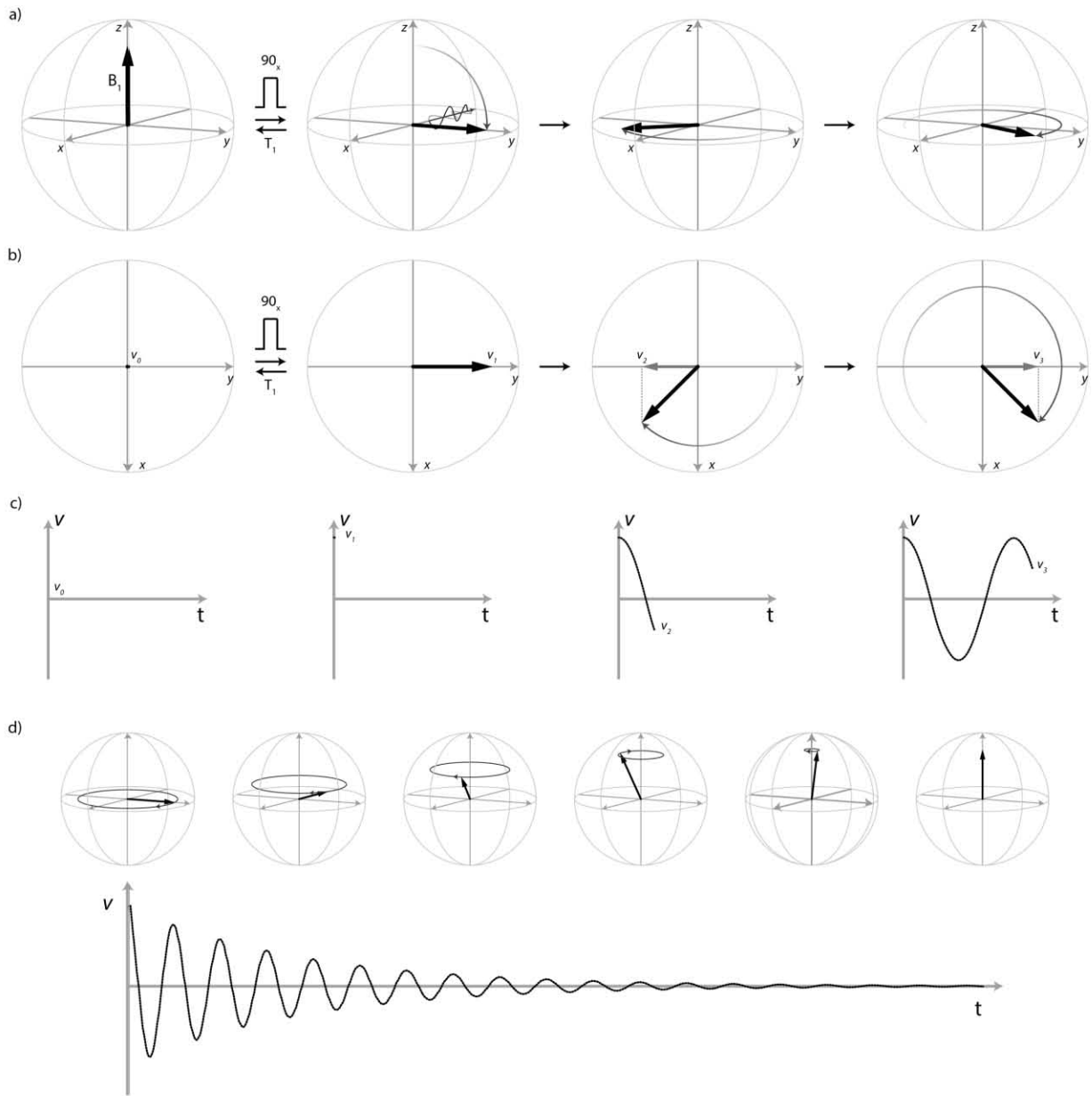


Figura 1.4. Manipulación del vector magnético  $B_1$ , relajación transversal y detección del decaimiento libre de la inducción (FID). En a) se muestra a  $B_1$  (de color negro) en diferentes situaciones. El vector permanece paralelo a  $B_0$  en el equilibrio. Un pulso de radiofrecuencia provoca una rotación de  $90^\circ$  poniendo al vector sobre el plano  $xy$ . Fuera del equilibrio y en el plano  $xy$ ,  $B_1$  comienza a rotar. En el inciso b) se muestran las proyecciones en el plano  $xy$  de las figuras del inciso anterior. Aquí se resalta la componente de  $B_1$  en el eje “y” de color gris. En c) se ilustra la cantidad de corriente inducida por  $B_1$  medida con el detector corriente eléctrica colocado en la posición  $+y$ . En el equilibrio, la inducción de corriente es nula (punto  $v_0$ ). Después del pulso la inducción es máxima y de signo positivo ( $v_1$ ). Los puntos  $v_2$  y  $v_3$  alterna el signo de la corriente conservando la magnitud del vector de acuerdo a la proyección de  $B_1$  sobre el eje y. Finalmente, en el inciso d) se muestra la recuperación de la magnetización  $B_1$  sobre el eje z a través del mecanismo de relajación transversal y el decaimiento paulatino de la corriente inducida. El FID es digitalizado muestreando la señal analógica durante intervalos de tiempo regulares.

El FID contiene información precisa de los núcleos excitados durante la manipulación del vector  $B_1$ . La función que describe al FID es transformada en un espectro utilizando la transformada de Fourier. Este procedimiento matemático cambia el dominio del tiempo de la función  $f(t)$  definiendo la función correspondiente  $f(\omega)$  en el dominio de las frecuencias. En la Figura 1.5 se muestra el procedimiento matemático. Con esta implementación la adquisición de los datos se aceleró de forma extraordinaria dándole mayor versatilidad al uso de la RMN. Este fundamento se aplica de igual forma a los espectros en dos dimensiones y tres dimensiones que se describen más adelante.

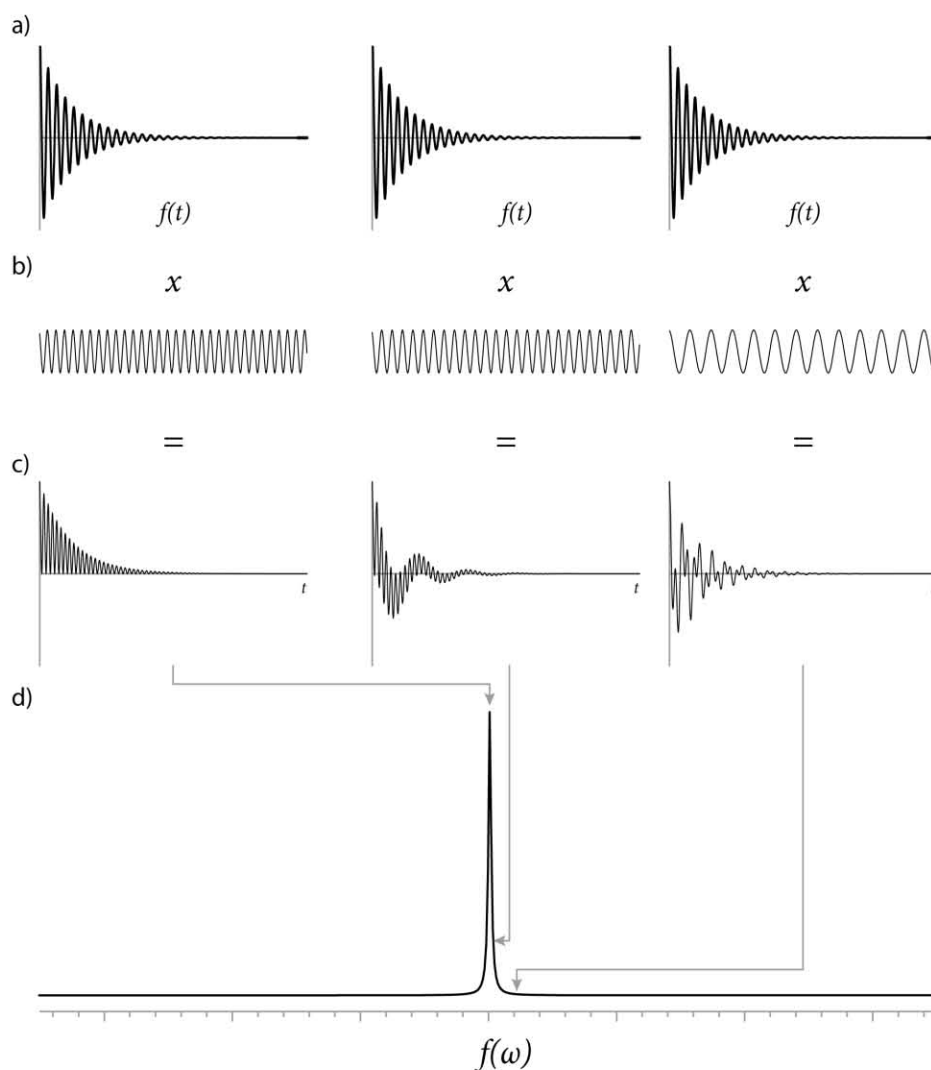


Figura 1.5. Transformada de Fourier. El FID del inciso a) se multiplica por la función de prueba de frecuencia conocida ilustrada en b). El resultado de la multiplicación se ilustra en el inciso c). Las gráficas se integran y el valor de la integral se coloca en el valor de la función de prueba correspondiente. El resultado es una función  $f(\omega)$  que describe el espectro de RMN.

## Desplazamiento químico

En una molécula, los núcleos magnéticamente activos de un mismo elemento poseen diferentes frecuencias de resonancia debido a que el campo magnético  $B_0$  es apantallado por el momento magnético de los electrones circundantes. Este efecto de apantallamiento está descrito por la ecuación  $B_{\text{eff}} = (1 - \sigma) B_0$ ; donde  $B_{\text{eff}}$  es el campo efectivo y  $\sigma$  la constante de apantallamiento, ambos particulares para cada núcleo. En consecuencia, la frecuencia de resonancia del  $i$ -ésimo átomo  $\nu_i$  depende del apantallamiento que experimenta cada núcleo de acuerdo a la ecuación  $\nu_i = (1 - \sigma) \gamma B_0 / (2\pi)$ . Por tanto, el ambiente químico de un núcleo determina la posición de las señales dentro de los espectros de resonancia; es decir, de acuerdo a su desplazamiento químico ( $\delta$ ). El uso del  $\delta$  simplifica la comparación de señales entre espectros obtenidos en diferentes campos magnéticos, convirtiendo las frecuencias de resonancia en partes por millón (ppm) de acuerdo a la ecuación  $\delta = 10^6 [(v_i - v_{\text{ref}}) / v_{\text{ref}}]$ ; donde  $v_{\text{ref}}$  es la frecuencia de referencia de un compuesto patrón con el cual se establece el cero en la escala (tetrametil silano para  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ; TMS). En la Figura 1.6 se dan ejemplos de desplazamiento químicos de los protones presentes en una proteína.

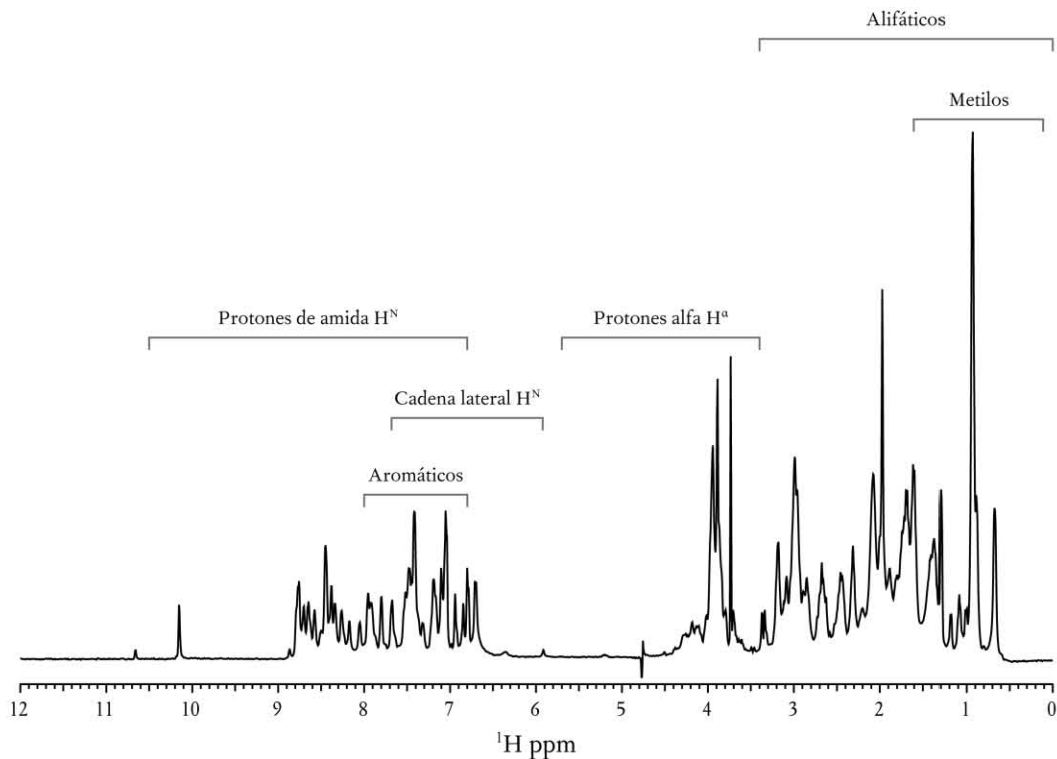


Figura 1.6. Desplazamientos químicos de los grupos protones de una proteína. Dependiendo de la dispersión de las señales de los hidrógenos de amida se puede inferir si la proteína tiene una estructura tridimensional definida.

## Acoplamiento

En RMN, el acoplamiento es un parámetro observable originado por la interacción recíproca entre dos núcleos magnéticamente activos. Este fenómeno se hace evidente generalmente a través de acoplamientos de tipo escalar ( $J$ ) y dipolar; entre átomos del mismo tipo (homonuclear) o de distinto tipo (heteronuclear). El acoplamiento escalar surge de la interacción entre dos núcleos activos comunicados a través de los electrones que forman el enlace químico. Con esta clase de acoplamiento es posible extraer información del vecindario nuclear y caracterizar los sistemas de espín de una molécula (redes de acoplamientos escalares). Esto es muy útil en la identificación tanto de moléculas como de pequeñas fracciones de ellas. En el caso de las proteínas; cada aminoácido posee patrones específicos gracias a que los protones de las cadenas laterales tienen diferentes valores de desplazamiento químico característicos y sus sistemas de espín son distintivos. En la Figura 1.7 se muestran los patrones característicos o sistemas de espín característicos de un triptófano. Las señales COSY y TOCSY se describen más adelante en el texto en la sección de experimentos bidimensionales.

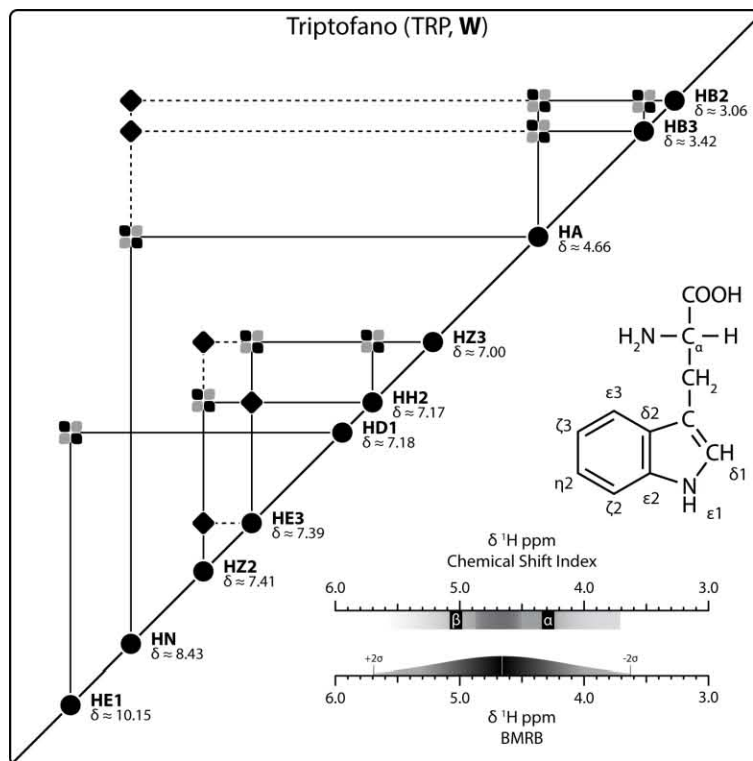


Figura 1.7. Patrones COSY y TOCSY del triptófano. En la figura los acoplamientos a dos y tres enlaces de distancia dan patrones COSY (figura en forma de flor de color negro y gris); mientras que los sistemas de espín (redes de acoplamientos escalares) dan las señales TOCSY señaladas con figuras en rombos. Los valores de desplazamiento de del hidrógeno alfa son característicos de la posición que guarda del aminoácido dentro de la estructura (escalas de la parte inferior derecha).

El acoplamiento dipolar es consecuencia de la interacción entre dos dipolos magnéticos cercanos a través del espacio. Esta interacción se presenta a través del mecanismo de relajación longitudinal el cual está detrás del efecto nuclear Overhauser (Nuclear Overhauser Effect; NOE).

### Relajación longitudinal y el efecto nuclear Overhauser

La relajación longitudinal es el proceso por el cual la magnetización  $B_I$  se recupera a su estado de equilibrio a lo largo del eje  $z$ . A diferencia de la relajación transversal (Figura 1.4 en la página 9), este proceso de relajación hasta el estado de equilibrio no involucra la rotación de la magnetización  $B_I$  través del plano  $xy$ . En la Figura 1.8 se puede observar el proceso de manera general. En dicha figura, la magnetización  $B_I$  se invierte mediante la aplicación de un pulso de  $180^\circ$  para dejar que el sistema se relaje hasta el punto inicial únicamente de manera longitudinal. Durante el proceso,  $B_I$  nunca rota sobre el plano  $xy$  debido a que no existe ninguna componente sobre los ejes del plano. La magnetización se recupera totalmente en un tiempo denominado  $T_I$ .

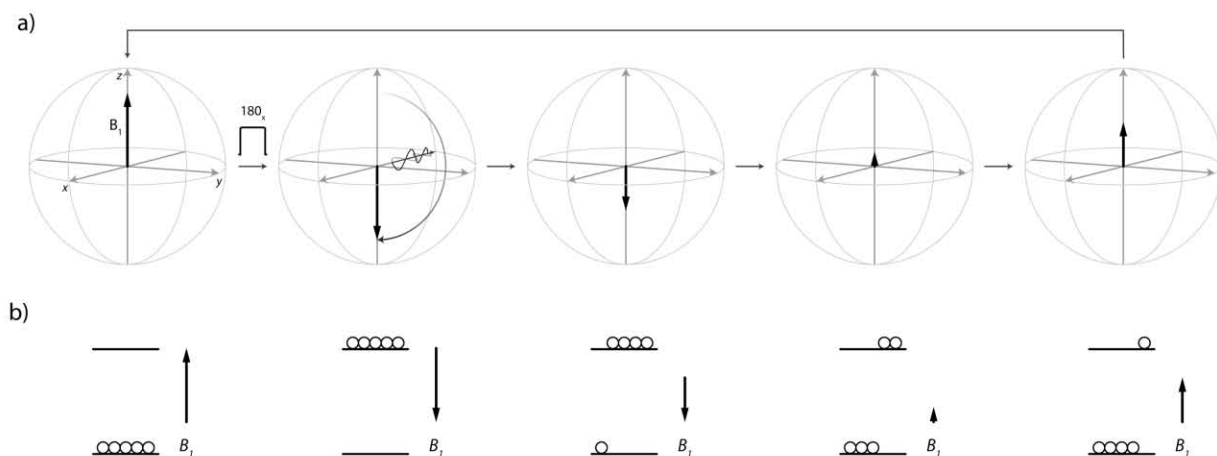


Figura 1.8. Relajación longitudinal del vector magnético  $B_I$ . Un pulso de  $180^\circ$  invierte la diferencia poblacional que da origen a  $B_I$ . Durante el proceso de relajación el vector de magnetización nunca rota sobre el plano  $xy$  debido a que  $B_I$  no tienen ningún componente sobre el plano (inciso a). La magnetización se recupera con la relajación individual de cada espín; es decir con la recuperación de la diferencia poblacional en el estado de equilibrio (inciso b).

Durante la relajación longitudinal se favorecen la interacción entre dipolos magnéticos cuya interacción decae rápidamente con el aumento de la distancia  $r$  entre los núcleos atómicos ( $1/r^3$ ). En la Figura 1.9 se esquematiza la generación del campo magnético  $B_{loc}$  por un dipolo magnético. La interacción de dos dipolos magnéticos genera varios mecanismos de relajación resumidos en el esquema del ultimo inciso. En el se tomando el caso entre los espines  $I$  y  $S$  acoplados de forma dipolar.

En el esquema de la Figura 1.9 inciso d); cada una de las líneas gruesas horizontales representan un estado energético donde los momentos magnéticos nucleares de los espines  $I$  y  $S$  se encuentran en los estados  $\alpha$  o  $\beta$ . Las transiciones entre los niveles energéticos se simbolizan con las letras  $W$ ; esto significa que cuando el espín  $I$  cambia del estado  $\alpha$  al  $\beta$ , o viceversa, la transición se escribe como  $W_I$  (transición cuántica simple). De forma análoga, los cambios de estado para el espín  $S$  se señalan con  $W_S$ . Cuando ambos espines cambian de estado se producen transiciones cuánticas de orden cero y doble. La transición cuántica cero se produce cuando los espines  $I$  y  $S$  se encuentran en estados alternados ( $\alpha\beta$  o  $\beta\alpha$ ) y ambos estados cambian durante la transición que se denota con la letra  $W_0$ . Un caso similar pasa con la transición cuántica doble  $W_2$ , donde los estados de ambos espines son iguales ( $\alpha\alpha$  o  $\beta\beta$ ) y cambian al mismo tiempo durante la transición energética.  $W_0$  y  $W_2$  representan el mecanismo de “relajación cruzada” por el cual los espines  $I$  y  $S$ , acoplados de forma dipolar, transfieren de un espín al otro su magnetización en el eje  $z$  durante el proceso de relajación longitudinal<sup>25,26</sup>.

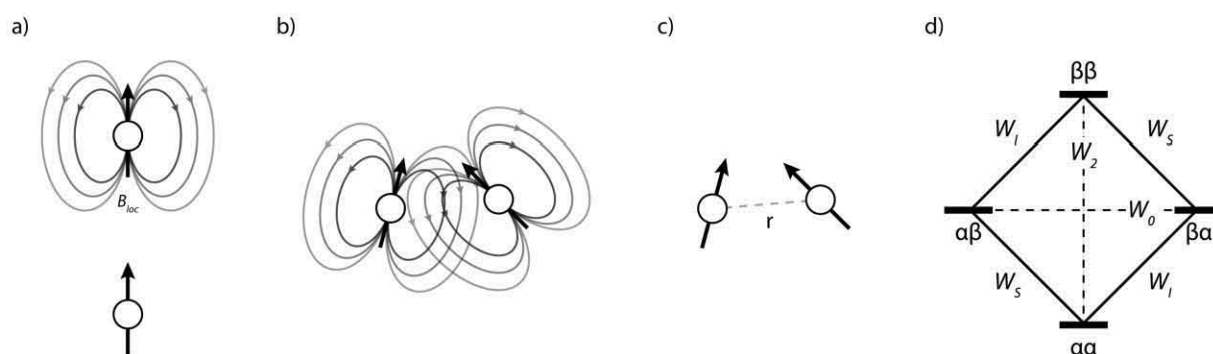


Figura 1.9. Acoplamiento dipolar. En a) se muestra esquematizan las líneas de campo generadas por el dipolo magnético de un núcleo (esfera). La magnitud y dirección de  $B_{loc}$  se representa con la flecha que atraviesa el núcleo. En b) se muestra la interacción de dos dipolos magnéticos. Las líneas de campo hacen más evidente la interacción magnética. En c) se muestra el esquema simplificado del inciso anterior para resaltar que la interacción depende de la distancia inter nuclear. El esquema del último inciso muestra los mecanismos de relajación cruzada  $W_0$  y  $W_2$ .

El efecto nuclear Overhauser está ligado al mecanismo de relajación cruzada descrito en el párrafo anterior. Analizando dicho mecanismo se deduce una constante de proporción  $\sigma_{IS}$  entre las transiciones  $W_2$  y  $W_0$  definida como  $\sigma_{IS} = W_2 - W_0$ . En el caso donde la transición cuántica cero y doble tienen la misma probabilidad ( $W_2 = W_0$ ) o ambas son cero, la constante de proporción es nula provocando que el mecanismo de relajación cruzada se inexistente y por tanto no se manifieste el efecto nuclear Overhauser. Tanto  $W_2$  como  $W_0$  dependen del tiempo de correlación  $\tau_c$  que se define como el tiempo que toma una molécula para rotar  $2\pi$  radianes en cualquier dirección dentro del espacio cartesiano. El tiempo de correlación depende de la viscosidad del medio y del tamaño de la



molécula. Por tanto, cuando se dese realizar un experimento basado en el efecto NOE se debe tener en cuenta el valor de  $\tau_c$ ; es decir, el tamaño de la molécula. La Figura 1.10 muestra un ejemplo de la influencia del tiempo de correlación.

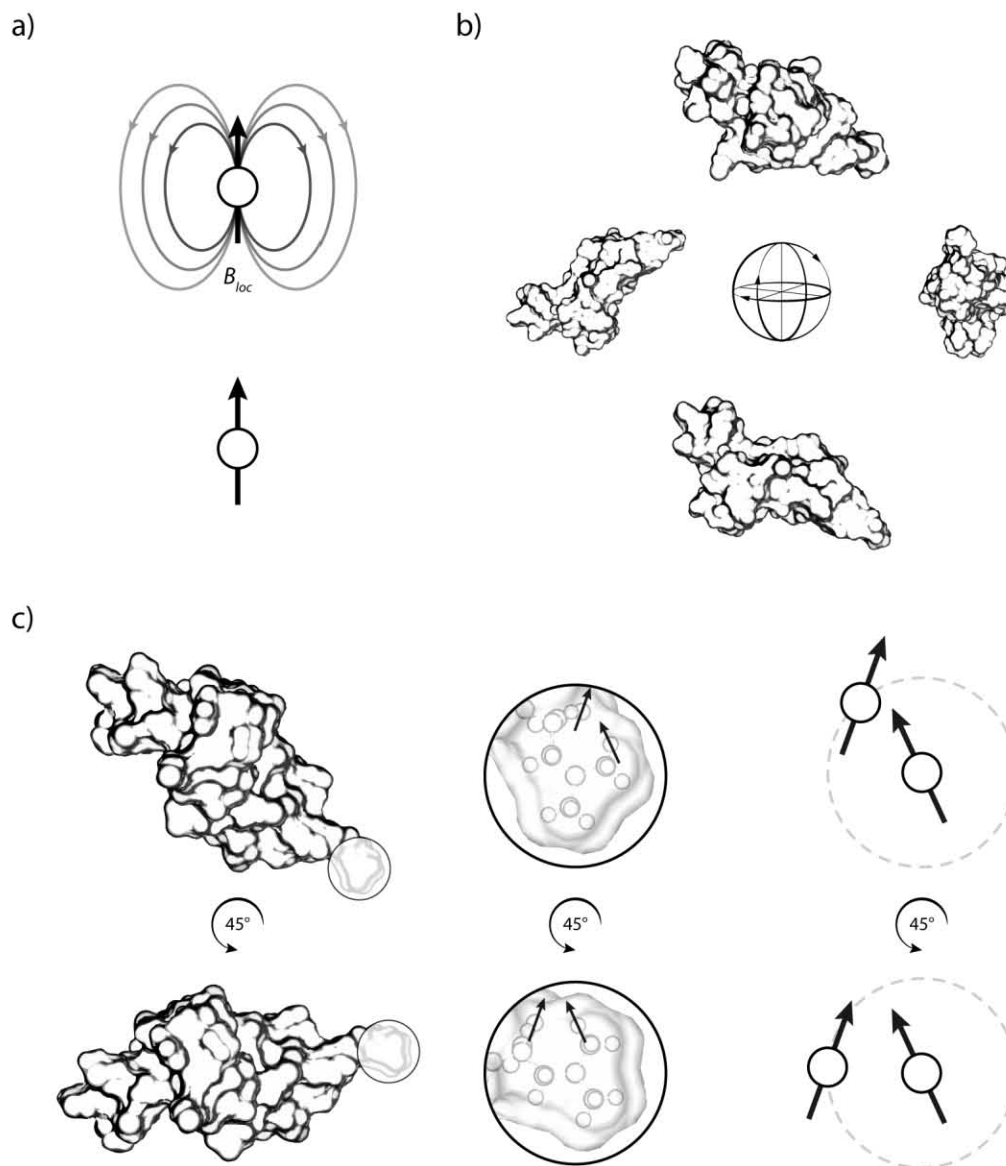


Figura 1.10. Efecto del movimiento molecular sobre el fenómeno de relajación transversal. En el inciso a) se ilustra el campo magnético local  $B_{loc}$  generado por los electrones que rodean al núcleo atómico. La representación se simplifica con una flecha apuntando en la dirección del campo. En b) se ilustra la rotación de una proteína en disolución. En el inciso se enfatiza la aleatoriedad de los movimientos rotacionales. En c) se analiza una porción de la proteína haciendo énfasis en dos protones cercanos que relajan de forma dipolar. El campo magnético que influye sobre cada espín se modifica por la posición espacial del hidrógeno adyacente después de una rotación de  $45^\circ$ . Éste fenómeno es una fuente de relajación que depende de la velocidad de rotación de la molécula, es decir, del tiempo de correlación. Los tres casos límite ocurren cuando el inverso del tiempo de correlación es respectivamente superior, igual o inferior que la frecuencia de Larmor.

La intensidad de las señales NOE decaen rápidamente con el aumento de la distancia internuclear  $r$  ( $1/r^6$ ). El experimento NOESY es el experimento más importante en la determinación estructural. A través de la integración de estos espectros se pueden construir restricciones de distancias entre átomos<sup>27,28</sup>. La correcta cuantificación de señales NOE depende del tiempo de mezclado, que es el tiempo durante el cual la magnetización de los espines individuales se transfiere entre ellos. Este parámetro se ajusta para cumplir con la ecuación  $I_{NOE} = 1/r^6$  que muestra la correspondencia entre la intensidad de las señales NOE ( $I_{NOE}$ ) y la distancia internuclear ( $r$ ).

### Resonancia magnética nuclear bidimensional

En 1975 R. Ernst<sup>18</sup> realizó los primeros experimentos bidimensionales en RMN a partir de la propuesta de Jeener en 1971. Con esto la RMN pudo estudiar sistemas más complejos gracias a que literalmente se adquirió una nueva dimensión. Matemáticamente, un experimento bidimensional de RMN es un arreglo matricial de datos del decaimiento libre de la inducción en distintos intervalos de tiempo. Al cambiar el dominio al de las frecuencias se generan los espectros que dispersan las señales y brindan la información necesaria para estudiar moléculas.

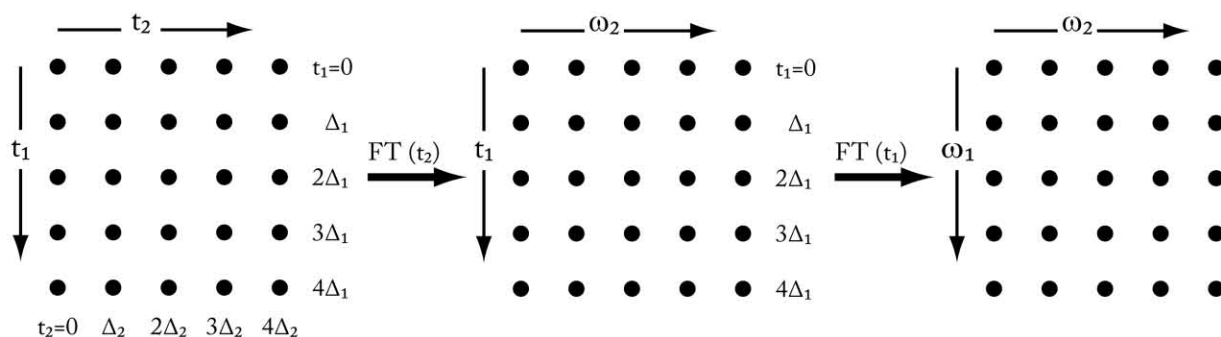


Figura 1.11. Representación matricial de los datos necesarios para generar un espectro en 2 dimensiones. En la figura de la izquierda los puntos de cada renglón (conforme incrementa el valor de  $t_2$ ) representan el FID de un experimento unidimensional; esto es, cada renglón es un espectro unidimensional. Los incrementos en  $t_1$  generan más espectros de 1D (centro). Al aplicar una segunda transformada de Fourier sobre  $t_1$  se genera un espectro en 2D (derecha).

La Figura 1.12 muestra el esquema general de la secuencia de pulsos utilizada para generar un espectro en 2 dimensiones. El tiempo variable  $t_1$  se modifica en incrementos discretos para generar la segunda dimensión. El resultado es la generación de un nuevo espectro tras la aplicación de dos transformadas de Fourier del FID colectado bajo este esquema.

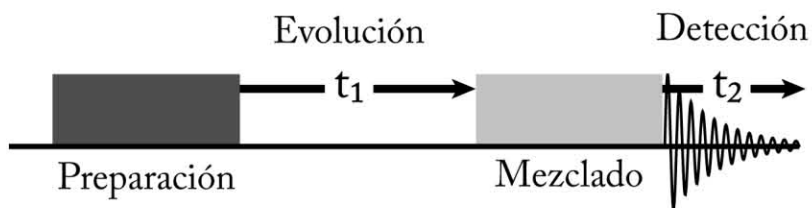


Figura 1.12. Esquema de una secuencia de pulsos para obtener un espectro en 2 dimensiones. El tiempo  $t_1$  se varía para generar la segunda dimensión.

La Figura 1.13 muestra los datos de FID de un espectro bidimensional después de aplicar la primera transformada de Fourier. La intensidad de las señales de varía periódicamente durante el tiempo  $t_1$ . Esta variación se considera como un segundo FID al aplicar una segunda transformada de Fourier a los datos contenidos en el FID inicial.

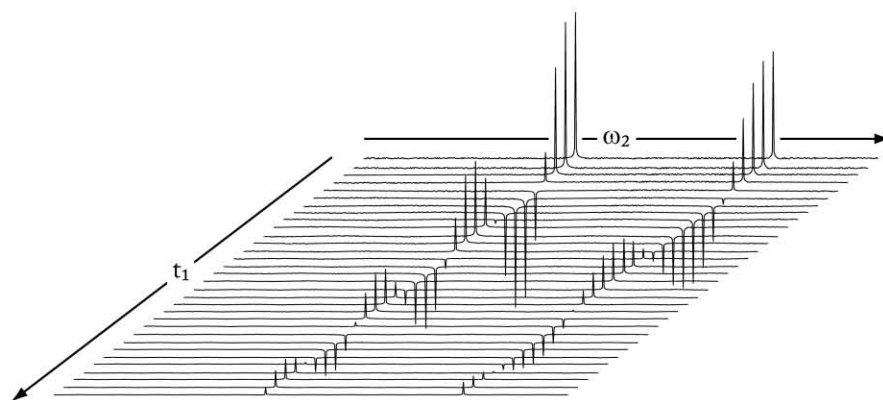


Figura 1.13. Colección de espectros en función de los valores de  $t_1$ . La intensidad de las señales varía de forma independiente para ilustrar la generación de una función periódica en función del valor de  $t_1$ . La información obtenida depende de la secuencia de pulsos aplicada.

### Experimentos tridimensionales

Al igual que los experimentos en 2 dimensiones que se ilustran como un conjunto de experimentos en 1D (Figura 1.13), los experimentos tridimensionales pueden concebirse como un conjunto de espectros de 2D. En la Figura 1.14 se muestra el esquema general de una secuencia de pulsos para obtener espectro en 3 dimensiones. En esta secuencia de pulsos se agrega un tiempo de evolución ( $t_2$ ) adicional junto con otro bloque de mezclado.

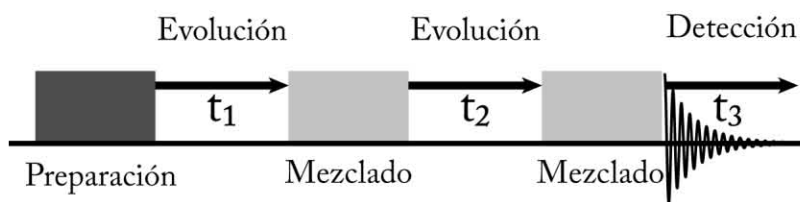


Figura 1.14. Esquema de la secuencia de pulsos para generar un espectro en 3 dimensiones. Los valores  $t_1$  y  $t_2$  se varían de forma independiente para generar la segunda y tercera dimensión, respectivamente. En los bloques de mezclado la magnetización evoluciona.

En general, el tiempo necesario para la adquisición de un experimento en 3D es considerablemente mayor al de un experimento en 2D y depende del experimento a realizar. Sin embargo, la espera se recompensa al obtener espectros cuya interpretación es regularmente más simple y precisa. Los experimentos 3D pueden ser de doble o triple resonancia dependiendo de número de núcleos excitados durante la secuencia de pulsos. En la Figura 1.15 se muestra un experimento tridimensional de doble resonancia que utiliza los isótopos  $^1\text{H}$  y  $^{15}\text{N}$ . En este experimento se crea una colección de experimentos de 2D utilizando hidrógeno y las señales “se dispersan” en una nueva dimensión producida por la resonancia del núcleo  $^{15}\text{N}$ .

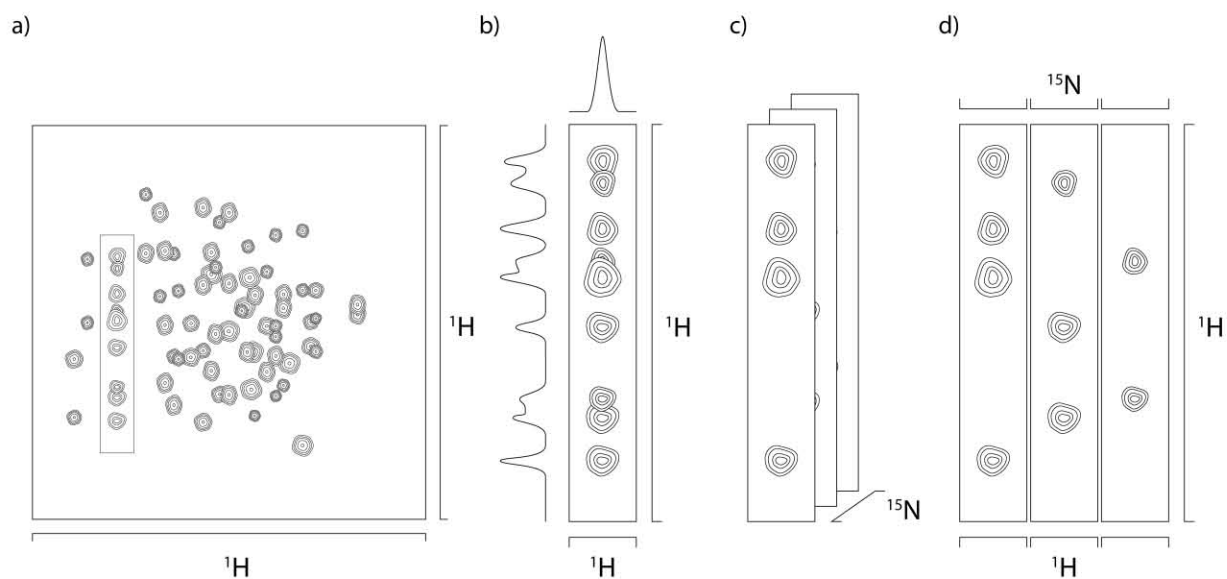


Figura 1.15. Experimentos en 3D. Se muestra la dispersión de las señales en las tres dimensiones generadas. Estos experimentos se pueden considerar como una colección de experimentos en 2D. En a) se muestra un experimento en 2D con señales traslapadas. En b) se muestra una región seleccionada del experimento en 2D. Al dispersar las señales en una nueva dimensión (inciso c) las señales se pueden distinguir por sus desplazamientos químicos (inciso d).

En la determinación de la estructura de proteínas los experimentos de doble y triple resonancia son sumamente útiles. Dichos experimentos las propiedades nucleares de los isótopos  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$  para extraer información precisa de estas macromoléculas. En la Figura 1.16 se muestra el experimento HNCO de triple resonancia. En la figura se muestra la transferencia de la magnetización a través del acoplamiento entre los átomos señalados con una flecha de color gris. En esta secuencia el hidrógeno de amida es irradiado selectivamente para transferir la magnetización del átomo  $^1\text{H}$  al  $^{15}\text{N}$  a través del acoplamiento escalar a un enlace de distancia. En el segundo paso, la magnetización se transfiere al carbono del grupo carbonilo a través del acoplamiento a un enlace de distancia entre el nitrógeno y el carbonilo. En los pasos 3 y 4 la magnetización se transfiere de regreso para detectar el experimento en hidrógeno.

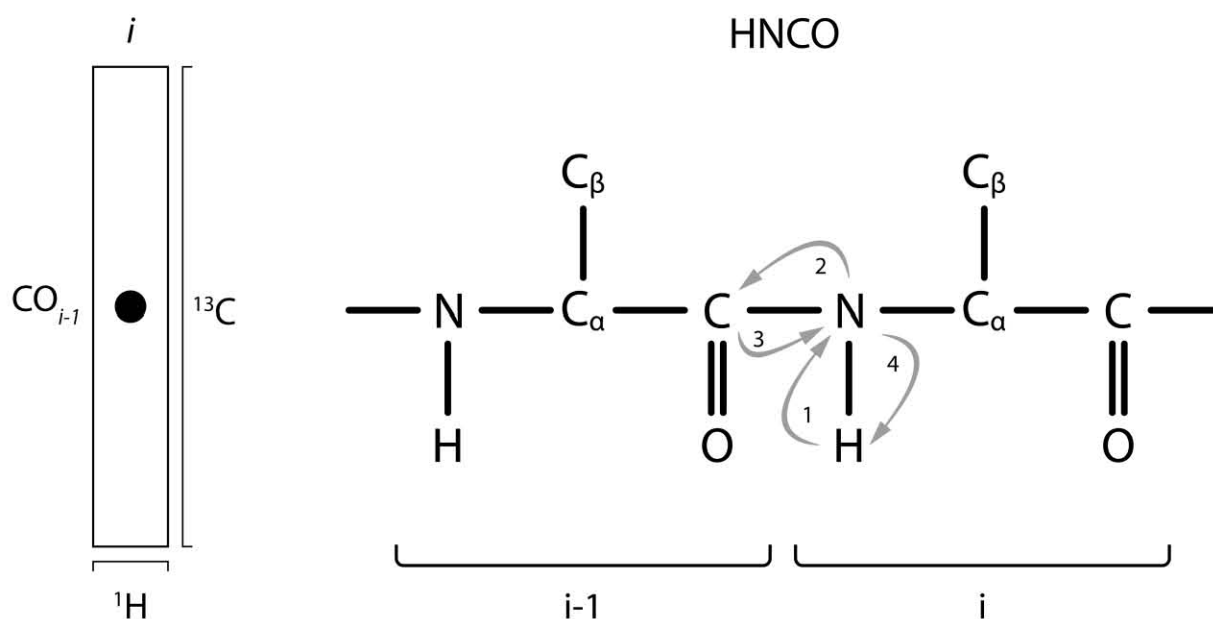


Figura 1.16. Experimento HNCO. En la parte izquierda de la figura se muestra una porción del espectro de triple resonancia. En este ejemplo se muestra la información que se obtienen después de aplicar el esquema de transferencia de la magnetización ilustrado en la parte derecha con las flechas numeradas. Las letras  $i$  indican el número de aminoácido en la secuencia de una proteína.

Algunos nombres de las secuencias de pulsos para experimentos en 3D describen la transferencia de la magnetización. En ejemplo anterior, la información se interpreta ubicando una señal en el desplazamiento químico de  $^{15}\text{N}$  perteneciente al aminoácido  $i$ -ésimo aminoácido ( $i$ ). Dentro de este plano es posible encontrar una señal en la dimensión de  $^{13}\text{C}$  (eje  $y$  del plano) correspondiente al carbonilo del aminoácido  $i-1$ ; es decir, del aminoácido anterior. La información recabada se complementa con la del experimento HN(CA)CO, mostrado en la Figura 1.17, al

observar dos correlaciones pertenecientes respectivamente al carbonilo del aminoácido  $i$  e  $i-1$  en el mismo desplazamiento químico de  $^{15}\text{N}$  (mismo plano).

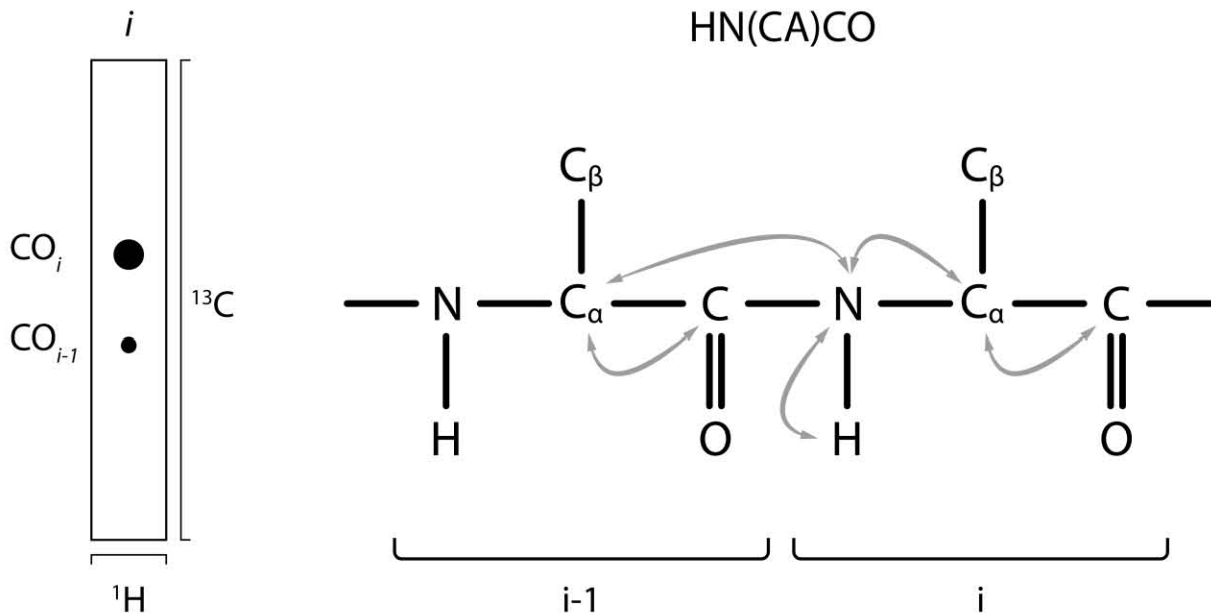


Figura 1.17. Experimento HN(CA)CO. En la parte izquierda se muestra la información extraída con este esquema de transferencia de magnetización (parte derecha). Las letras  $i$  indican el número de aminoácido en la secuencia de una proteína.

Este proceso de asignación se realiza de la misma forma con las parejas de experimentos HNCA, HN(CO)CA y CBCA(CO)NH, CBCANH. Al final del proceso de asignación toda la información se conjunta para identificar de forma certera los desplazamientos químicos y las señales tanto de la cadena principal como de cada uno de los aminoácidos que componen a la proteína bajo estudio.

### Supresión de la señal de agua

La supresión de la señal del solvente es un aspecto práctico muy importante en la obtención de los espectros de proteínas. De forma general, los solventes que se utilizan en la obtención de los experimentos de RMN son moléculas libres de átomo activos para evitar la interferencia de sus señales dentro de los espectros. En el caso de las proteínas, la limitante para usar este método es la presencia de hidrógenos lábiles, como los del grupo amida, los cuales se intercambian constantemente con los del disolvente. Por tanto, al usar un solvente con átomos de deuterio los protones lábiles se sustituyen y en consecuencia se pierde información valiosa. Una estrategia

habitual es el uso de mezclas de H<sub>2</sub>O / D<sub>2</sub>O con proporciones del 5% al 10% de D<sub>2</sub>O para evitar el intercambio de los hidrógenos lábiles. Sin embargo, la señal del agua interfiere enormemente con las señales de la proteína. Para evitar la adquisición de esta señal, de forma directa en las secuencias de pulsos se incluyen pulsos selectivos que evitan que la magnetización proveniente de las moléculas de agua sea detectada durante la adquisición del FID. Una de las secuencias más eficientes es la secuencia DPFGE<sup>29,30</sup>. En esta secuencia se aplican gradientes y pulsos selectivos para eliminar la señal del solvente y evitar la presaturación del agua lo cual provoca una pérdida en la sensibilidad de los protones lábiles<sup>31</sup>. Los esquemas de la supresión con la secuencia WATERGATE (PFGSE) y DPFGE se muestran en la Figura 1.18<sup>30</sup>.

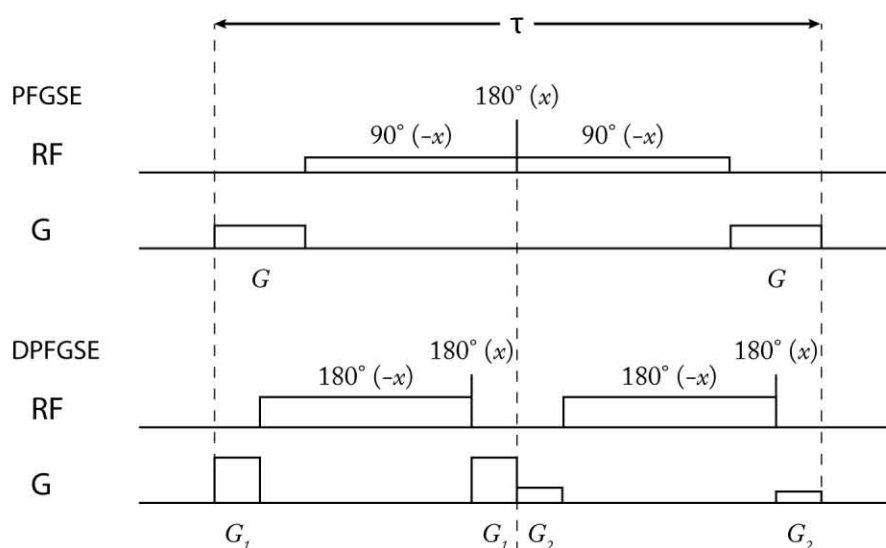


Figura 1.18. Esquemas de pulsos suaves y fuertes (RF) aplicados durante las secuencias WATERGATE (PFGSE) y DPFGE. En la línea G se muestran los gradientes que se aplican en cada una de las secuencias.

### Asignación secuencial de los sistemas de espín en los espectros 2D

La estructura general de los 20 aminoácidos más comunes en la naturaleza se compone por un átomo de carbono de hibridación  $sp^3$  enlazado covalentemente a 4 átomos, un carbono de ácido carboxílico, un nitrógeno en un grupo amino, un sustituyente  $R$  que generalmente es una cadena hidrocarbonada y, a excepción de la prolina y glicina, un hidrógeno denominado hidrógeno alfa. En los espectros de RMN es posible correlacionar ciertos intervalos de desplazamiento químico (Figura 1.6) con los grupos químicos presentes en una proteína. Diecinueve de veinte aminoácidos mencionados presentan una señal en la región de 6 a 9 ppm asociada a su hidrógeno de amida. En

esta región es fundamental observar la dispersión de las señales ya que esta es una característica de una proteína con estructura tridimensional (señales dispersas).

La parte medular de la determinación estructural de una proteína por RMN es la interpretación correcta de la evidencia experimental ya que de este análisis de datos se obtiene la información necesaria para generar los modelos estructurales. El método establecido por el profesor Wüthrich consiste en comparar las señales experimentales con los patrones característicos de los 20 aminoácidos estándares e identificar las posibles asignaciones<sup>20</sup>. Después, los sistemas de espín se correlacionan entre sí a través de señales NOE. En el caso de los aminoácidos secuenciales, es posible encontrar una señal NOE intensa en el desplazamiento químico del hidrógeno de amida ( $^1\text{H}_\text{N}$ ) correspondiente al  $i$ -ésimo aminoácido debida al hidrogeno alfa ( $^1\text{H}_\alpha$ ) del aminoácido anterior  $i-1$ . Esto depende de la cercanía entre los hidrógenos mencionados; es decir de la disposición espacial de la proteína. De este modo, la correlación entre aminoácidos secuenciales construye conjuntos de sistemas de espín independientes. Al confrontar los desplazamientos químicos y los patrones de señales de los bloques con la secuencia de aminoácidos es posible determinar cuál es la asignación que cumple mejor con los valores experimentales. Todas las señales de un espectro de proteína se asignan siguiendo este procedimiento. No obstante, la dificultad de esta estrategia aumenta con la cantidad y traslape de señales sumado a la similitud de algunos patrones de aminoácidos. Debido a la complejidad y diseño de la tarea, la asignación secuencial requiere del uso de programas computacionales especializados y de datos imprescindibles como la secuencia de aminoácidos, las modificaciones postraduccionales, el número y conectividad de enlaces disulfuro, entre otros. Con la identificación completa de los sistemas de espín, el resto de señales NOE son correlacionadas.

Terminada la asignación, el siguiente paso es la determinación cuantitativa de las restricciones de distancia. Para este fin, es necesario integrar las señales del espectro NOESY y determinar las distancias en función del valor de la intensidad de cada señal. Con la relación  $r = r_{ref} (I_{ref} / I_{señal})^{1/6}$  se establecen las restricciones de distancia  $r$ ; donde  $I_{señal}$  es la intensidad de la señal NOE e  $I_{ref}$  la integral de una señal NOE asociada a una distancia de referencia  $r_{ref}$ . Una vez completado este paso, se procede a la evaluación de la asignación comparando el valor de los desplazamientos químicos de cada señal con los valores estándar para cada tipo de átomo, seguido del cálculo de la estructura en función de los ángulos de torsión dentro de la proteína.

Modelo estructural: Cálculo de ángulos de torsión

El cálculo de ángulos y evaluación de la asignación se realiza considerando las restricciones de distancia derivadas del espectro NOESY. Este proceso se realiza con cálculos en programas



computacionales capaces de hacer una estadística de los desplazamientos químicos y la violación de restricciones de distancia. La estadística ayuda a evaluar la asignación y sugiere la modificación en las asignaciones con base en valores de desplazamiento dentro de bancos de datos como el *Biological Magnetic Resonance Bank* (BMRB).

La estructura de la proteína se calcula respetando las restricciones de distancia minimizando la energía del modelo a través de la modificación de los ángulos diedros. Esta modificación está implementada en el algoritmo de CYANA 2.1, donde durante el cálculo de estructura, las distancias atómicas de los grupos unidos covalentemente, los ángulos de enlace y la quiralidad de los grupos atómicos, permanecen invariantes durante todo el proceso de cálculo. Los ángulos diedros son modificados iterativamente hasta encontrar la convergencia con los datos experimentales. El modelo final es un ensamble de las mejores estructuras.

Refinamiento de la estructura por dinámica molecular

Finalmente, el ensamble estructural se somete a un refinamiento mediante dinámica molecular. De acuerdo a la metodología propuesta por Bin Xia<sup>32</sup> y adaptada por Gurrola<sup>33</sup> cada una de las estructuras del ensamble se calculan en vacío y solvente explícito utilizando el programa AMBER 9<sup>34,35</sup> y el campo de fuerza ff99SB. El refinamiento por dinámica tiene como finalidad estimar la estructura de la forma más realista posible con la inclusión de moléculas de disolvente a través de la minimización de los grados de libertad dentro de la estructura y de la energía del sistema.

## 1.3 Diseño experimental

En esta sección se describen las estrategias experimentales utilizadas en el proyecto de investigación de los péptidos tipo escorpina (rHge36 y HgeD) y la determinación estructural de GS-Tt28. En el caso de los péptido tipo escorpina, se realizaron estudios de actividad antiparasitaria en *Taenia crassiceps* y *Entamoeba histolytica* descritos en la parte final de la sección.

### 1.3.1 Biosíntesis de proteínas recombinantes

Los estudios estructurales de proteínas por RMN necesitan cantidades considerables de muestra (concentraciones desde 1.0 hasta 10.0 mM). Estas cantidades pueden ser generadas con técnicas como la recombinación genética, a partir del conocimiento de la secuencia de aminoácidos. La expresión de péptidos recombinantes generalmente se realiza en bacterias y de forma regular se obtienen buenos rendimientos. Sin embargo, en otras ocasiones la expresión y el rendimiento final están sujetos a las características intrínsecas de la proteína bajo estudio; por ejemplo, de la adopción de varios tipos de plegamiento dentro de la bacteria, la estabilidad de la conformación durante la purificación o incluso de la formación de enlaces disulfuro. Cuando la producción de las proteínas recombinantes es cuantitativa, es factible incorporar núcleos activos como  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$  para realizar experimentos tridimensionales de doble y triple resonancia.

#### Clonación

Con la finalidad de producir rHge36 (péptidos tipo escorpina, capítulo 2) y Tt28 (estudios de GS-Tt28, capítulo 3) se diseñaron los genes a partir de las secuencias de aminoácidos en los códigos Q0GY40 para rHge36 y P0C183 para Tt28; reportadas en la base de datos UniProt. El uso de codones se optimizó en el servidor DNA works<sup>36</sup> para inducir la expresión de los genes en *E. coli*. El diseño del gen incluyó los sitios de restricción KpnI (5') y BamHI (3') tomando en cuenta el marco de lectura del plásmido de expresión pET32a. Cada diseño incluyó un sitio de reconocimiento específico de proteasa localizado en el extremo amino terminal de la secuencia de interés; enterocinasa en el caso de rHge36 y trombina con el diseño de Tt28. La síntesis de los materiales genéticos fueron ordenadas a la empresa Epoch Life Sciences. El plásmido portador se clonó, los genes se extrajeron digiriendo el plásmido con enzimas de restricción y posteriormente purificando por electroforesis en geles de agarosa. Los genes se insertaron en el vector de expresión obteniendo los plásmidos pET32a-rHge36 y pET32a-GS-Tt28 mostrados respectivamente en los incisos a) y b) de la Figura 1.19. Las construcciones fueron secuenciadas en la empresa Laragen Inc. para verificar la obtención del material genético deseado.

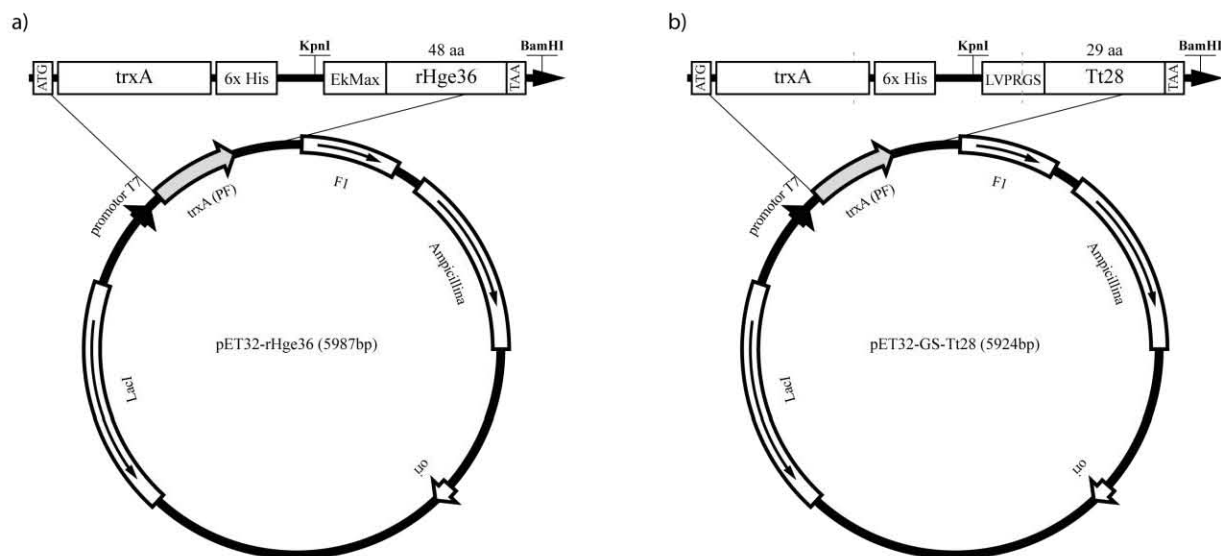


Figura 1.19. Diseño de los plásmidos pET32a-rHge36 (inciso *a*) y pET32a-GS-Tt28 (inciso *b*). En la figura se esquematiza la construcción verificada por secuenciación. La ampliación en la parte superior de cada figura detalla la composición de la proteína de fusión (PF) producida por *E. coli*. En ambas construcciones en el extremo amino terminal se cuenta con la presencia del dominio A de tiorredoxina (trxA) seguido de una etiqueta de 6 histidinas (6x His), útil durante la purificación del extracto celular. El sitio de reconocimiento de proteasa es distinto en cada caso; para en rHge36 se utilizó la proteasa enterocinasa (EKmax Invitrogen) y para Tt28 trombina (LVPRGS).

## Producción

Los plásmidos se introdujeron en cinco cepas de *E. coli* con la finalidad de evaluar la síntesis de cada una de las proteínas de fusión esquematizadas en la Figura 1.19. La metodología de síntesis que se utilizó fue originalmente diseñada para maximizar el aprovechamiento de reactivos enriquecidos con isótopos de  $^{15}\text{N}$  /  $^{13}\text{C}$  /  $^2\text{D}$  en *E. coli* <sup>37</sup>. Esta estrategia consiste en producir la mayor cantidad de biomasa utilizando medio de cultivo Luria Bertani (LB) sin enriquecimiento isotópico. El cultivo bacteriano se incuba hasta que las bacterias alcanzan la fase logarítmica del crecimiento bacteriano ( $\geq 0.700$  unidades de absorción a 600 nm). Los microorganismos se colectan por centrifugación y después se suspenden en disolución amortiguadora de fosatos para retirar los restos del medio LB. Posteriormente las células se centrifugan nuevamente y se suspenden en un cuarto del volumen del cultivo original sustituyendo el medio LB por M9 sin reactivos enriquecidos (composición detallada en el Apéndice A.1). Las células se incuban nuevamente en las condiciones previas durante una hora para fomentar que los microorganismos produzcan las enzimas necesarias para metabolizar los recursos del medio. Finalizado el periodo de adaptación, las células se centrifugan y suspenden nuevamente en la misma cantidad de medio M9; esta vez utilizando reactivos enriquecidos con isótopos de  $^{15}\text{N}$  o  $^{13}\text{C}$  de acuerdo con los requerimientos de los experimentos de RMN. La expresión se promueve añadiendo el inductor

apropiado (isopropil  $\beta$ -tiogalactopiranos, abreviado IPTG) e incubando el cultivo en las condiciones óptimas, determinadas en función de la cepa y de las características intrínsecas de la proteína. El medio M9 es sustituido por LB cuando la incorporación de isotopos específicos es innecesaria y solo se desea aumentar el rendimiento de la expresión<sup>37</sup>; en este caso, el periodo de adaptación se suprime pasando directamente a la inducción.

La proteína de fusión producida por cada cepa se extrajo con golpes sónicos después de la expresión. Las muestras lisadas se fraccionaron en sobrenadante y paquete celular por centrifugación. La cantidad de proteína en cada fracción se monitoreó por geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). El discriminante utilizado para elegir la cepa de expresión fue la cantidad de proteína soluble. Después de la evaluación, la producción se realiza en las células elegidas colectándolas por centrifugación para realizar la extracción y purificación de la proteína de fusión.

#### Aislamiento y corte enzimático

Cada gramo de células se suspendió en 25 ml de disolución amortiguadora BLI (Apéndice A.2). Las bacterias se lisaron aplicando 20 pulsos sónicos de 30 segundos con 60 Watts de potencia tomando 90 segundos de descanso entre cada pulso. El extracto celular se fraccionó por centrifugación (45 minutos a 39,000 x g y 4 °C). La fracción soluble se filtró con membranas de 0.45  $\mu$ m de tamaño de poro hechas de Polifluoruro de vinilideno (PVDF) para garantizar una baja adherencia de proteínas al filtro. La mezcla proteica fue separada por cromatografía de afinidad metal quelato (CAMQ) realizando incrementos escalonados de la concentración de imidazol: 5 volúmenes de columna de LHI seguidos de 5 más de LHII y finalmente 2.5 volúmenes de columna de BEI (composición detallada de las disoluciones amortiguadoras en la sección de Apéndices A.2). La proteína de fusión fue aislada gracias a la etiqueta de histidinas. La fracción con proteína de fusión se dializó contra en disolución amortiguadora BCI (GS-Tt28) y BCII (rHge36) (Apéndice A.2). La cuantificación se realizó por ensayo de Bradford y la concentración de proteína se ajustó a 3.0 mg/ml. Por cada ml de disolución se añadieron 0.5 unidades de enterocinasa (EkMax; Invitrogen) en el caso de Hge36 y en el de GS-Tt28 se añadieron 10  $\mu$ l de trombina. Después de 8 horas a 25 °C, ambas mezclas de reacción se fraccionaron por CAMQ sin la inclusión de gradientes de imidazol; aislando en este proceso la fracción con rHge36 y GS-Tt28.

### 1.3.2 Purificación por cromatografía líquida de alta eficiencia y caracterización por espectrometría de masas

#### Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa

Las proteínas recombinantes fueron purificadas por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC). La muestra se preparó utilizando una columna Strata-C18-T (Phenomenex). La proteína se recuperó con una disolución de acetonitrilo (ACN) acuoso al 40% v/v, se liofilizó y se resuspendió en ACN acuoso al 15% v/v adicionado con ácido trifluoroacético (TFA) al 0.05% v/v. La purificación por RP-HPLC se realizó con una columna Proteo C12 de fase reversa (250 mm de largo, 4.6 mm de diámetro interno, 4  $\mu$ m de tamaño de partícula y 90 Å de tamaño de poro). El gradiente crece en la concentración de ACN del 15.0% al 30.0% (adicionado con 0.05% v/v TFA) en 10 minutos.

#### Determinación del peso molecular y conectividad de puentes disulfuro

Las fracciones obtenidas en el proceso de purificación por RP-HPLC se analizaron por espectrometría de masas (MALDI-TOF) utilizando un equipo MicroFlex Bruker Daltonics LT. Un  $\mu$ l de analito se diluyó con 10  $\mu$ l de una disolución saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico en ACN acuoso al 66.0% v/v adicionado con TFA 0.05% v/v<sup>38</sup>. Un  $\mu$ l de esta mezcla se cargó en la placa para el análisis.

La determinación de la conectividad de los puentes disulfuro se realizó mezclando 5  $\mu$ g de proteína pura con 0.25  $\mu$ g de tripsina (relación de peso w/w de sustrato y enzima 20:1) disolviendo las proteínas en 25  $\mu$ l de una disolución amortiguadora de Tris 50 mM a pH 8.0. La reacción se incubó a 37 °C durante 16 horas. Los productos de la reacción se analizaron por MALDI-TOF. Con GS-Tt28, además de tripsina se añadió la misma cantidad de enzima Glu-C.

### 1.3.3 Corte con bromuro de cianógeno

Una muestra de péptido tipo escorpina fue disuelta directamente en ácido trifluoroacético acuoso al 50% v/v hasta alcanzar una concentración de 10 mg/ml. El oxígeno en la disolución fue purgado burbujeando nitrógeno por un lapso de 15 a 30 minutos. El bromuro de cianógeno se añadió procurando una proporción de 100 equivalentes de reactivo (disuelto en ACN con una concentración de 5.0 M) por cada equivalente de metionina en la secuencia de la proteína. La reacción se protegió de fuentes de luz y se mantuvo en agitación constante bajo atmósfera de nitrógeno durante 24 horas. La reacción se concluyó añadiendo un volumen de agua equivalente a 4 veces el volumen de reacción. La disolución se diluyó con más agua hasta que el valor del pH fue

igual o mayor a 1.5. La muestra se preparó con columnas Strata para una nueva purificación por RP-HPLC.

#### 1.3.4 Determinación estructural por resonancia magnética nuclear

##### Muestras y experimentos

Las muestras liofilizadas fueron disueltas en agua desionizada adicionada con agua deuterada al 5.0% v/v. La concentración de proteína fue respectivamente de 3.0 y 1.0 mM para los espectros obtenidos en los equipos de 500 y 700 MHz; en el caso de GS-Tt28 únicamente se realizaron experimentos con 1.0 mM de muestra en el equipo de 500 MHz. En el equipo Varian Innova (operando a 500 MHz) se colectaron los experimentos unidimensionales de hidrógeno, los bidimensionales homonucleares DQF-COSY, TOCSY (80 ms de tiempo de mezclado) y NOESY (150 y 300 ms de tiempo de mezclado). Los experimentos tridimensionales de rHge36 se realizaron en el equipo de 500 MHz con las muestras simple y doblemente enriquecidas en  $^{15}\text{N}$  y  $^{13}\text{C}$  /  $^{15}\text{N}$ ; utilizando una sonda de 3.0 mM equipado con tres canales. Con la muestra enriquecida solo en  $^{15}\text{N}$  se adquirieron los experimentos tridimensionales de doble resonancia NOESY-HSQC y TOCSY-HSQC; mientras que con la muestra doblemente enriquecida fueron adquiridos los espectros tridimensionales de triple resonancia HNCO, HNCACO, HNCA, HN(CO)CA, CBCANH y CBCACONH. En el equipo Bruker ASCEND del Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear (operando a 700 MHz) se realizaron los espectros bidimensionales homonucleares TOCSY (80 ms de tiempo de mezclado) y NOESY (150 ms de tiempo de mezclado) para rHge36 y HgeD. La supresión de la señal de agua en los espectros bidimensionales se realizó con el método DDPFGSE<sup>30</sup>.

##### Asignación y cálculo de la estructura

Los experimentos se asignaron en el software CARI 1.8<sup>21</sup>. Los sistemas de espín se identifican con los espectros DQF-COSY, TOCSY, NOESY. Con rH36 se utilizaron los experimentos de doble resonancia NOESY-HSQC y TOCSY-HSQC; además de los experimentos de triple resonancia HNCO, HNCACO, HNCA, HN(CO)CA, CBCANH y CBCACONH. Las restricciones y la estructura se calcularon en el programa CYANA 2.1<sup>22</sup>. El refinamiento de la estructura se realizó en AMBER 9<sup>34,35</sup> siguiendo el protocolo de Xia<sup>32</sup> y la adaptación de Gurrola<sup>33</sup>, con el campo de fuerza ff99SB.

### 1.3.5 Ensayos de actividad

#### Actividad de los péptidos tipo escorpina en *Taenia crassiceps*

Los ensayos de actividad antiparasitaria fueron realizados en la facultad de Medicina por el Dr. Oscar Rodríguez Lima en colaboración con el laboratorio del Dr. Abraham Landa. Los cisticercos usados en los ensayos de actividad antiparasitaria fueron obtenidos de ratones hembra de 6 semanas de edad, previamente infectados en la cavidad peritoneal con la cepa WFU de *T. crassiceps*. Los ratones fueron adquiridos en Harlan Laboratories (Mexico) y mantenidos en un ambiente controlado libre de patógenos en la facultad de medicina UNAM. Los animales fueron monitoreados día a día evaluando la salud hasta el momento de ser sacrificados después de 90 días de infección. Los cisticercos extraídos de los ratones fueron lavados con disolución amortiguadora de fosfatos (PBS 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2) previamente esterilizado e incubado a 4 °C.

Los cisticercos de *T. crassiceps* obtenidos en el paso anterior se seleccionaron tomando como parámetro de elección un diámetro interno de 2–3 mm. Los cisticercos fueron incubados una noche a 37 °C en una incubadora de humedad y concentración controlada de CO<sub>2</sub> (5%) en medio RPMI 1640 (GIBCO-BRL) adicionado con 1.0 mM de piruvato de sodio, 0.1 mM penicilina (100 U/mL) y estreptomomicina (110 µg/mL). Al siguiente día, un grupo de 20 cisticercos fueron tratados con diferentes concentraciones de los péptidos rHge36 y HgeD: 10, 50, 100, 200, 500 y 1000 nM. Los ensayos fueron monitoreados por periodos de: 1, 3, 6, 12 y 24 h. Los parámetros usados para evaluar la viabilidad fueron la motilidad y la integridad del cisticerco previo a la evaginación del escólex. La motilidad e integridad de la pared vesicular fueron evaluados por observación directa en un microscopio invertido (Nikon, Eclipse TS 100-F). El porcentaje de evaginación fue calculado después de la incubación del cisticerco en 1% de bilis de cerdo en medio RPMI durante 2 horas. Como control se incubaron grupos de 20 cisticercos en medio RPMI (control negativo), con praziquantel (PZQ) disuelto en etanol (EtOH; control positivo) a diferentes concentraciones (0.0001, 0.01, 1, 10, 50 and 100 nM). A la par se probó un control del vehículo (EtOH, final concentration of 0.5% v/v).

#### Declaración de ética en el manejo de animales

Los animales utilizados fueron sacrificados usando Pentobarbital i.v. (210 mg/kg), de acuerdo a la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. El protocolo de investigación fue aprobado por el comité de investigación y ética de la facultad de medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (007-2012).

## Actividad en *Entamoeba histolytica*

### Viabilidad parasitaria

Los ensayos de actividad antiparasitaria en *Entamoeba histolytica* fueron hechos por la Dra. Yanis Toledano como se describe a continuación. Trofozoítos de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS fueron cultivados de forma axénica en medio TYI-S33. Las amibas fueron uniformemente distribuidas en una placa de 96 pozos ( $1 \times 10^5$  de trofozoítos vivos) bajo condiciones anaeróbicas con 300  $\mu\text{L}$  de medio TYI-S33 suplementado con cada una de las siguientes concentraciones de proteínas: 1000, 100, 10 y 1 nM.

La viabilidad de los trofozoítos amibianos fue evaluada con el marcador vital azul de tripano tomando lecturas a las 24, 48 y 72 en microscopio y hemocitómetro. Muestras de 100  $\mu\text{L}$  con alrededor de  $1 \times 10^4$  parásitos tratados con los péptidos fueron mezclados con 1  $\mu\text{L}$  de azul de tripano al 0.4% e incubadas a temperatura ambiente durante 3 minutos.

### Citotoxicidad en linfocitos de sangre periférica humana

El mecanismo de muerte celular se evaluó mediante citometría de flujo. En el estudio se utilizaron los reactivos del kit FITC Annexin V Apoptosis Detection con PI (Biolegend, USA) de acuerdo al protocolo provisto con las sustancias. Las células tratadas con los péptidos fueron lavadas con la disolución amortiguadora de fosfatos y suspendidas en la disolución amortiguadora hasta alcanzar una concentración de  $0.5 \times 10^7$  células/mL. Cien  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular fueron introducidos al tubo especializado para realizar la citometría de flujo. De forma inmediata, 5  $\mu\text{L}$  de FITC anexina V seguido de 10  $\mu\text{L}$  de yoduro de propidio se añadieron y mezclaron en el tubo. Pasados 15 minutos de incubación a temperatura ambiente (25 °C) y en ausencia de luz, 400  $\mu\text{L}$  de anexina V en disolución amortiguadora de unión fueron añadidos a cada uno de los tubos para finalmente analizar por citometría de flujo en un equipo FACSCan (BD, USA).

Los linfocitos de los ensayos se obtuvieron de muestras de sangre procedentes de individuos sanos que dieron su consentimiento expreso. Estos se aislaron en un gradient de Ficoll y se trasladaron a cajas Petri en condiciones estériles con medio RPMI 1640. Las cajas se incubaron a 37 °C con atmosfera controlada y acondicionada con el 5% de CO<sub>2</sub>. Los linfocitos fueron clasificados por citometría de flujo usando el anticuerpo específico F4/80.

El efecto de los péptidos tipo escorpina fue evaluado en los cultivos de amibas para determinar el valor de la concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>). La viabilidad de los linfocitos fue determinada por triplicado en tres ensayos independientes. Por cada experimento, se añadieron 90



$\mu\text{l}$  de medio RPMI y  $1 \times 10^5$  linfocitos en cada espacio de una placa de 96 pozos. Las concentraciones probadas corresponden a cada uno de los valores de  $\text{IC}_{50}$  de cada péptido tipo escorpina probado. Los cultivos se incubaron durante 72 horas para determinar por citometría de flujo los porcentajes de viabilidad, apoptosis y necrosis utilizando en el kit *V-FITC apoptosis detection kit 1* (BD Pharmingen, USA), de acuerdo al protocolo establecido por BD Pharmingen. El medio de cultivo de cada pozo fue remplazado por PBS 1X y se añadieron los marcadores anexina V y yoduro de propidio incubando el cultivo durante 15 minutos. Después de este tiempo, las células se fijaron con  $50 \mu\text{l}$  de una disolución de *p*-formaldehído al 3.7%. Las muestras se analizaron por citometría de flujo en un equipo FACS Aria (Becton Dickinson, USA).

## Capítulo 2 Péptidos tipo escorpina Hge36 y HgeD

---

<b>2.1 INTRODUCCIÓN: PÉPTIDOS TIPO ESCORPINA.....</b>	<b>33</b>
<b>2.2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
<b>2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>36</b>
2.3.1 BIOSÍNTESIS.....	36
2.3.2 PURIFICACIÓN Y CONECTIVIDAD DE PUENTES DISULFURO .....	38
2.3.3 ESTRUCTURAS DE RHGE36 Y HGED RESUELTAS POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR .....	40
2.3.4 ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA .....	48
<b>2.4 CONCLUSIONES .....</b>	<b>54</b>

---

## 2.1 Introducción: péptidos tipo escorpina

En el año 2003, R. Conde y sus colaboradores publicaron un análisis del veneno del alacrán *Pandinus imperator* en el cual reportaron la identificación de la escorpina (UniProt: P56972)<sup>3</sup>. En el estudio, esta proteína de 94 aminoácidos, demostró ser un potente agente antimicrobiano con una interesante actividad antiparasitaria en *Plasmodium berghei*. La escorpina afecta la etapa de desarrollo del parásito tanto en ensayos *in vitro*<sup>3,39,40</sup> como *in vivo*<sup>41-43</sup>. A partir de este estudio, algunos péptidos huérfanos del veneno se les comenzó a comparar con la escorpina y a nombrar péptidos tipo escorpina. Este tipo de moléculas están ampliamente distribuidas en el veneno<sup>44,45</sup> de diferentes especies de escorpiones con distintos tipos de propiedades<sup>46</sup>. Las principales características de estos componentes del veneno son sus efectos citolíticos, la actividad antimicrobiana y el efecto tóxico a través del bloqueo de canales iónicos de potasio<sup>47</sup>.

Los péptidos semejantes a la escorpina de *P. imperator* también se han logrado identificar a partir de los precursores secuenciados directamente de las librerías extraídas de las glándulas de veneno de un gran número de especies<sup>48</sup>. Un ejemplo de este grupo de homólogos es HS-1 el cual presentan actividad como agente antimicrobianos (UniProt: P0C2F4)<sup>44</sup>. Ev7 es un ejemplo de péptido tipo escorpina bloqueador de canales iónicos de potasio (UniProt: P0DL47)<sup>49</sup>. Otro de ellos con efectos citolíticos es HgeScplp1 (UniProt: Q0GY40<sup>45</sup>).

Los péptidos tipo escorpina están relacionados con los péptidos de la familia  $\beta$ -KTx<sup>50-53</sup>. En esta familia se pueden encontrar péptidos que bloquean canales iónicos de potasio como la toxina TsTXK-beta (UniProt: P69940<sup>50</sup>). Otros péptidos muestran otras actividades, como LaIT2 (UniProt: C7G3K3<sup>53</sup>) con efecto antibacterial y MeuTXKbeta1 (UniProt: A9XE60<sup>54</sup>) con actividad antiparasitaria. La familia  $\beta$ -KTx se clasifican en tres subfamilias. La subfamilia 1 incluye toxinas como TsTXK-beta. En la familia 2 se incluyen toxinas como BmTXK-beta (UniProt: Q9NJC6<sup>52</sup>). En la subfamilia 3 se incluyen a los péptidos tipo escorpina.

Los péptidos maduros tipo escorpina están compuestos por un extremo amino terminal “extendido” (primer domino) seguido por un motivo estructural alfa / beta estabilizado por puentes disulfuro predicho por homología entre secuencias de aminoácidos (CS- $\alpha/\beta$ ; segundo dominio). Existen estudios donde se demuestra que el dominio amino terminal de la toxina MeuTXKbeta1 (subfamilia 1<sup>54</sup>), MeuTXKbeta3 (subfamilia 2, UniProt: P0CH57<sup>55</sup>) y la Opiscorpina-1 (subfamilia 3, UniProt: Q5WR03<sup>56</sup>) pueden adoptar una hélice alfa anfipática inducida en disolución. Hasta ahora no se tiene ningún reporte que demuestre experimentalmente la presencia del motivo CS- $\alpha/\beta$  en el

segundo dominio; el cual se le relaciona estrechamente con las defensinas de invertebrados y en menor grado con las toxinas de escorpión clásicas<sup>45,51,56</sup>. La contribución de cada dominio a la actividad de los péptidos tipo escorpina sigue sin ser completamente explorada. No obstante, los reportes de actividad de péptidos de la familia  $\beta$  como MeuTXKbeta1, MeuTXKbeta3 y Opiscorpine-1<sup>53-55</sup> señalan que el extremo amino terminal está directamente relacionado con el efecto antimicrobiano.

El péptido tipo escorpina HgeScplp1 (subfamilia 3) sigue con la tendencia anterior. Cuando el péptido conserva el segmento de aminoácidos del 4 al 31 se observa una actividad citolítica. Al perder estos aminoácidos su actividad antibacteriana se suprime. Por otro lado, los últimos 44 residuos presentan actividad de bloqueo en canales iónicos de potasio (HgeD, residuos del aminoácido 33 al 76)<sup>45</sup>. En el mismo veneno donde fue aislado HgeScplp1 se encontró una versión de 48 aminoácidos llamada Hge36 (residuos del aminoácido 29 al 76). Este último péptido carece de la actividad citolítica de HgeScplp1, pero posee una actividad de bloqueo atenuada respecto a HgeD<sup>45</sup>. Este hecho es común en otros péptidos tipo escorpina y toxinas de la familia  $\beta$  donde las versiones trunca tienen una actividad contrastante comparadas con la versión completa<sup>57,58</sup>. Por ejemplo, la supresión de los aminoácidos 2-64 del péptido AaTXK-beta (subfamilia 1, UniProt: P69939) provoca que la toxina tenga actividad sobre los canales Kv7, mientras que la versión completa se mantiene inactiva<sup>59</sup>.

Con estos antecedentes en mente se planteó la obtención del péptido recombinante rHge36 y HgeD para correlacionar los cambios estructurales con el cambio en la actividad. Adicionalmente se complementa el estudio con ensayos de actividad antiparasitaria en *Entamoeba histolytica* y *Taenia crassiceps*. En este capítulo se demuestra la importancia de la región amino terminal y se reporta la primera estructura de la subfamilia 3 de toxinas beta.

## 2.2 Hipótesis y objetivos

El extremo amino terminal Hge36 modula la actividad biológica de la toxina modificando la topología de esta región sin alterar sustancialmente el plegamiento del resto del péptido. La supresión de esta región impulsa la actividad de bloqueo al generar una región más compacta y mejor estructurada promoviendo la interacción con sus blancos biológicos.

Lo anterior establece la importancia de la región amino terminal en la interacción con distintos tipos de canal y sugiere que esta región está involucrada directamente en el reconocimiento molecular.

Los objetivos planteados para comprobar la hipótesis son:

- Resolver las estructuras de rHge36 y HgeD por RMN y hacer una comparación para destacar las diferencias en los modelos estructurales.
  - Producir y purificar los péptidos rHge36 y HgeD.
  - Enriquecer isotópicamente en  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$  para realizar la asignación completa de los sistemas de espín.
- Demostrar que los péptidos recombinantes poseen actividad biológica
  - Realizar pruebas antiparasitarias en *Taenia crassiceps* y *Entamoeba histolytica*.
  - Contrastar la actividad entre rHge36 y HgeD.

## 2.3 Resultados y discusión

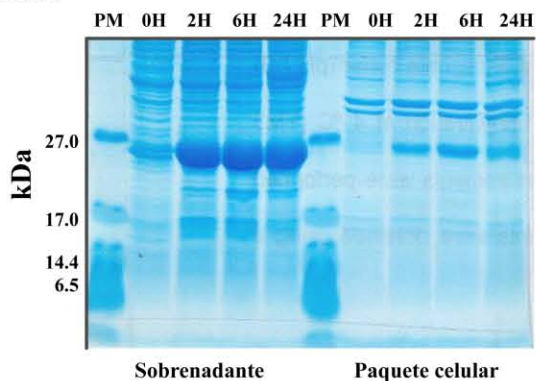
### 2.3.1 Biosíntesis

La producción de la proteína de fusión se evaluó en cinco cepas de *E. coli* con características diferentes. La cepa Rosetta optimiza la expresión de proteínas con codones de eucariontes, esto significa que la cepa es capaz de leer codones que son poco frecuentes en este organismo y realizar la expresión de los genes. Origami es un organismo mutado, cuyos metabolitos favorecen la formación de enlaces disulfuro. Bl21 Star se utiliza para realizar la producción de proteínas recombinantes con grandes rendimientos. Bl21 Gold tiene las mismas características de la cepa Star pero a diferencia de esta, la cepa Gold tiene una mayor resistencia en la expresión de proteínas tóxicas. Finalmente, la cepa Tuner regula la expresión de proteínas en función de la cantidad de inductor añadido al medio; de esta forma facilita la expresión de proteínas cuya cinética de plegamiento está desfavorecida.

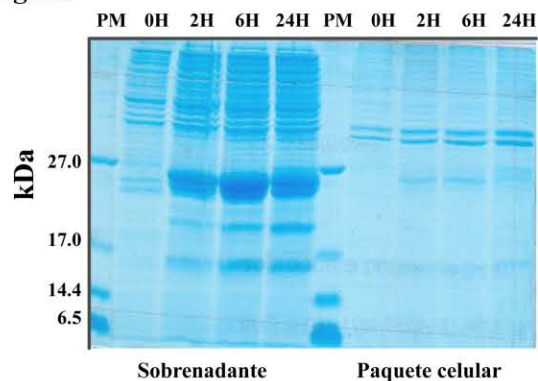
El criterio utilizado para la elección de la cepa fue la cantidad de proteína en la fracción soluble (sobrenadante). Aquella cepa que obtuviese no solo una producción aceptable sino también la mayor parte soluble sería la elegida para continuar con el proyecto. Las características de la proteína estudiada (presencia de varios residuos hidrofílicos) facilitó la solubilidad en todas las cepas. Con base en los resultados mostrados en la Figura 2.1 se eligió a Rosetta. Las condiciones optimizadas fueron 30 °C, 0.5 mM IPTG, 220 rpm y 16 horas de incubación empleando la técnica de Marley<sup>37</sup>. Esta técnica se utilizó para generar las muestras sin enriquecer y con la incorporación de isótopos de <sup>15</sup>N y <sup>13</sup>C.

## Hge36

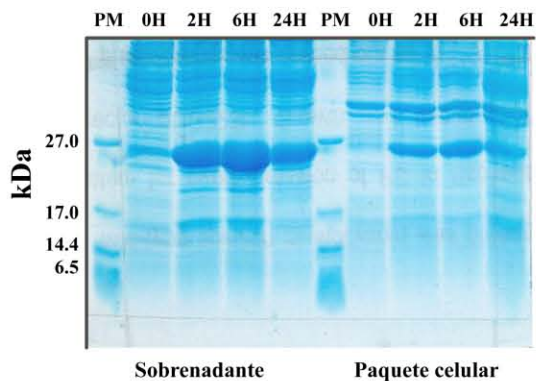
### Rosetta



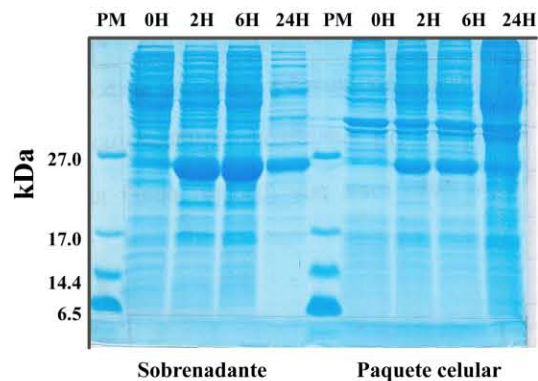
### Origami



### BL21 Gold



### BL21 Star



### Tuner

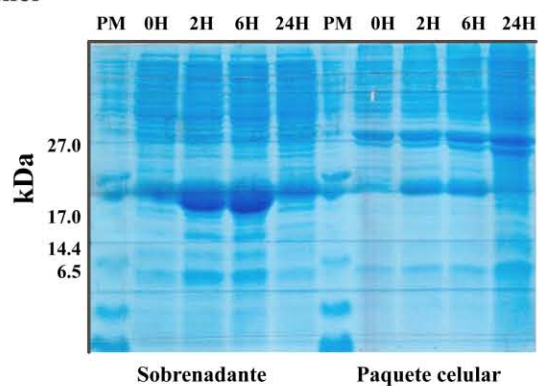


Figura 2.1. Cinéticas de expresión a 30 °C y 0.5 mM de IPTG. La producción de la proteína de fusión se monitoreo en las cepas mostradas en la figura. La elección se realizó en función de la cantidad de proteína en la parte soluble (sobrenadante) después de la inducción. Los números a la izquierda de los geles indican el peso molecular de los marcadores. La proteína de fusión pesa cerca de 26.0 kDa.

Dado el número de aminoácidos de rHge36 (48 aminoácidos) los experimentos de RMN mostraron un traslape de señales considerable dificultando la asignación. Se obtuvieron las muestras enriquecidas en  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$  para realizar la determinación estructural por RMN utilizando experimentos en 3 dimensiones. Como se demuestra más adelante, la complejidad de los espectros de RMN justificó la implementación de técnicas avanzadas de RMN. Las condiciones optimizadas (Figura 2.1) se utilizaron para producir la proteína de fusión de rHge36 tanto en medio LB como en M9. En el último medio, la proteína se enriqueció de forma simple con  $^{15}\text{N}$  y doblemente con la incorporación de  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}^\dagger$ .

### 2.3.2 Purificación y conectividad de puentes disulfuro

La proteína de fusión se purificó por cromatografía de afinidad metal quelato (CAMQ). La fracción con la proteína de interés se dializó y cortó con enterocinasa (Figura 2.2). El rendimiento global en la obtención de rHge36 pura es  $5.3 \pm 0.3$  mg/l. En el proceso de purificación se identificó el péptido M-HgeD (Figura 2.3 inciso a). La obtención del péptido M-HgeD fue fortuita ya que es un producto lateral del corte de la proteína de fusión con enterocinasa ( $4.9 \pm 0.3$  mg/l). Este péptido se aprovechó para realizar el corte con CNBr y obtener HgeD (Figura 2.3 b). La eficiencia con 24 horas de reacción fue del  $36 \pm 5\%$ . El rendimiento en la obtención y purificación de HgeD fue de  $1.7 \pm 0.3$  mg/l. La pureza y de cada péptido se verificó por espectrometría de masas usando la técnica MALDI-TOF. En la Figura 2.3 se encuentran los cromatogramas de la purificación y los espectros de masas de cada uno de los péptidos purificados (incisos c-e).

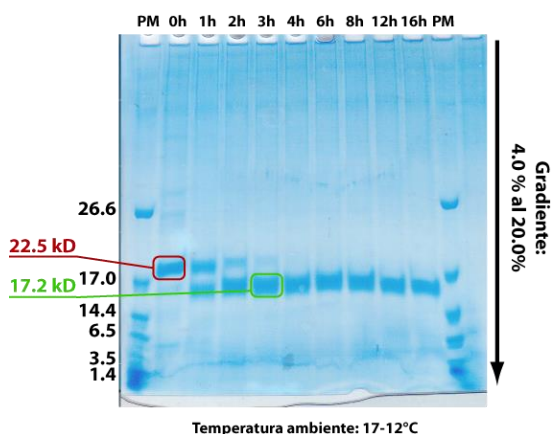


Figura 2.2. Gel SDS-PAGE de la cinética de corte enzimático de la proteína de fusión que contiene a rHge36. En color rojo se señala el peso de la proteína de fusión y en verde el del residuo de corte. rHge36 tiene un peso molecular que de 5.2 kDa.

<sup>†</sup> La muestra enriquecida solo con  $^{15}\text{N}$  se utilizó para los experimentos en 3D de doble resonancia, mientras que la proteína con isotopos de  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$  se usó para los experimentos 3D de triple resonancia.



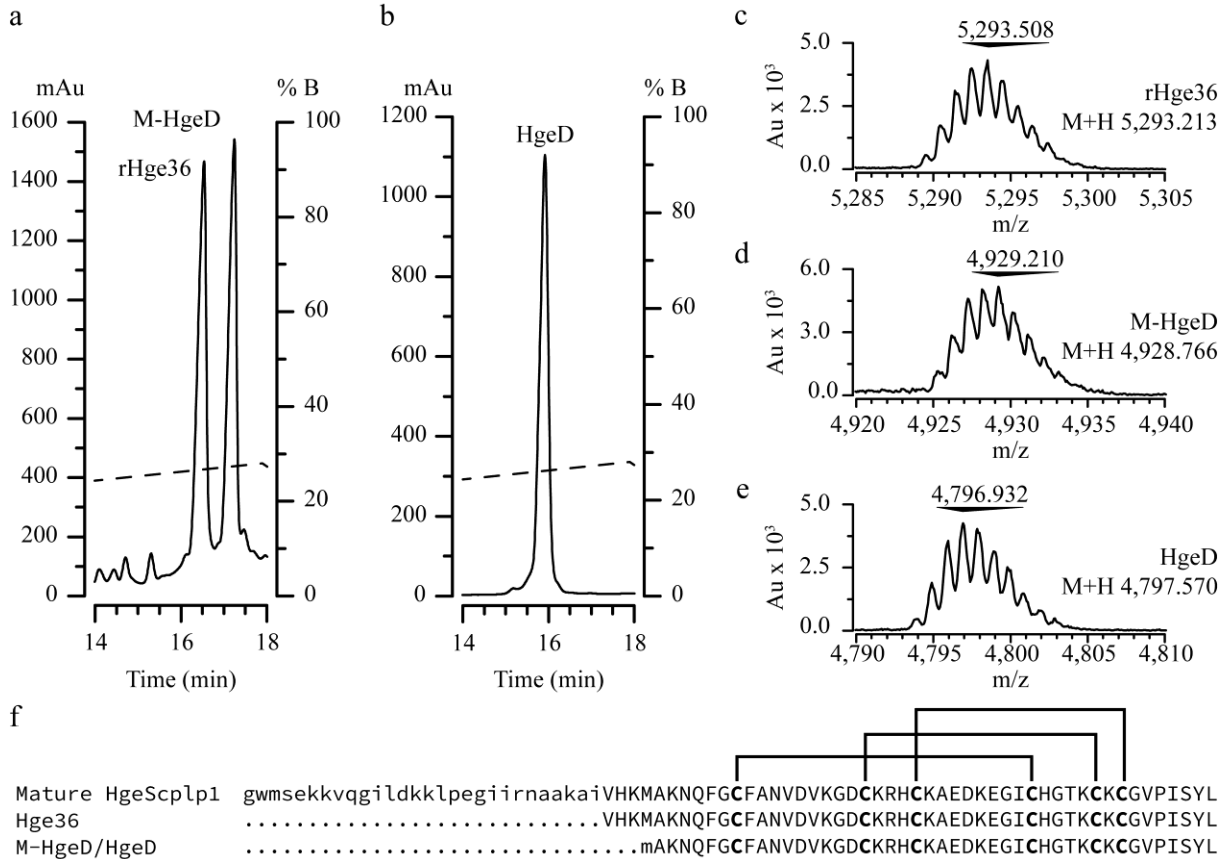


Figura 2.3. Caracterización de los péptidos tipo escorpina. Purificación (incisos a y b), caracterización por espectrometría de masas (incisos c, d y e) y alineamiento (f) de los péptidos recombinantes tipo escorpina producidos en el trabajo de investigación con HgeSc1p1 el péptido tipo escorpina con actividad citolítica/antimicrobiana.

La conectividad de los puentes disulfuro se determinó digiriendo una muestra pura de rHge36 con Tripsina. Las masas de los productos de la digestión se obtuvieron por espectrometría de masas MALDI-TOF. Dichos espectros confirman el patrón de conectividad entre las cisteínas C1-C4, C2-C5 y C3-C6<sup>§</sup>. Este patrón de conectividad es típico del motivo estructural CS- $\alpha/\beta$  el cual se ha relacionado con la familia de toxinas  $\beta$ <sup>60</sup>.

<sup>§</sup> La numeración ordinal de las cisteínas corresponde a su aparición en la secuencia de aminoácidos y no a la posición en la secuencia.

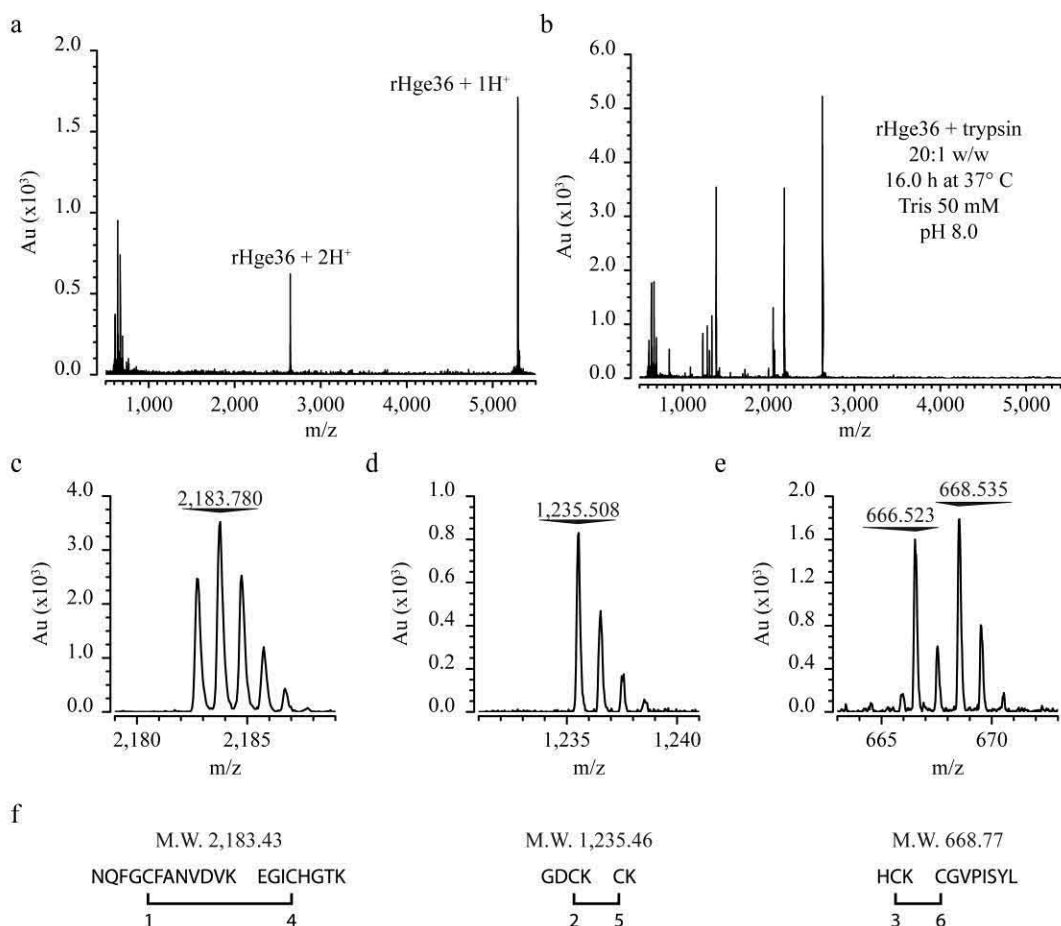


Figura 2.4. determinación de la conectividad de los puentes disulfuro en rHge36. El inciso a muestra el espectro de masas de una muestra pura de rHge36. En el inciso b) se muestra la digestión con Tripsina. Los incisos c), d) y e) muestran los valores experimentales claves para determinar la conectividad del péptido. Finalmente, en f) los fragmentos y sus pesos moleculares.

### 2.3.3 Estructuras de rHge36 y HgeD resueltas por resonancia magnética nuclear

La asignación de los sistemas se realizó con los espectros de dos y tres dimensiones. El cálculo de las estructuras de rHge36 y HgeD se realizó en el programa CYANA 2.1<sup>22</sup> obteniendo las restricciones de distancias de los espectros NOESY. La conectividad de los puentes disulfuro se integró en los cálculos. En la Tabla 2.1 se resume la cantidad y tipo de restricciones de distancias para las dos estructuras. Con los modelos estructurales de se realizó un refinamiento de dinámica molecular en AMBER 9 para definir las zonas sin restricciones en el modelo estructural<sup>32-35</sup>.

Tabla 2.1. Restricciones de distancias obtenidas en el programa CYANA 2.1 para la determinación estructural por RMN de rHge36 y HgeD.

Restricciones	rHge36	HgeD
Totales	715	655
Locales, $ i-j  \leq 1$	496	433
Intermedias, $1 <  i-j  < 5$	100	90
Largo alcance, $ i-j  \geq 5$	119	132
Función objetivo	0.15	0.21
RMSD <sup>⊠</sup>	0.34 Å	0.24 Å

<sup>⊠</sup> El RMSD (root mean square deviation) se calculó del segundo al penúltimo aminoácido de cada una de las secuencias

### Modelo estructural de rHge36

Las restricciones de rHge36 descritas en la Tabla 2.1 se ilustran en la Figura 2.5 con una ligera modificación. En la figura, las restricciones locales se subdividen en contribuciones intraresiduo ( $|i-j| = 0$ ) y secuenciales ( $|i-j| = 1$ ). Cada restricción contribuye en diferentes niveles al plegamiento de rHge36. Las restricciones locales ( $|i-j| \leq 1$ ) involucran las asignaciones intraresiduo y las secuenciales contribuyen a la conformación de las cadenas laterales y algunos ángulos de torsión de la cadena principal. Las restricciones intermedias ( $1 < |i-j| < 5$ ) permiten definir los elementos de estructura secundaria como hélices alfa o giros y algunos contactos de hoja beta paralela o antiparalela. Las restricciones más relevantes son las de largo alcance ( $|i-j| \geq 5$ ); con estas se definen elementos estructurales como hojas beta e interacciones de la estructura terciaria y cuaternaria en caso de existir.

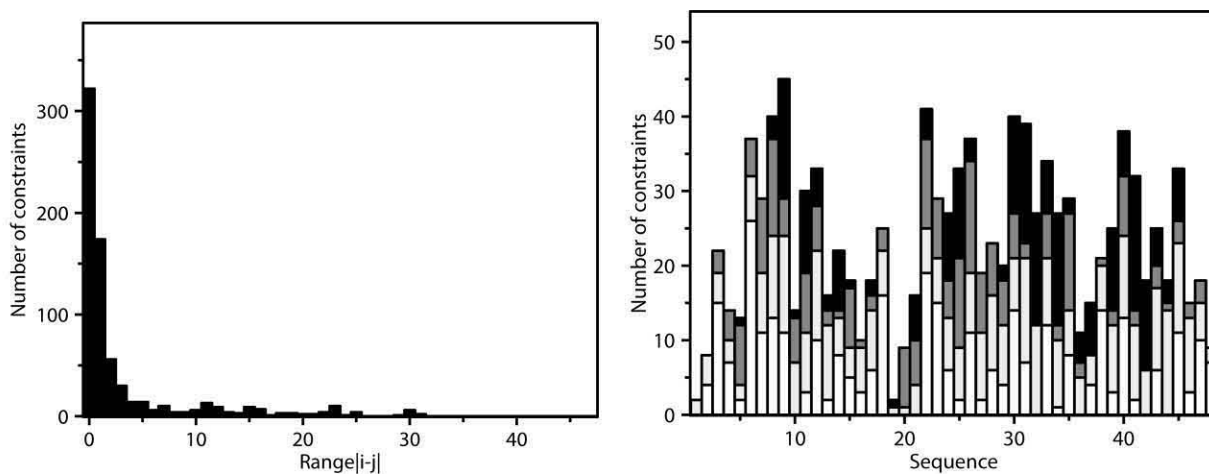


Figura 2.5. Gráficos del número y tipo de restricciones para rHge36. En la primera gráfica muestra una distribución del tipo de restricciones usadas en el modelo estructural. Por ejemplo, si existe una restricción entre el aminoácido 2 y el 15, la diferencia  $|i-j|$  es igual a 13; por tanto, en 13 se coloca el número de restricciones NOE entre los aminoácidos 2 y 15, además de cualquier otro par de aminoácidos cuyo valor absoluto de la diferencia de su posición en la secuencia sea igual a 13. En la segunda gráfica se muestran las restricciones que forman cada uno de los aminoácidos. Por ejemplo, el aminoácido 30 tiene aproximadamente 15 restricciones intraresiduo ( $|i-j| = 0$ ) denotadas con la barra de color blanco. Las de barras de color gris claro simbolizan las restricciones con los aminoácidos secuenciales 29 y 31 ( $|i-j| = 1$ ); mientras que las de color gris oscuro son las restricciones a media distancia ( $1 < |i-j| < 5$ ). Finalmente, en color negro se muestran las restricciones a larga distancia donde se cumple la relación  $|i-j| \geq 5$ .

La asignación completa de los sistemas de espín se realizó con los espectros en dos dimensiones DQF-COSY, TOCSY y NOESY (150 y 300 ms). La asignación de la cadena principal se realizó con los experimentos en 3D de triple resonancia HNCOCA, HNCA, HNCO, HNCACO CBCANH y CBCACOHN/HNCOACB (Apéndice A.3). Los protones de amida de los aminoácidos 20 y 21 (Glu y Cys; respectivamente) dan una señal ancha cuya intensidad es cercana al nivel base del espectro. Esto dificultó su asignación en los espectros de dos dimensiones y solo a través de los experimentos en 3 dimensiones se encontraron convincentemente las señales de dichos protones. Además de esto, los experimentos tridimensionales permitieron realizar la asignación de las señales traslapadas alrededor de 8.56 y 8.86 ppm. La conectividad de los puentes disulfuro se corroboró con la asignación de los espectros NOESY. Los protones  $\beta$  de las cadenas laterales de las cisteínas en puente se encuentran a una distancia menor de 5.0 Å dependiendo de la disposición espacial de la cadena lateral. La cercanía de los protones beta puede llegar a ser totalmente incidental pero dada la evidencia de la espectrometría de masas se puede confirmar la cercanía con certeza. En la Figura 2.6 se desglosa las interacciones determinadas con el experimento NOESY (contactos NOE). En la parte izquierda de la figura se describen algunos tipos de interacción entre los protones de amida ( $^1H_N$ ), alfa ( $^1H_\alpha$ ) y beta ( $^1H_\beta$ ). Esta figura muestra la

cantidad y tipo de interacciones que ayudan a definir el modelo estructural. Por ejemplo, los aminoácidos de las posiciones 21 a la 29 tienen una gran cantidad de interacciones que se reflejan directamente en el modelo estructural ya que en esta región se forma una hélice alfa.

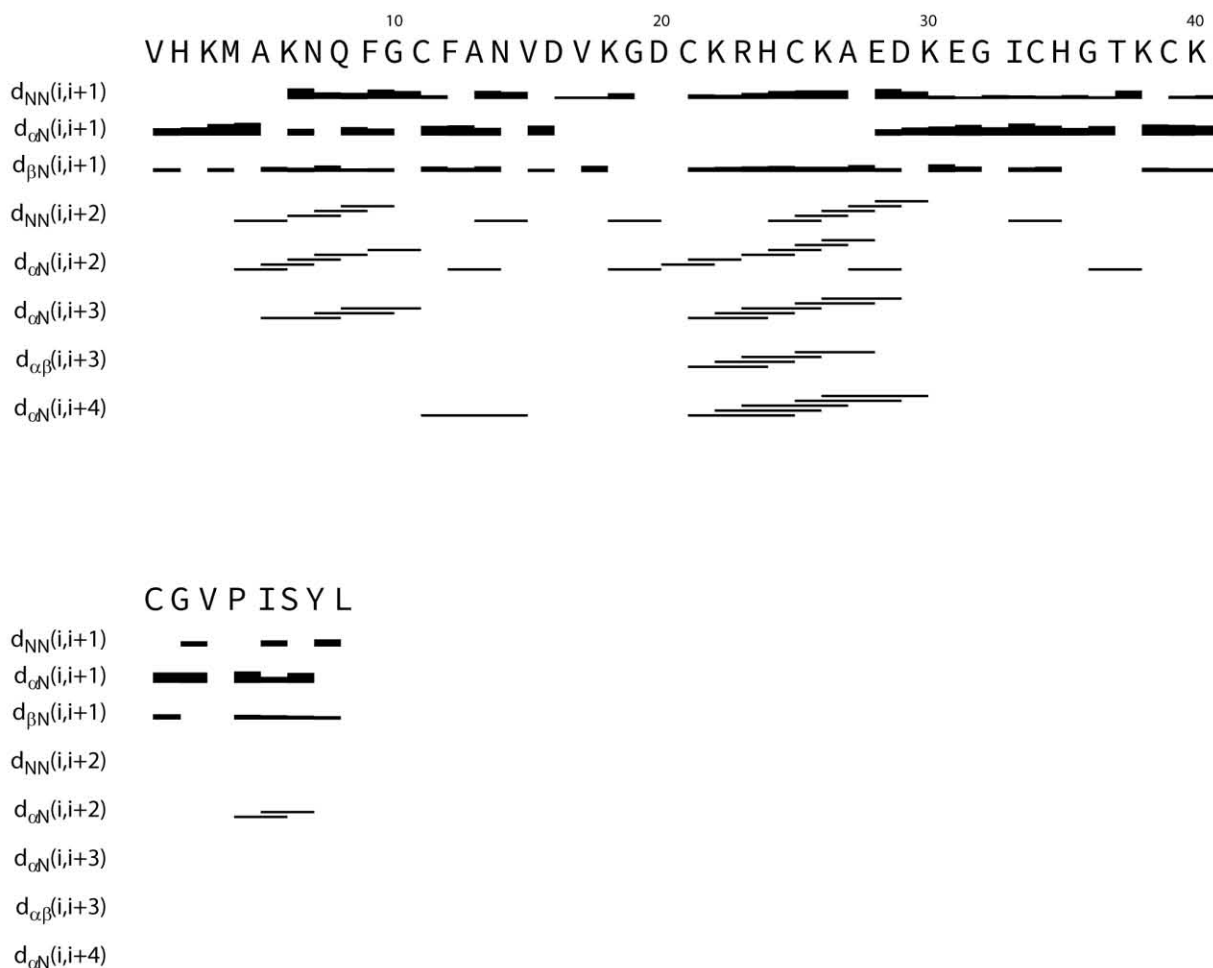


Figura 2.6. Contactos NOE en rHge36. Los residuos de las posiciones 21 a la 29 presentan varios tipos de interacciones características. Esta región corresponde a una hélice alfa en el modelo estructural. Para definir un elemento estructural con certeza es sumamente importante caracterizar el mayor número de interacciones NOE dentro de los espectros NOESY. Las letras en subíndice de la columna de la izquierda indican el tipo de átomos en contacto. La letra  $i$  indica el número de aminoácido del primer aminoácido y el  $i + n$  el segundo aminoácido. En los contactos  $d_{NN(i,i+1)}$ ,  $d_{\alpha N(i,i+1)}$  y  $d_{\beta N(i,i+1)}$  la altura de las barras indica cualitativamente la intensidad del NOE, es decir, la cercanía de los átomos.

Además de señalar de los contactos NOE, el valor de los desplazamientos químicos de los carbonos alfa puede señalar los tipos de elementos de estructura secundaria dentro de la proteína. Para ello se construye una gráfica de desplazamientos químicos restando el valor experimental al valor de referencia (tomado del BMRB) mostrado en la Figura 2.7. Si un segmento de aminoácidos

consecutivos tiene valores de desplazamiento químico por encima de la referencia ( $\Delta\delta^{13}\text{C}\alpha > 1$ ) esto puede indicar que el segmento está formando una hélice alfa. Por el contrario, si los valores de desplazamiento del segmento están por debajo de los valores de referencia ( $\Delta\delta^{13}\text{C}\alpha < 1$ ) la cadena principal de la proteína puede estar en una hoja beta. Este cambio del desplazamiento químico es inducido por los efectos de apantallamiento en cada uno de los elementos mencionados. Sin embargo, cabe señalar que este índice de desplazamientos químicos complementa a los demás análisis estructurales para validar la presencia de elementos estructurales dentro de una proteína.

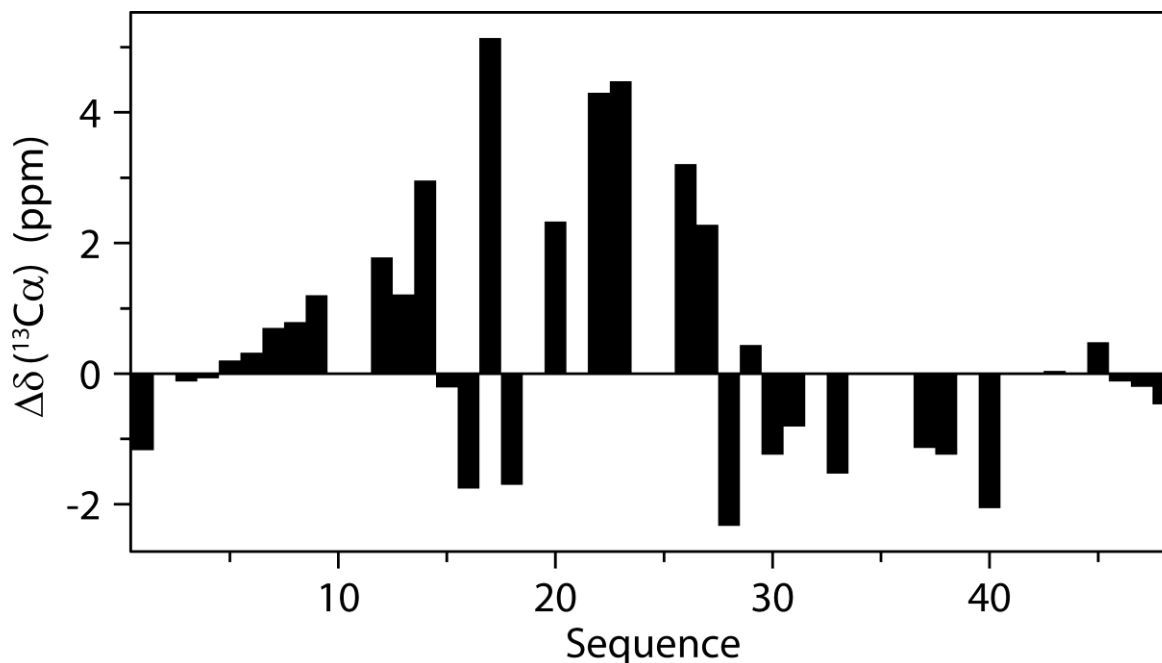


Figura 2.7. Índice de carbono 13 en la posición alfa ( $^{13}\text{C}\alpha$ ). El índice se calcula restando el valor de referencia reportado en el BMRB al valor experimental del desplazamiento químico de los carbonos alfa para cada aminoácido en la secuencia de la proteína. Estadísticamente, los aminoácidos con un valor de índice por encima o igual a +1 ( $\Delta\delta^{13}\text{C}\alpha \geq 1$ ) se encuentran en hélices alfa; mientras que los valores por debajo o iguales a -1 ( $\Delta\delta^{13}\text{C}\alpha \leq -1$ ) en conformaciones de hoja beta.

#### Modelo estructural de HgeD

El mismo procedimiento, exceptuando los experimentos tridimensionales, se realizó en la determinación estructural del péptido HgeD. En la Figura 2.8 y Figura 2.9 se muestran las estadísticas de las asignaciones NOE con HgeD. Estas asignaciones son prácticamente equivalentes en el modelo de rHge36.

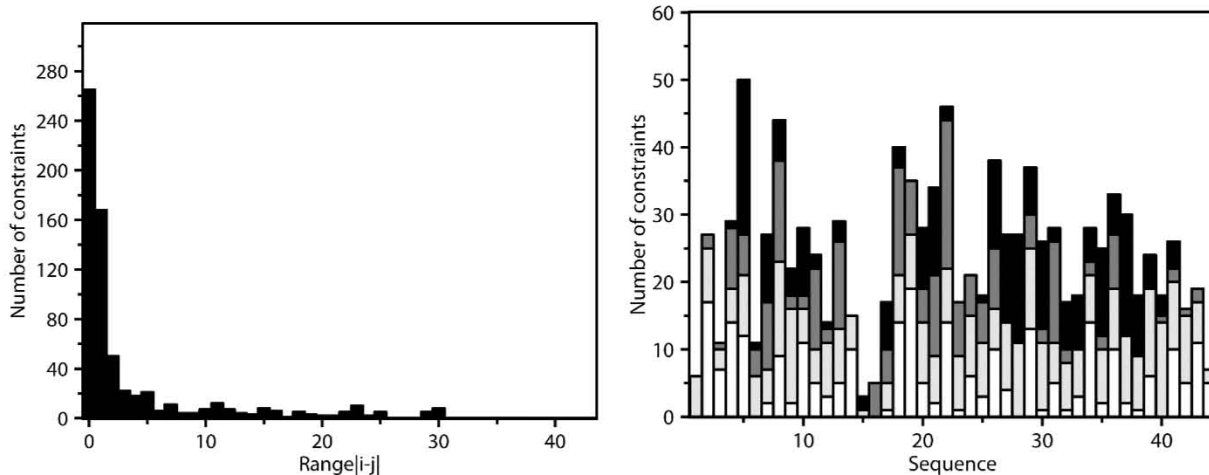


Figura 2.8. Restricciones NOE para el modelo estructural de HgeD. El número de restricciones NOE en este modelo describe una proteína estructurada. La segunda gráfica clasifica las interacciones en 4 tipos de restricciones y las muestra en función del número de aminoácido.

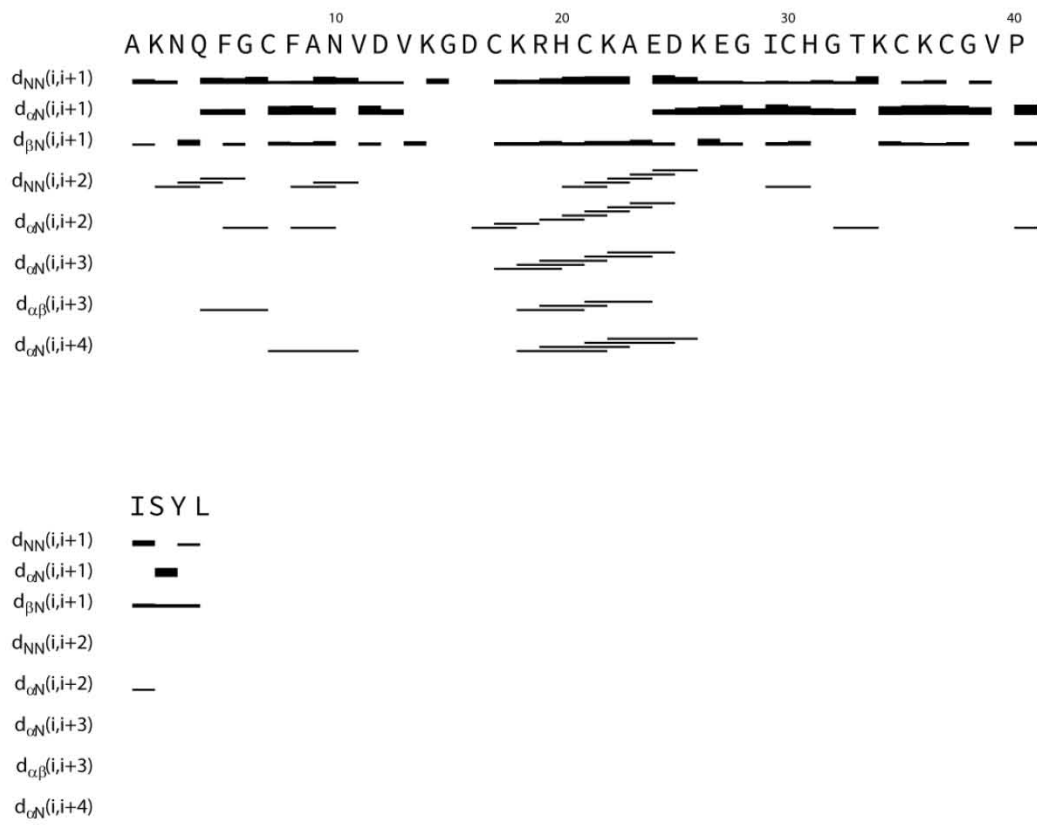


Figura 2.9. Contactos NOE en HgeD. En la figura se resumen la clase de interacciones entre los protones alfa, beta y de amida de los aminoácidos que conforman a HgeD. El extremo de las barras conecta las letras que representan a los aminoácidos en la secuencia primaria. En las tres primeras filas la altura de la barra es proporcional a la intensidad de la señal NOE. En los aminoácidos de las posiciones 17 a la 25 se observan varios tipos de interacción. Esta región corresponde a una hélice alfa en el modelo estructural.

La Figura 2.10 muestra las estructuras de rHge36 (códigos PDB: 5IPO y BMRB: 30033) y HgeD (códigos PDB: 5JYH y BMRB: 30089). Ambas estructuras muestran una hélice alfa que comienza cerca de la segunda cisteína presente en la secuencia primaria (21 y 17; respectivamente). El plegamiento continúa con una hoja beta antiparalela y ambos elementos estructurales se estabilizan con tres puentes disulfuro. Esto es representa un motivo estructural CS- $\alpha/\beta$  presente en la familia  $\alpha$ - y  $\gamma$ -<sup>60</sup>. El reporte de las estructuras confirma las predicciones sobre el plegamiento de las toxinas de la familia  $\beta$ -<sup>45,56</sup>. La parte contrastante de las estructuras es la región N terminal. Esta región está extendida en rHge36 naturalmente por la elongación de la secuencia de aminoácidos y en HgeD es más compacta. El cambio estructural se observa mejor con las superficies de potencial electrostático calculadas en el servidor web APBS<sup>61-63</sup>, mostradas en la Figura 2.10. La región mencionada en HgeD es mayoritariamente positiva. Por tanto, la compactación de la estructura y el aumento del potencial electrostático positivo de la toxina puede estar exacerbando la interacción sobre los canales iónicos de potasio ya que por estos poros se transportan específicamente iones con carga positiva. Sin embargo, es necesario demostrar que la interacción toxina-canal se modula por esta vía y no por otro tipo de interacciones ampliamente aceptadas como el caso de la teoría de la diada funcional. Esta teoría establece que una de las características común en las toxinas bloqueadoras es la presencia de un aminoácido básico y otro aromático a una distancia de 6.6 ( $\pm$  1.0) angstroms; medidos desde el carbono alfa del residuo básico al centro del anillo aromático del otro aminoácido referido<sup>60,64</sup>. Estas teorías racionalizan las características necesarias para la interacción, pero siempre es deseable contar con la evidencia experimental que sustente la teoría.

Las diferencias estructurales entre rHge36 y HgeD se resaltan con mayor facilidad a través del alineamiento de las estructuras representadas en listones en la Figura 2.10 (RMSD 0.869 Å). La parte N terminal de rHge36 emerge de la estructura mientras que en HgeD esta parte se orienta en la dirección contraria. Las superficies representadas en la misma orientación demuestran lo dicho en el párrafo anterior.



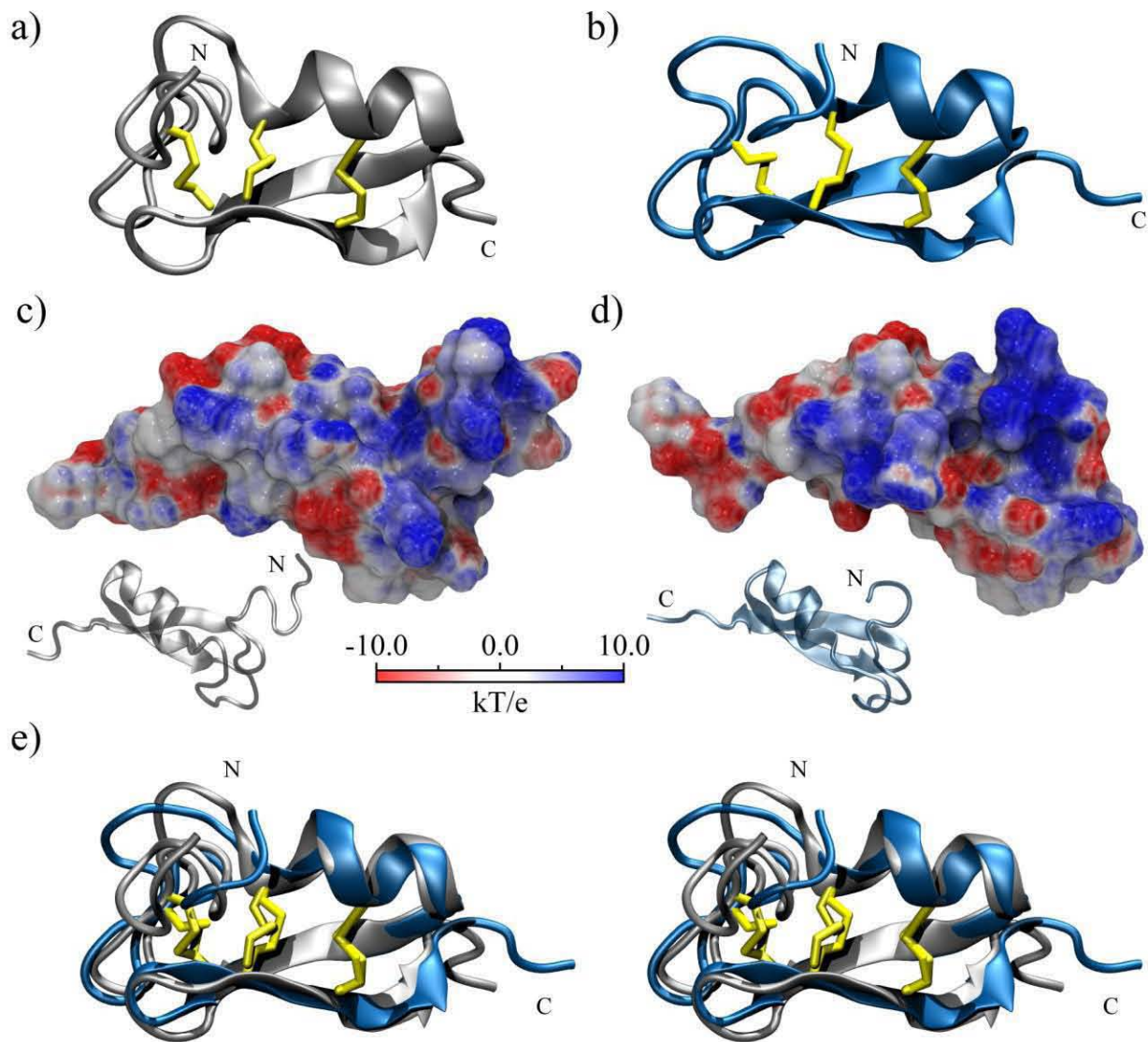


Figura 2.10. Representación en listones de la estructura tridimensional de rHge36 (a) y HgeD (b). Las superficies de potencial electrostático de rHge36 y HgeD se representan respectivamente en los incisos c) y d). El cálculo se realizó el servidor web APBS y la visualización en VMD<sup>65</sup>. Debajo de cada superficie se muestra la orientación de la molécula, la cual fue rotada para enfatizar el cambio en los extremos amino terminal. En el inciso e) se muestra un alineamiento entre ambas estructuras en vista estereoscópica.

### 2.3.4 Actividad antiparasitaria

#### *Taenia crassiceps*

La actividad antiparasitaria se probó en *lombrices solitarias* (cepa *T. crassiceps* WFU), determinando el efecto de los péptidos rHge36, M-HgeD y HgeD midiendo los parámetros de motilidad, daño a la pared vesicular y evaginación del escólex. En la Tabla 2.2 se resumen las observaciones cualitativas del efecto de cada péptido. Los efectos de los controles positivo (PZQ) y negativo (RPMI) se muestran en la Tabla 2.3. Los tres péptidos inducen daño a la pared vesicular y disminuyen tanto la motilidad como la evaginación de los cisticercos de *T. crassiceps*. La concentración de toxina necesaria para inhibir la evaginación del cincuenta por ciento de las vesículas ( $IC_{50}$ ) es distinta en los tres casos y la más baja es para el péptido HgeD. Con una concentración de 1 mM de HgeD se observa daño después de una hora de incubación y pasadas las 6 horas se pierde por completo la motilidad. Las  $IC_{50}$  sobre la evaginación de los escólex son  $65 \pm 10$  nM,  $178 \pm 9$  nM y  $167 \pm 16$  nM para HgeD, M-HgeD y rHge36 respectivamente (Figura 2.11 incisos a-c). el control positivo con Praziquantel (PZQ) produce un decremento de la motilidad pasada una hora y con 0.01 nM y una pérdida total después de 3 horas a 10 nM sin dañar la pared vesicular. La  $IC_{50}$  para este fármaco es  $0.05 \pm 0.02$  nM. El vehículo (EtOH) no muestra una actividad en la viabilidad. Con el control negativo se obtuvo el 100% de evaginación.

Tanto M-HgeD como rHge36 presentan un efecto similar al péptido Iseganan IB-367 en la viabilidad de los cisticercos de *T. crassiceps*<sup>66</sup>. El efecto de HgeD es más potente que el de los tres péptidos mencionados; por no es más efectivo que el control positivo (PZQ). Para demostrar el mecanismo de acción en la vesícula es necesario realizar más experimentos, por ejemplo, microscopía electrónica de barrido. En cualquier caso, la evaginación de la larva es un paso fundamental para que el organismo alcance la adultez en el hospedero, por lo que inhibir este paso rompe el ciclo de vida de este parásito. La Neurocisticercosis y taenosis causadas por *Taenia solium* son problemas de salud en países en vías de desarrollo como México. Grupos de investigación como el del Dr. Landa han demostrado la adquisición de resistencia de los parásitos a los fármacos usados tradicionalmente como el PZQ y el Albendazol<sup>67</sup>. La aplicación de péptidos en cerdos y humanos puede ser más tolerable que la de los fármacos anteriores<sup>67,68</sup> los cuales se administran en conjunto con dexametasona para reducir la respuesta inflamatoria<sup>66,69</sup> que de no controlarse puede causar la muerte del individuo.

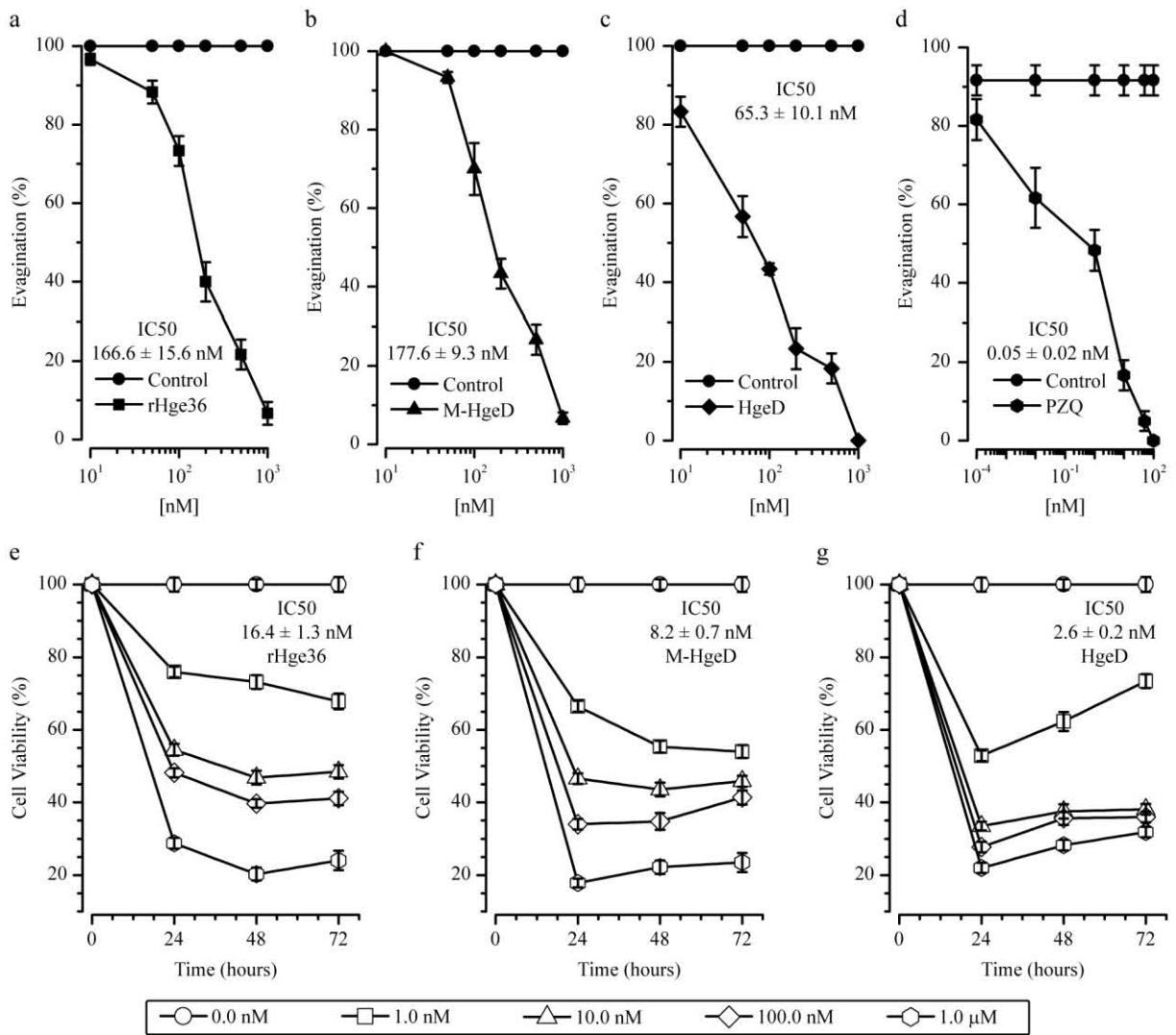


Figura 2.11. Pruebas de actividad en cisticercos (*Taenia crassiceps*; a-d) y amibas (*Entamoeba histolytica* e-g). En las figuras se dan los valores de IC50 y la desviación estándar. En el caso de cisticercos se demostró la influencia del etanol (inciso d) en la viabilidad de los cisticercos.

Tabla 2.2. Datos para la determinación de la concentración letal 50 (LC50) de los péptidos tipo escorpiña contra *Cisticercos* (*Taenia crassiceps*)

	Concentración	Parámetro	1 hr	3 hr	6 hr	12 hr	24 hr	Evaginación (%)	
<b>Control RPMI</b>	-	Motilidad	+++	+++	+++	+++	+++	100	
		Daño	-	-	-	-	-		
<b>M-HgeD</b>	10 nM	Motilidad	+++	+++	+++	+++	+++	100	
		Daño	-	-	-	-	-		
	50 nM	Motilidad	+++	+++	+++	+++	++	93 ± 2.88	
		Daño	-	-	-	-	-		
	100 nM	Motilidad	+++	+++	+++	+++	+	70 ± 13.22	
		Daño	-	-	-	-	-		
	200 nM	Motilidad	+++	+++	+++	++	+	43 ± 7.63	
		Daño	-	-	-	+	+		
	500 nM	Motilidad	+++	++	++	+	-	27 ± 7.63	
		Daño	-	-	-	++	++		
	1.0 mM	Motilidad	+++	++	+	-	-	7 ± 2.88	
		Daño	-	-	+	++	++		
	<b>rHge36</b>	10 nM	Motilidad	+++	+++	+++	+++	+++	97 ± 2.88
			Daño	-	-	-	-	-	
50 nM		Motilidad	+++	+++	+++	+++	++	88 ± 5.77	
		Daño	-	-	-	-	-		
100 nM		Motilidad	+++	+++	+++	++	+	73 ± 7.63	
		Daño	-	-	-	-	-		
200 nM		Motilidad	+++	+++	++	+	+	40 ± 10	
		Daño	-	-	-	+	+		
500 nM		Motilidad	+++	++	+	+	-	22 ± 7.63	
		Daño	-	-	+	++	++		
1.0 mM		Motilidad	+++	+	+	-	-	7 ± 5.77	
		Daño	-	+	++	++	++		
<b>HgeD</b>		10 nM	Motilidad	+++	+++	+++	+++	+++	83 ± 7.63
			Daño	-	-	-	-	-	
	50 nM	Motilidad	+++	+++	+++	++	++	57 ± 10.40	
		Daño	-	-	-	-	+		
	100 nM	Motilidad	+++	+++	++	++	+	43 ± 2.88	
		Daño	-	-	-	-	+		
	200 nM	Motilidad	+++	++	++	+	-	23 ± 10.40	
		Daño	-	-	+	+	+		
	500 nM	Motilidad	+++	++	+	-	-	18 ± 7.63	
		Daño	-	+	++	++	++		
	1.0 mM	Motilidad	++	+	-	-	-	0	
		Daño	+	+	++	+++	+++		

Tabla 2.3. Datos para determinar la LC50 del fármaco praziquantel e influencia del vehículo del fármaco (experimentos control).

	Concentración	Parámetro	1 hr	3 hr	6 hr	12 hr	24 hr	Evaginación (%)	
<b>PZQ + vehículo</b>	0.0001 nM	Motilidad	+++	++	+	-	-	82 ± 10.40	
		Daño	-	-	-	-	-		
	0.01 nM	Motilidad	++	+	+	-	-	62 ± 15.27	
		Daño	-	-	-	-	-		
	1 nM	Motilidad	++	+	-	-	-	48 ± 10.40	
		Daño	-	-	-	-	-		
	10 nM	Motilidad	+	-	-	-	-	17 ± 7.63	
		Daño	-	-	-	-	-		
	50 nM	Motilidad	-	-	-	-	-	5 ± 5	
		Daño	-	-	-	-	-		
	100 nM	Motilidad	-	-	-	-	-	0	
		Daño	-	-	-	-	-		
	<b>Vehículo (EtOH)</b>	-	Motilidad	+++	+++	+++	+++	+++	92 ± 7.63
			Daño	-	-	-	-	-	

### *Entamoeba histolytica*

La actividad amebicida se evaluó determinando la viabilidad celular en intervalos de 24 horas después de tratar los cultivos con los tres péptidos tipo escorpinas. De forma respectiva, los efectos de dosis en el intervalo de tiempo especificado son  $16.4 \pm 1.3$ ,  $8.2 \pm 0.7$  y  $2.6 \pm 0.2$  nM para los péptidos rHge36, M-HgeD y Hge-D. Los ensayos de citometría de flujo, en la Figura 2.12, se realizaron con estas dosis. Los resultados de la Tabla 2.4 demostraron que el mecanismo predominante de muerte celular es apoptosis y la relación del número de células en apoptosis tardía *versus* apoptosis sigue el patrón HgeD < M-HgeD < rHge36. A la par de estos ensayos, el mecanismo de muerte celular se probó en linfocitos de sangre periférica humana. De forma interesante, menos del 30% de las células mueren por apoptosis y más del 70% permanecen como células viables. En suma, el efecto de los péptidos sobre amibas es más potente que en linfocitos.

Tabla 2.4. Datos crudos de la citología de flujo. En la tabla se pueden leer los datos por cuadrante (en porcentaje) graficados en la Figura 2.12.

Péptido	Linfocitos				Amibas			
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
	%	%	%	%	%	%	%	%
rHge36	0	7.4 ± 0.6	70 ± 0.7	22.6 ± 1.3	0	13.3 ± 0.3	35.7 ± 1.6	51 ± 1.3
M-Hge36	0	3.2 ± 0.4	73.7 ± 1.9	23.1 ± 2.3	0	6.3 ± 2.0	36.2 ± 2.3	57.5 ± 4.3
HgeD	0.2 ± 0.1	2.2 ± 0.1	76.2 ± 3.9	21.6 ± 3.8	0	2.4 ± 0.9	38.7 ± 1.5	58.9 ± 2.6

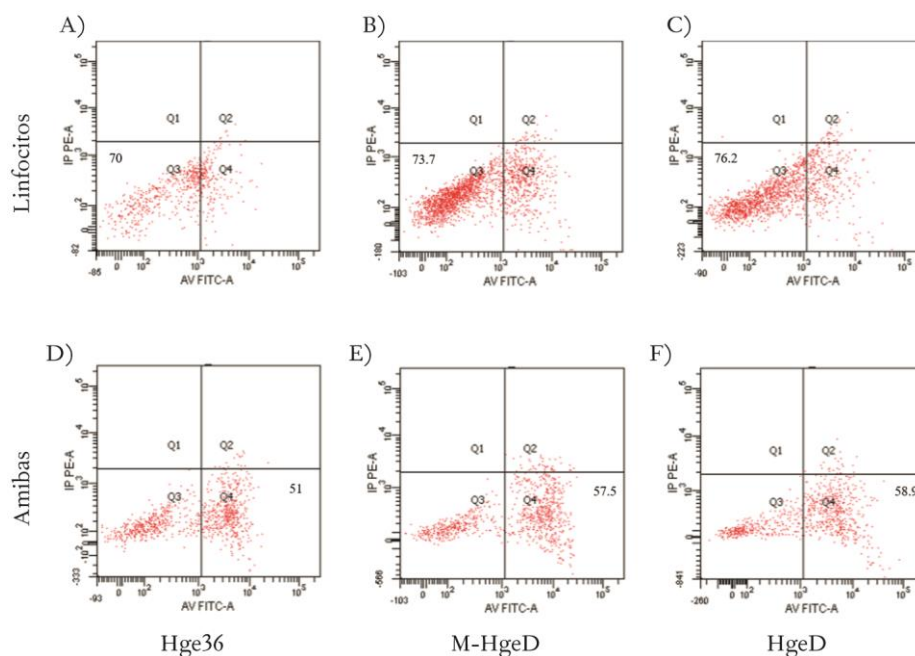


Figura 2.12. Gráficas de citología de flujo. Cada uno de los cuadrantes (Q) está relacionado a un tipo de muerte celular. El cuadrante Q1 se asocia a muerte celular por necrosis; Q2 indica un mecanismo de muerte celular por apoptosis tardía; Q3 a células aún vivas y finalmente, Q4 a muerte por apoptosis. Los incisos A)-C) son las pruebas realizadas en linfocitos de sangre periférica humana con los péptidos rHge36, M-HgeD y HgeD. Los mismos ensayos se realizaron para amibas en los incisos D)-F).

La amebiasis causada por *Entamoeba histolytica* está relacionado con cercad de más de 10,000 – 40,000 muertes anuales en países en desarrollo; cerca del 10% de la población mundial tiene anticuerpos contra el género *Entamoeba*<sup>70,71</sup>. La primera opción médica para tratar este padecimiento es la administración de metronidazol<sup>72</sup>. Los efectos colaterales de este fármaco van desde nauseas, diarrea, alucinaciones hasta algunos reportes de cáncer<sup>73</sup>. Estos efectos junto con la aparición de cepas resistentes al tratamiento justifican la búsqueda de alternativas terapéuticas. En

el caso de los péptidos tipos escorpina su efecto *in vitro* es 2000 veces más potente que el del metronidazol. El ensayo con linfocitos y el mecanismo de muerte celular determinado por citometría de flujo<sup>74</sup> respaldan la consideración de desarrollar estos péptidos como agentes antiparasitarios.

## 2.4 Conclusiones

Las estructuras de los dos péptidos tipo escorpina rHge36 y HgeD exhiben el motivo estructural  $CS-\alpha/\beta$  común en las toxinas proveniente del veneno de alacrán. La presencia de los 4 aminoácidos en rHge36 en la región N-terminal modifica la topología de esta zona dotándola de una carga electrostática menor en la superficie respecto a la de HgeD. La exposición de una superficie más compacta y un aumento de carga en HgeD son las principales diferencias y probablemente la causa por la cual el efecto de bloqueo se exagera. Es necesario demostrar que esta zona está directamente involucrada en el reconocimiento molecular.

Durante las pruebas de actividad antiparasitaria, no se encontró evidencia contundente que indique un carácter citolítico en la actividad de los péptidos tipo escorpina rHge36 y HgeD. Esto sugiere que la interacción es mediada por otro tipo de interacción.

El aumento de actividad antiparasitaria en HgeD es congruente con los resultados previos de actividad de bloqueo; sin embargo, no se cuenta con datos de actividad electrofisiológica para los péptidos recombinantes ni para el péptido M-HgeD. La correspondencia entre los datos de actividad antiparasitaria y de bloqueo sugiere fuertemente que la actividad puede estar mediada por algún tipo de interacción entre la toxina y los canales iónicos presentes en los dos tipos de parásitos.

El daño de la vesícula que contiene a los cisticercos es un resultado que se debe explorar exhaustivamente antes de poder proponer el desarrollar de fármacos alternativos en contra de estos parásitos a partir de las escorpinas aquí reportadas.

La potencia de los péptidos en contra de amibas junto con la baja toxicidad determinada con las pruebas sobre linfocitos de sangre periférica abre una pauta para estudiar a profundidad el mecanismo de interacción y posiblemente desarrollar fármacos de menor toxicidad.



## Capítulo 3 GS-Tt28

---

<b>3.1 INTRODUCCIÓN: UNA ALTERNATIVA DE PLEGAMIENTO .....</b>	<b>56</b>
<b>3.2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>58</b>
<b>3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>59</b>
3.3.1 BIOSÍNTESIS, PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN.....	59
3.3.2 ESTRUCTURA .....	62
<b>3.4 CONCLUSIONES .....</b>	<b>68</b>

---

### 3.1 Introducción: Una alternativa de plegamiento

A principios de 2012, nuestro grupo de trabajo publicó el reporte estructural de Tt2b y Ts16, dos toxinas provenientes de distintas especies de alacranes del género *Tityus*<sup>9</sup>. La primera de ellas se aisló y caracterizó de una muestra de veneno del alacrán argentino *T. trivittatus* (abreviatura Tt). Del mismo modo, la toxina Ts16 fue identificada como un componente del veneno sintetizado por el alacrán brasileño *T. serrulatus* (Ts); una de las especies más letales de América. Estos péptidos destacan por el motivo estructural que adoptan el cual se compone por dos hélices alfa estabilizadas por la formación de tres puentes disulfuro (CS- $\alpha/\alpha$ ; Figura 3.1). Este arreglo estructural contrasta con el de la amplia mayoría de toxinas de alacrán el cual está compuesto por una hélice alfa complementada por una hoja beta, plegamiento estabilizado por la presencia de 3 a 4 puentes disulfuro (CS- $\alpha/\beta$ )<sup>60,75</sup>. Es importante destacar que el porcentaje de identidad de ambos péptidos es bajo (menor al 40%) al comparar sus secuencias con las de toxinas pertenecientes a las familias previamente descritas.

Seis años antes (2006) el grupo encabezado por el Dr. L. Possani publicó la identificación de Tt28; un componente del veneno del alacrán *T. trivittatus* el cual se propuso como el primer miembro de una nueva subfamilia de toxinas alfa ( $\alpha$ -KTx 20.1)<sup>76</sup> debido a la baja identidad de la secuencia de aminoácidos con alguna de los péptidos hasta entonces reportados (menor al 40.0%). La actividad biológica de Tt28 es específica por canales Kv1.3 con una concentración de 7.9 nM para inhibir el 50% de la corriente en este canal. La conexión que existe entre Tt28, Tt2b y Ts16 no solo es el género del alacrán sino es principalmente la identidad de sus secuencias primarias. Tt28 guarda el 65.0% y 62.0% de identidad con Tt2b y Ts16, respectivamente. Dados estos antecedentes se planteó la resolución estructural de Tt28 para profundizar en la funcionalidad de este tipo de plegamiento de las toxinas de alacrán.

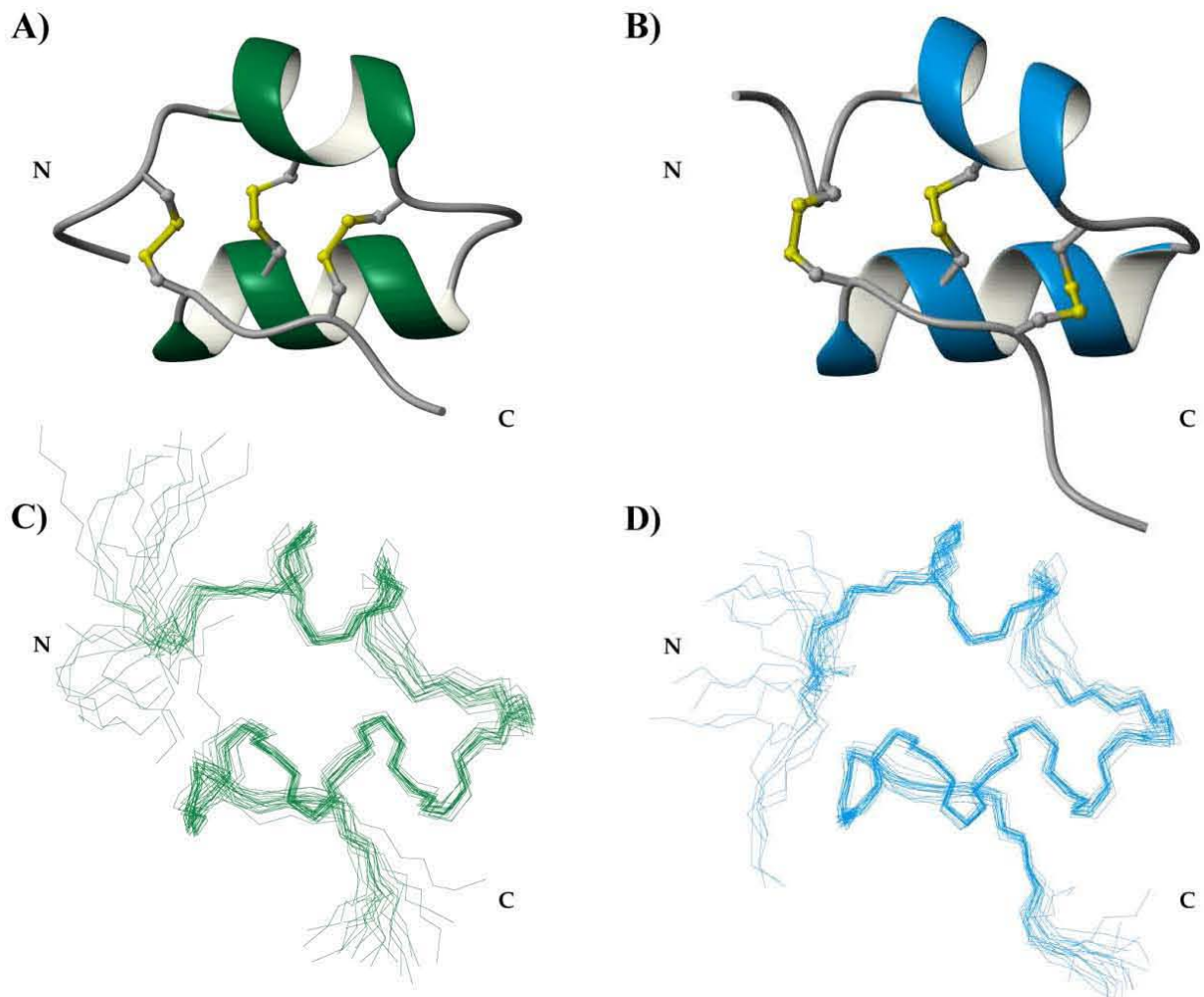


Figura 3.1. Estructuras de Tt2b (A y C) y Tsl6 (B y D)<sup>9</sup>. En la parte superior se muestran las representaciones en listones destacando la conectividad de los puentes disulfuro. En la parte inferior está el ensamble de la cadena principal de los 20 modelos estructurales para cada proteína.

## 3.2 Hipótesis y objetivos

El péptido recombinante GS-Tt28 presenta el mismo plegamiento que Tt2b y Ts16 debido a la identidad superior al 60% entre los tres péptidos. La estructura de Tt28 puede brindar una perspectiva en la identificación de las bases moleculares que dictan la interacción específica entre las toxinas de alacrán y sus blancos biológicos.

La comparación entre los espectros de hidrógeno.

En este proyecto planteamos los siguientes objetivos para comprobar la hipótesis:

- Determinar cuál es la estructura de GS-Tt28 por RMN.
  - Producir y purificar el péptido recombinante GS-Tt28.
  - Determinar la conectividad de los puentes disulfuro.
  - Comparar espectros de hidrógeno del péptido nativo y el recombinante corroborará sus similitudes estructurales.

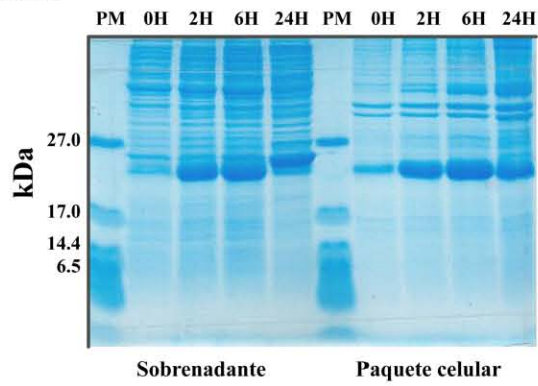
## 3.3 Resultados y discusión

### 3.3.1 Biosíntesis, producción y purificación

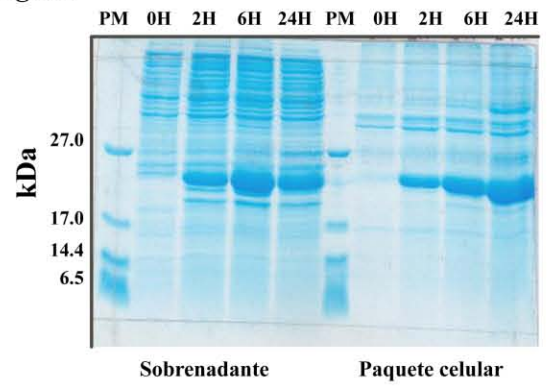
La producción de la proteína de fusión se evaluó en cinco diferentes cepas de *E. coli*: Rosetta, Origami, Bl21 Star, Bl21 Gold y Tuner (Figura 3.2). El criterio usado para la elección de la cepa fue la cantidad de proteína en la fracción soluble (sobrenadante). En esta proteína, con Rosetta y Origami se obtuvieron los mejores resultados. Se eligió Rosetta por la facilidad para trabajar con esta cepa. Las condiciones de expresión fueron 0.5 mM de inductor (IPTG) e incubación a 30 °C durante 18 horas. De nuevo se utilizó la estrategia de Jonathan Marley *et al.*<sup>37</sup> sustituyendo el medio M9 por LB para simplemente aumentar el rendimiento de la producción. El paquete celular se recuperó y resuspendió en 30 ml de disolución amortiguadora de lisis (50 mM Tris, 300 mM NaCl a pH 8.0) por cada gramo de células. La proteína de fusión se purificó por CAMQ y el corte enzimático se realizó con Trombina en 50 mM Tris, 150 mM NaCl a pH 8.0. La purificación final se realizó en una columna C12 Jupiter Proteo de Phenomenex (4.6 x 250 mm; 90 Å; 4 µm). Las fracciones colectadas se analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF para identificar al péptido GS-Tt28. El rendimiento global en la obtención de GS-Tt28 fue de 50 microgramos por litro de cultivo µg/l ( $\pm 10$  µg).

## Tt28

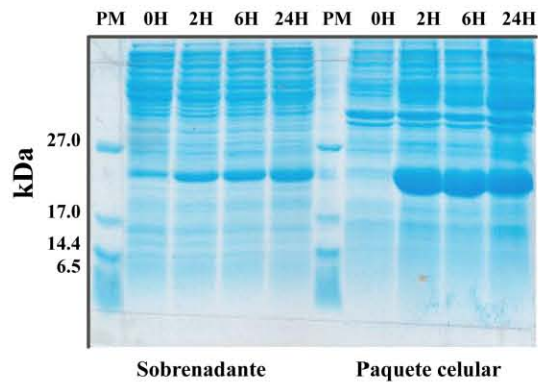
### Rosetta



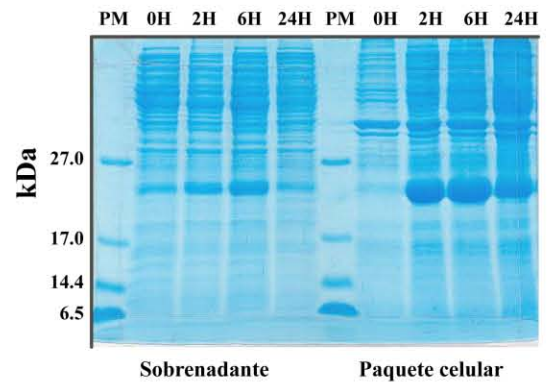
### Origami



### BL21 Gold



### BL21 Star



### Tuner

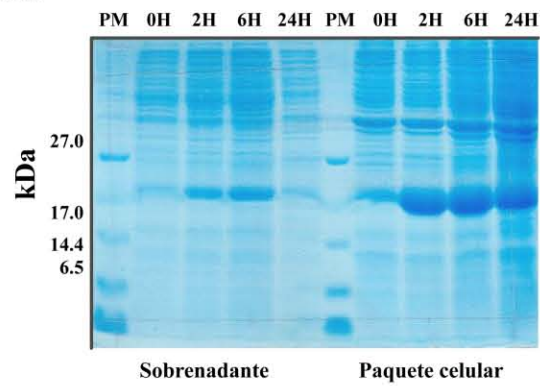


Figura 3.2. Cinéticas de expresión a 30 °C y 0.5 mM de IPTG. La producción de la proteína de fusión de GS-Tt28 se monitoreo en las cepas mostradas en la figura.

El bajo rendimiento en la producción se buscó aumentar la cantidad de proteína recombinante por medio de replegamiento. Cabe recordar que para realizar un estudio de estructura por RMN es necesario que la muestra tenga una concentración igual o mayor a 1.0 mM. Los productos generados con las condiciones empleadas se muestran en los cromatogramas de la Figura 3.3. En el segundo cromatograma (ampliación del primero) se muestran los productos del replegamiento con el par redox glutatión reducido 3.0 mM / glutatión oxidado 0.3 mM, Arginina 150 mM (agente caotrópico) a pH 8.0 48 horas. Con ninguno de los productos generados se confirmó la obtención de GS-Tt28 con la presencia de tres puentes disulfuro (“oxidada”).

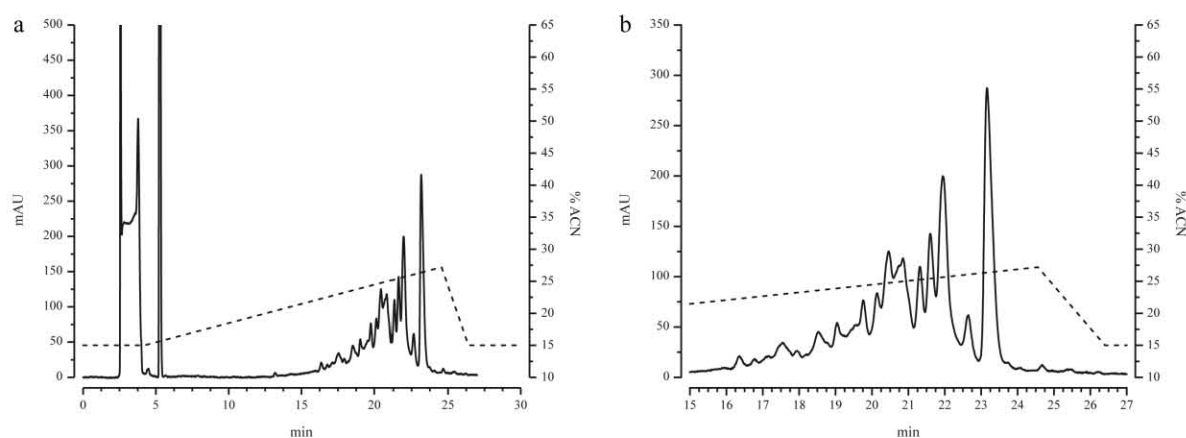


Figura 3.3. Especies parcialmente reducidas de GS-Tt28 generadas vía replegamiento. En el inciso a se muestra el cromatograma de la reacción de replegamiento. En b la ampliación de los productos generados vía replegamiento.

Con una muestra pura de proteína (Figura 3.4 inciso A) se optimizaron por separado las reacciones enzimáticas con Tripsina y Glu-C para la determinación de los puentes disulfuro de la proteína recombinante producida en Rosetta (Tris 50 mM pH 8.0, 37 °C, 18 horas y una relación 1 a 20 w/w de enzima y sustrato respectivamente). Los productos de la reacción fueron analizados por espectrometría de masas MALDI-TOF (Figura 3.4 inciso B). Con base en el análisis de los fragmentos enlistados en la Tabla 3.1 y la evidencia experimental (Figura 3.4 inciso B) se determinó que esta muestra poseía una conectividad de cisteínas C1-C4, C2-C5 y C3-C6; clásica de la familia  $\alpha$ - de las toxinas bloqueadoras de canales iónicos. Este resultado fue sorprendente ya que se esperaba una conectividad como la que se determinó en Tt2b y Ts16; sin embargo, el espaciamiento de las últimas 4 cisteínas en Tt28 está relacionado con la conectividad experimental<sup>60</sup>. Este resultado fue utilizado en el cálculo de estructura.

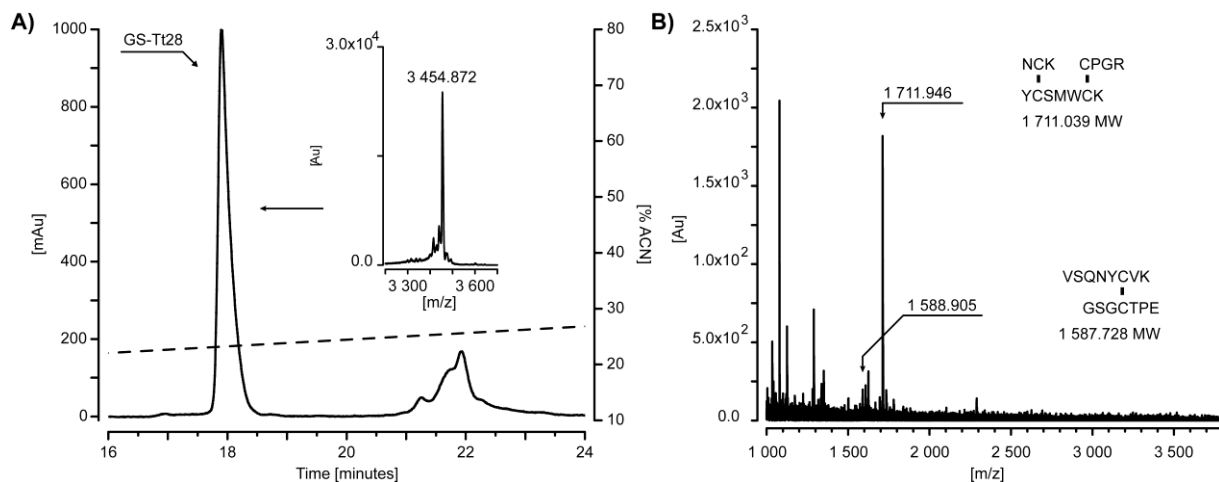


Figura 3.4. Purificación de GS-Tt28 por cromatografía líquida de alta eficiencia (A) y determinación de la conectividad de puentes disulfuro (B).

Tabla 3.1. Relación de pesos moleculares y fragmentos característicos para dos de las conectividades probables del péptido GS-Tt28.

Reacción de digestión con Tripsina y Glu-C		Conectividad de $\alpha$ -KTx		Conectividad tipo Tt2b		Fragmentos experimentales
Fragmento	Peso molecular	Puente(s)	Masa calculada m/z [M+H <sup>+</sup> ]	Puente(s)	Masa calculada m/z [M+H <sup>+</sup> ]	[m/z]
GSGC <sub>1</sub> TPE	649.66	C <sub>1</sub> -C <sub>4</sub>	1,588.72	C <sub>1</sub> -C <sub>5</sub>	1,012.08	1,588.91
YC <sub>2</sub> SMWC <sub>3</sub> K	920.12	C <sub>2</sub> -C <sub>5</sub>	1,282.54	C <sub>2</sub> -C <sub>4</sub>	1,859.18	-
VK	245.31	C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	1,350.61	C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	1,350.61	-
VSQNYC <sub>1</sub> VK	940.07	C <sub>2</sub> -C <sub>5</sub> & C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	1,712.03	C <sub>2</sub> -C <sub>4</sub> & C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	2,288.68	1,711.95
NC <sub>5</sub> K	363.42	-	-	-	-	-
C <sub>6</sub> PGR	431.50	-	-	-	-	-

### 3.3.2 Estructura

Se cultivaron e incubaron más de 20 litros de cultivo para obtener cerca de 1.0 mg de muestra para realizar los experimentos de RMN DQF-COSY, TOCSY y NOESY (150 y 300 ms). En la Figura 3.5 se muestran los experimentos NOESY con dos cantidades distintas de GS-Tt28 (500  $\mu$ g y 6.5 mg). La cantidad de señales NOE no crece proporcionalmente con la cantidad de muestra. Este hecho está conectado directamente a las características intrínsecas de la molécula. La dispersión de los protones de amida en abarca apenas un par de partes de millón; el intervalo va por arriba 7.0 hasta antes de 9.0 ppm. Este es un indicio del tipo de estructura estudiada. Las proteínas



con elementos estructurales perfectamente definidos abarcan una región más amplia que va desde 6.5 hasta por arriba de 9.5 ppm (Figura 3.5).

El valor de RMSD del ensemble de las 20 estructuras obtenidas en CYANA 2.1 fue de 1.5 Å; un valor extremadamente alto para definir una estructura. Este resultado refleja la divergencia de las coordenadas atómicas entre los modelos que cumplen con las restricciones derivadas de los espectros NOESY. Esto se debe a la poca cantidad de restricciones NOE. Si analizamos la Tabla 3.2 podremos observar que el número de restricciones totales son apenas 240 de las cuales únicamente 23 son de larga distancia. Sin embargo, la poca cantidad de señales NOE no es debida a la cantidad de muestra si consideramos que la integración y el cálculo estructural se realizó con las restricciones NOE derivadas de la muestra de 6.5 mg (con una gran contribución de impurezas). El valor de RMSD y el número bajo de restricciones indican que la estructura terciaria de este péptido no está totalmente definida.

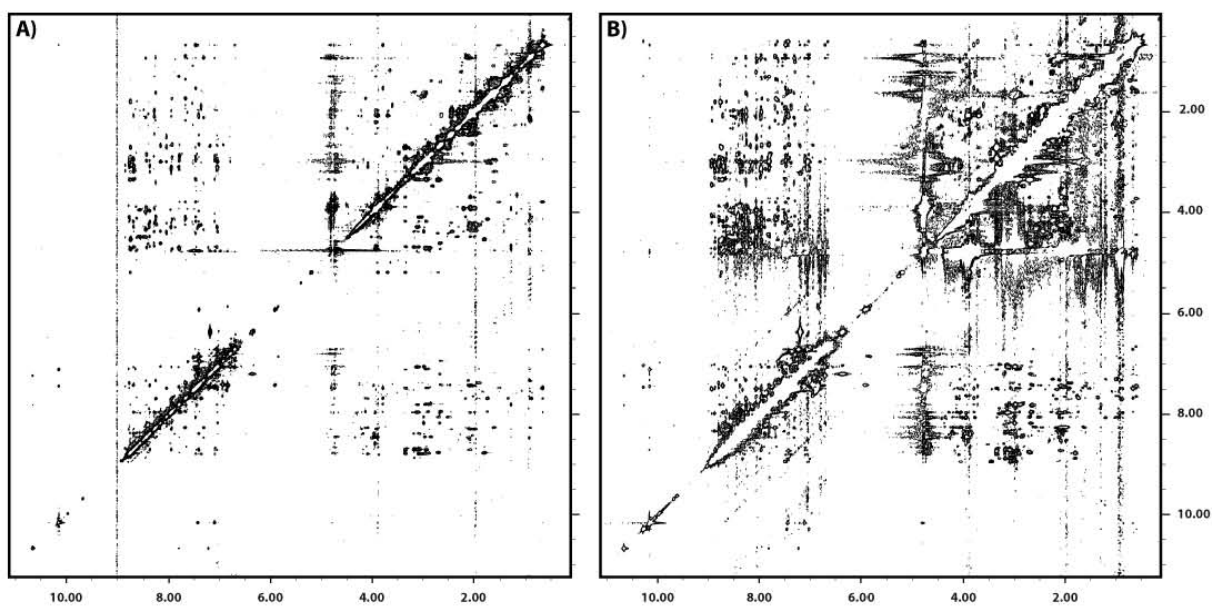


Figura 3.5. Experimentos NOESY de GS-Tt28 a distintas concentraciones. A) Experimento NOE con 500  $\mu\text{g}$  de muestra en tubo shigemmi de 3 mm. B) Experimento con  $6.5 \pm 0.62$  mg de proteína en tubo de 3.0 mm.

Tabla 3.2. Restricciones de distancia obtenidas en CYANA2.1 para la estructura del péptido recombinante GS-Tt28

Restricciones	GS-Tt28
Totales	240
Locales, $ i-j  \leq 1$	164
Intermedias, $1 <  i-j  < 5$	53
De largo alcance, $ i-j  \geq 5$	23
Función objetivo	0.04
RMSD promedio	1.51 Å

En la Figura 3.6 podemos observar que la estructura de GS-Tt28 está compuesta por dos hélices alfa, conectadas por tres puentes disulfuro y posicionadas prácticamente de forma perpendicular entre ellas. La presencia de hélices alfa y ninguna hoja beta nos recuerda el plegamiento de Tt2 y Ts16 (Figura 3.1). Sin embargo, es importante remarcar que las hélices se forman a pesar de la presencia de la conectividad de puentes disulfuro que estabiliza normalmente un plegamiento  $CS-\alpha/\beta$ . Si analizamos la posición de los residuos aromáticos y básicos dentro de la estructura podemos encontrar que el carbono alfa de la lisina número 19 y el centro del anillo aromático de la tirosina 22 se encuentran a  $6.9 \pm 1.0$  Å. Esto es totalmente congruente con lo establecido en la teoría de la diada funcional la cual menciona que la distancia entre esos dos puntos es de aproximadamente 6.6 Å.

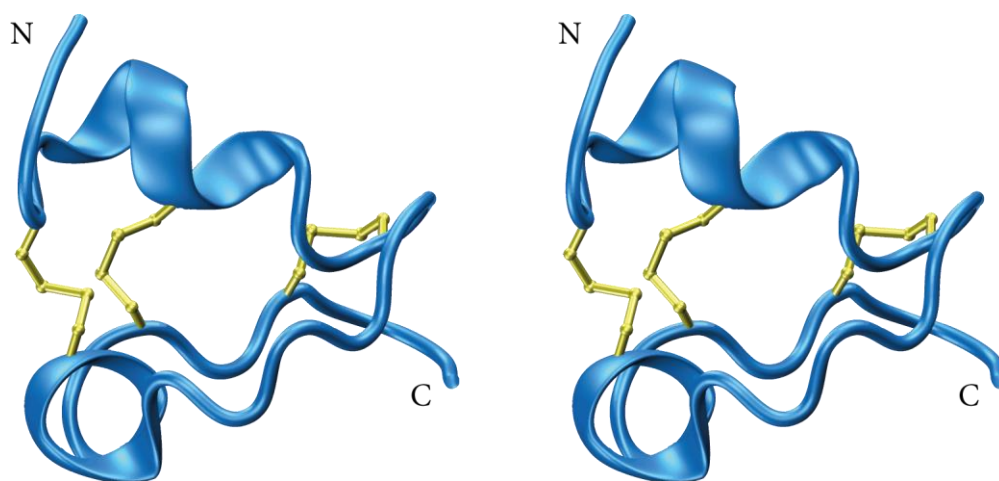


Figura 3.6. Representación estereoscópica de la toxina GS-Tt28. En la figura se destacan los puentes disulfuro de amarillo además de los extremos amino y carboxilo terminal.

Una explicación del plegamiento de GS-T28 esta ilustrada en la Figura 3.7. En la ilustración se muestra la interacción entre las cadenas laterales del triptófano 10 y las valinas 15 y 21 (Figura 3.8). Estas interacciones se determinaron a través del experimento NOESY. La estructura mostrada concuerda con la asignación de los sistemas de espín y respeta las restricciones de distancia y ángulos de torsión derivadas de la integración de las señales NOE. Estos contactos junto con la exposición de los residuos hidrofílicos son las fuerzas responsables del plegamiento de GS-Tt28. Si se suprimiera la presencia del aminoácido 10 (como ocurre en Tt2b y Ts16) se abatiría una zona extensa de contactos hidrofóbicos.

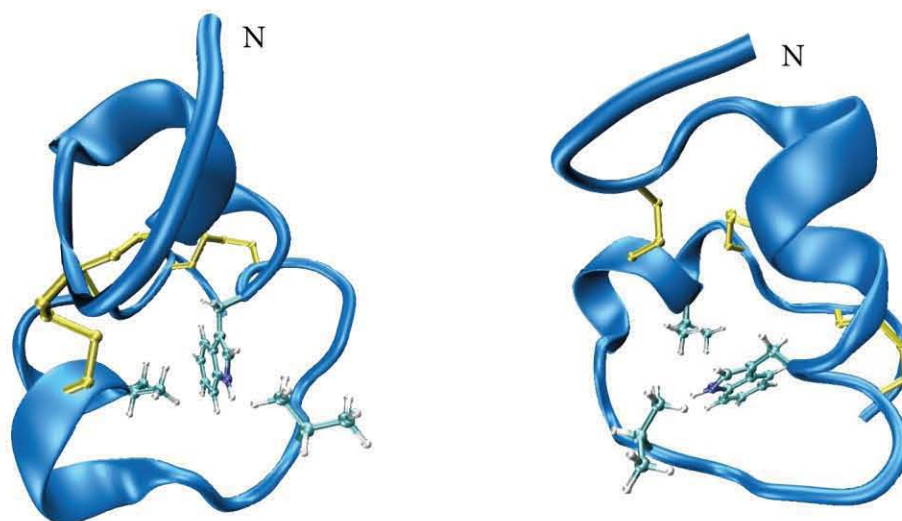


Figura 3.7. Representación de listones de la estructura y algunas cadenas laterales de GS-Tt28. Las cadenas laterales ilustradas en las figuras muestran interacciones hidrofóbicas (señales NOE en el análisis de RMN) las cuales pueden ser responsables del plegamiento adoptado por este péptido.

En la Figura 3.8, se hace un contraste entre las secuencias primarias de Tt28, Tt2b y Tt16. La figura ilustra los elementos de estructura secundaria junto con la conectividad de los enlaces disulfuro de cada péptido. Nuevamente, La diferencia primordial entre las secuencias se remarca en la posición número 10. En Tt28 el aminoácido de esta posición es un triptófano; un residuo de carácter hidrofóbico, aromático y el más voluminoso. En Tt2b y Tt16 se encuentra una glutamina, cuyas características químicas de la cadena lateral (polar sin carga) difieren significativamente de las del triptófano.

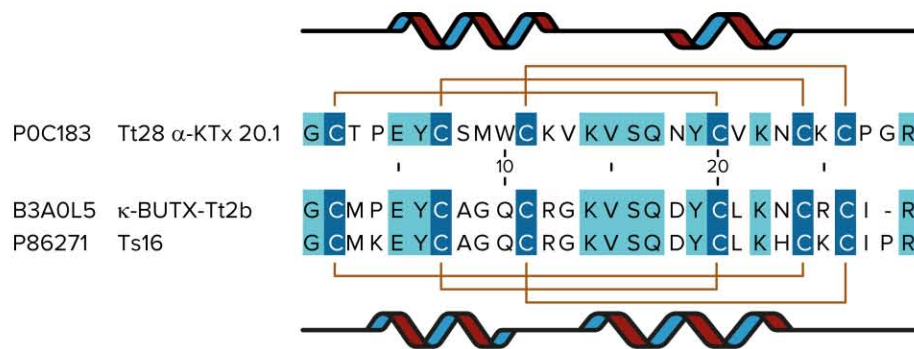


Figura 3.8. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de Tt28, Tt2b y Ts16. Los aminoácidos idénticos en las tres secuencias se resaltan en color azul claro. Las líneas que conectan las cisteínas en azul oscuro indican la conectividad de los puentes disulfuro. Los porcentajes de identidad de Tt2b y Ts16 con Tt28 son 65.0% y 62.0%, respectivamente.

En el comparativo entre los espectros de la muestra nativa (50  $\mu$ g) y GS-Tt28 en la Figura 3.9, podemos destacar en primera instancia las posiciones y formas de las señales. En los espectros unidimensionales de hidrógeno ( $^1\text{H}$ ) se identifican con asteriscos las señales similares en forma y proporción (tamaño) que podrían proceder del mismo sistema de espín en cada una de las muestras. Señales clave como la(s) localizada(s) alrededor de 10 ppm (inciso G) muestran las diferencias en conformación. La señal referida pertenece al  $^1\text{H}$  unido al átomo de nitrógeno en la cadena lateral del triptófano número 10 (ver Figura 10). La disminución del valor de desplazamiento químico en la muestra nativa puede asociarse a una orientación de este hidrógeno hacia el seno de la conformación (mayor densidad electrónica es igual a mayor efecto de apantallamiento lo cual se refleja en un valor menor del desplazamiento químico). En el caso de la muestra de GS-Tt28 el hidrógeno parece estar más desprotegido, es decir, orientado hacia el exterior de la estructura. Este hecho junto con las diferencias de otras señales supone una conformación diferente. Sin embargo, hay señales con desplazamientos químicos muy similares con lo cual planteamos que no hay una divergencia fuerte entre las conformaciones nativa y la de GS-Tt28.

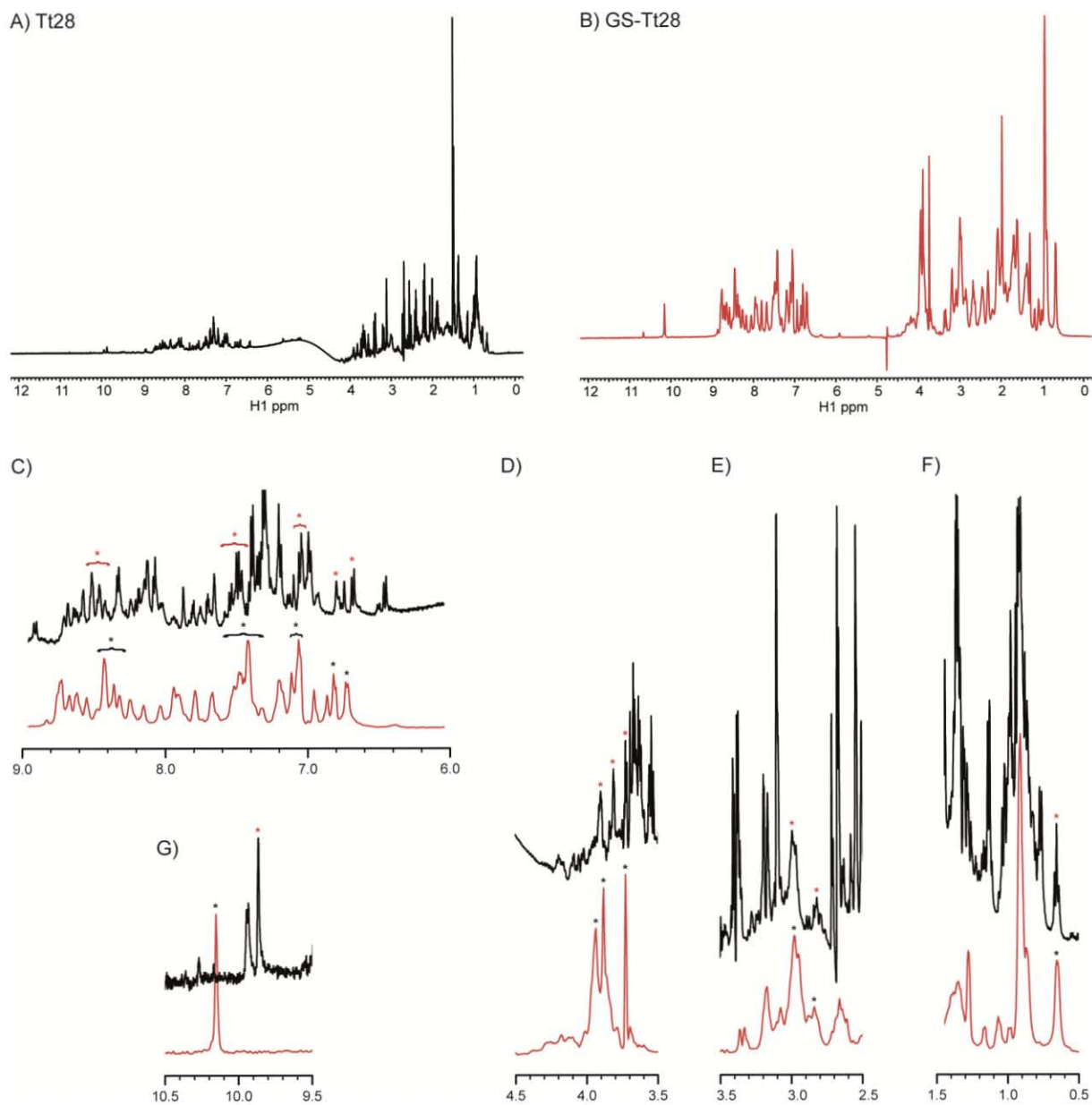


Figura 3.9. Espectros de hidrógeno  $^1\text{H}$  de A) Tt28 nativa y B) GS-Tt28. La dispersión similar de las señales en ambos espectros. En los incisos C-G) se hacen comparativos de regiones específicas y señales claves, las cuales demuestran las similitudes y diferencias estructurales evaluadas de forma cualitativa.

### 3.4 Conclusiones

El modelo estructural del péptido recombinante GS-Tt28 asemeja al plegamiento adoptado por la toxina  $\kappa$ -BUTTX-Tt2b y el péptido Ts16; sin embargo, la disposición de las hélices alfa y la conectividad de los puentes disulfuro modifica la estructura. Esto nos permite establecer que en el caso de GS-Tt28 la conectividad de los puentes disulfuro no dicta el plegamiento de la proteína, sino que únicamente estabiliza la estructura global.

La comparación de los espectros de hidrógeno refleja el carácter híbrido de la estructura tridimensional del péptido recombinante GS-Tt28 la cual en algunas zonas del espectro las señales de la muestra nativa y recombinante se asemejan en desplazamiento químico y en forma. Con esto concluimos que es necesario determinar las condiciones adecuadas para que el péptido recombinante adopte el plegamiento nativo y con ello comprobar la hipótesis sobre el plegamiento de Tt28.

## Referencias

- (1) Sunagar, K.; Undheim, E. A. B.; Chan, A. H. C.; Koludarov, I.; Muñoz-Gómez, S. A.; Antunes, A.; Fry, B. G. Evolution stings: The origin and diversification of scorpion toxin peptide scaffolds. *Toxins (Basel)*. **2013**, *5* (12), 2456–2487 DOI: 10.3390/toxins5122456.
- (2) Dutertre, S.; Lewis, R. J. Use of Venom Peptides to Probe Ion Channel Structure and Function\*. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (18), 13315–13320 DOI: 10.1074/jbc.R109.076596.
- (3) Conde, R.; Zamudio, F. Z.; Rodríguez, M. H.; Possani, L. D. Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Lett.* **2000**, *471* (2-3), 165–168 DOI: 10.1016/S0014-5793(00)01384-3.
- (4) Billen, B.; Bosmans, F.; Tytgat, J. Animal peptides targeting voltage-activated sodium channels. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14* (24), 2492–2502.
- (5) Possani, L. D.; Becerril, B.; Delepiere, M.; Tytgat, J. Scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup>-channels. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *264* (2), 287–300.
- (6) Rodríguez De La Vega, R. C.; Possani, L. D. Current views on scorpion toxins specific for K<sup>+</sup>-channels. *Toxicon*. **2004**, pp 865–875.
- (7) Warmke, J. W.; Ganetzky, B. A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91* (8), 3438–3442.
- (8) Mouhat, S.; Andreotti, N.; Jouirou, B.; Sabatier, J. M. Animal toxins acting on voltage-gated potassium channels. *Curr Pharm Des* **2008**, *14* (24), 2503–2518 DOI: 10.2174/138161208785777441.
- (9) Saucedo, A. L.; Flores-Solis, D.; Rodríguez De La Vega, R. C.; Ramírez-Cordero, B.; Hernández-López, R. A.; Cano-Sánchez, P.; Navarro, R. N.; García-Valdés, J.; Coronas-Valderrama, F.; De Roodt, A. R.; et al. New tricks of an old pattern: Structural versatility of scorpion toxins with common cysteine spacing. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (15), 12321–12330 DOI: 10.1074/jbc.M111.329607.
- (10) Ramírez-Cordero, B.; Toledano, Y.; Cano-Sánchez, P.; Hernández-López, R. A.; Flores-Solis, D.; Saucedo, A. L.; Chávez-Uribe, I.; Briebe, L. G.; Del Río-Portilla, F. Cytotoxicity of recombinant tamapin and related toxin-like peptides on model cell lines. *Chem. Res. Toxicol.* **2014**, *27* (6), 960–967 DOI: 10.1021/tx4004193.
- (11) King, G. F. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2011**, *11* (11), 1469–1484 DOI: 10.1517/14712598.2011.621940.
- (12) Beeton, C. *Targets and Therapeutic Properties*; Elsevier, 2013.
- (13) The Nobel Prize in Chemistry 1962 [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1962/index.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1962/index.html).
- (14) Purcell, E. M.; Torrey, H. C.; Pound, R. V. Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid [7]. 1946, pp 37–38.
- (15) Bloch, F.; Hansen, W. W.; Packard, M. Nuclear induction [5]. 1946, p 127.
- (16) Ernst, R. R. Nuclear magnetic resonance fourier transform spectroscopy (nobel lecture). **1992**, *31* (7), 805–823.
- (17) Ernst, R. R. Application of Fourier Transform Spectroscopy to Magnetic Resonance. *Rev. Sci. Instrum.* **1966**, *37* (1), 93 DOI: 10.1063/1.1719961.
- (18) Aue, W. P.; Bartholdi, E.; Ernst, R. R. Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. **1976**, *64* (5), 2229–2246.
- (19) Wüthrich, K. NMR studies of structure and function of biological macromolecules (Nobel Lecture); 2003; Vol. 42, pp 3340–3363.
- (20) Wagner, G.; Wuthrich, K. Sequential Resonance Assignments in Protein H-1 Nuclear Magnetic-Resonance Spectra - Basic Pancreatic Trypsin-Inhibitor. *J. Mol. Biol.* **1982**, *155*, 347–366 DOI: Doi 10.1016/0022-2836(82)90009-2.
- (21) Keller, R. *The computer aided resonance assignment tutorial*; 2004.

- (22) Güntert, P. Automated NMR structure calculation with CYANA. *Methods Mol. Biol.* **2004**, *278*, 353–378 DOI: 10.1385/1-59259-809-9:353.
- (23) Schwieters, C. D.; Kuszewski, J. J.; Tjandra, N.; Marius Clore, G. The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package. *J. Magn. Reson.* **2003**, *160* (1), 65–73 DOI: 10.1016/S1090-7807(02)00014-9.
- (24) Serrano, P.; Pedrini, B.; Mohanty, B.; Geralt, M.; Herrmann, T.; Wüthrich, K. The J-UNIO protocol for automated protein structure determination by NMR in solution. **2012**, *53* (4), 341–354 DOI: 10.1007/s10858-012-9645-2.
- (25) Keller, J. *Understanding NMR spectroscopy*, Second.; John Wiley & Sons, Ltd: West Sussex, 2010.
- (26) Cavanagh, J.; Fairbrother, W. J.; Palmer, A. G.; Skelton, N. J.; Rance, M. *Protein NMR Spectroscopy*; Elsevier Inc., 2007.
- (27) Kumar, A.; Wagner, G.; Ernst, R. R.; Wuethrich, K. Buildup rates of the nuclear Overhauser effect measured by two-dimensional proton magnetic resonance spectroscopy: implications for studies of protein conformation. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103* (13), 3654–3658 DOI: 10.1021/ja00403a008.
- (28) Vögeli, B. The nuclear Overhauser effect from a quantitative perspective. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2014**, *78*, 1–46 DOI: 10.1016/j.pnmrs.2013.11.001.
- (29) Hwang, T. L.; Shaka, A. J. Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients. *J. Magn. Reson. Ser. A* **1995**, *112* (2), 275–279 DOI: 10.1006/jmra.1995.1047.
- (30) Nguyen, B. D.; Meng, X.; Donovan, K. J.; Shaka, A. J. SOGGY: Solvent-optimized double gradient spectroscopy for water suppression. A comparison with some existing techniques. *J. Magn. Reson.* **2007**, *184* (2), 263–274 DOI: 10.1016/j.jmr.2006.10.014.
- (31) Grzesiek, S.; Bax, A. The importance of not saturating water in protein NMR. Application to sensitivity enhancement and NOE measurements. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (26), 12593–12594 DOI: 10.1021/ja00079a052.
- (32) Xia, B.; Tsui, V.; Case, D. A.; Dyson, H. J.; Wright, P. E. Comparison of protein solution structures refined by molecular dynamics simulation in vacuum, with a generalized Born model, and with explicit water. *J. Biomol. NMR* **2002**, *22* (4), 317–331 DOI: 10.1023/A:1014929925008.
- (33) Gurrola, G. B.; Hernández-López, R. A.; Rodríguez de la Vega, R. C.; Varga, Z.; Batista, C. V. F.; Salas-Castillo, S. P.; Panyi, G.; Del Río-Portilla, F.; Possani, L. D. Structure, function, and chemical synthesis of Vaejovis mexicanus peptide 24: A novel potent blocker of Kv1.3 potassium channels of human T lymphocytes. *Biochemistry* **2012**, *51* (19), 4049–4061 DOI: 10.1021/bi300060n.
- (34) Case, D. A.; Cheatham, T. E.; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K. M.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R. J. The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26* (16), 1668–1688 DOI: 10.1002/jcc.20290.
- (35) Case, D. A.; Darden, T. A.; Cheatham III, T. E.; Simmerling, C. L.; Wang, J.; Duke, R. E.; Luo, R.; Merz, K. M.; Pearlman, D. A.; Crowley, M.; et al. AMBER. 9th ed. University of California, San Francisco 2006.
- (36) Hoover, D. M.; Lubkowski, J. DNAWorks: an automated method for designing oligonucleotides for PCR-based gene synthesis. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30* (10), e43.
- (37) Marley, J.; Lu, M.; Bracken, C. A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins. *J. Biomol. NMR* **2001**, *20* (1), 71–75 DOI: Doi 10.1023/A:1011254402785.
- (38) Gobom, J.; Schuerenberg, M.; Mueller, M.; Theiss, D.; Lehrach, H.; Nordhoff, E.  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid affinity sample preparation. A protocol for MALDI-MS peptide analysis in proteomics. *Anal. Chem.* **2001**, *73* (3), 434–438 DOI: 10.1021/ac001241s.
- (39) Carballar-Lejarazú, R.; Rodríguez, M. H.; De La Cruz Hernández-Hernández, F.; Ramos-Castañeda, J.; Possani, L. D.; Zurita-Ortega, M.; Reynaud-Garza, E.; Hernández-Rivas, R.; Loukeris, T.; Lycett, G.; et al. Recombinant scorpine: A multifunctional antimicrobial peptide with activity against different pathogens. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65* (19), 3081–3092 DOI: 10.1007/s00018-008-8250-8.
- (40) Zhang, C.; He, X.; Gu, Y.; Zhou, H.; Cao, J.; Gao, Q. Recombinant scorpine produced using SUMO fusion partner in Escherichia coli has the activities against clinically isolated bacteria and inhibits the Plasmodium falciparum parasitemia in vitro. *PLoS One* **2014**, *9* (7), e103456 DOI: 10.1371/journal.pone.0103456.



- (41) Fang, W.; Vega-Rodríguez, J.; Ghosh, A. K.; Jacobs-Lorena, M.; Kang, A.; St Leger, R. J. Development of transgenic fungi that kill human malaria parasites in mosquitoes. *Science* **2011**, *331* (6020), 1074–1077 DOI: 10.1126/science.1199115.
- (42) Wang, S.; Ghosh, A. K.; Bongio, N. J.; Stebbings, K. A.; Lampe, D. J.; Jacobs-Lorena, M. Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109* (31), 12734–12739 DOI: 10.1073/pnas.1204158109.
- (43) Bongio, N. J.; Lampe, D. J. Inhibition of *Plasmodium berghei* Development in Mosquitoes by Effector Proteins Secreted from *Asaia* sp. Bacteria Using a Novel Native Secretion Signal. *PLoS One* **2015**, *10* (12), e0143541 DOI: 10.1371/journal.pone.0143541.
- (44) Uawonggul, N.; Thammasirirak, S.; Chaveerach, A.; Arkaravichien, T.; Bunyatratthata, W.; Ruangjirachuporn, W.; Jearranaiprepame, P.; Nakamura, T.; Matsuda, M.; Kobayashi, M.; et al. Purification and characterization of Heteroscorpine-1 (HS-1) toxin from *Heterometrus laoticus* scorpion venom. *Toxicon* **2007**, *49* (1), 19–29 DOI: 10.1016/j.toxicon.2006.09.003.
- (45) Diego-García, E.; Abdel-Mottaleb, Y.; Schwartz, E. F.; Rodríguez de la Vega, R. C.; Tytgat, J.; Possani, L. D. Cytolytic and K<sup>+</sup> channel blocking activities of  $\beta$ -KTx and scorpine-like peptides purified from scorpion venoms. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65* (1), 187–200 DOI: 10.1007/s00018-007-7370-x.
- (46) Diego-García, E.; Schwartz, E. F.; D'Suze, G.; González, S. A. R.; Batista, C. V. F.; García, B. I.; Rodríguez de la Vega, R. C.; Possani, L. D. Wide phylogenetic distribution of Scorpine and long-chain  $\beta$ -KTx-like peptides in scorpion venoms: Identification of “orphan” components. *Peptides* **2007**, *28* (1), 31–37 DOI: 10.1016/j.peptides.2006.06.012.
- (47) Gopalakrishnakone, P.; Possani, L. D.; Schwartz, E. F.; Rodríguez de la Vega, R. C. *Scorpion Venoms*; Gopalakrishnakone, P., Possani, L. D., F. Schwartz, E., Rodríguez de la Vega, R. C., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2015.
- (48) Jungo, F.; Bougueleret, L.; Xenarios, I.; Poux, S. The UniProtKB/Swiss-Prot Tox-Prot program: A central hub of integrated venom protein data. *Toxicon* **2012**, *60* (4), 551–557 DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.03.010.
- (49) Feng, J.; Yu, C.; Wang, M.; Li, Z.; Wu, Y.; Cao, Z.; Li, W.; He, X.; Han, S. Expression and characterization of a novel scorpine-like peptide Ev37, from the scorpion *Euscorpions validus*. *Protein Expr. Purif.* **2013**, *88* (1), 127–133 DOI: 10.1016/j.pep.2012.12.004.
- (50) Rogowski, R. S.; Krueger, B. K.; Collins, J. H.; Blaustein, M. P. Tityustoxin K alpha blocks voltage-gated noninactivating K<sup>+</sup> channels and unblocks inactivating K<sup>+</sup> channels blocked by alpha-dendrotoxin in synaptosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91* (4), 1475–1479.
- (51) Legros, C.; Céard, B.; Bougis, P. E.; Martin-Eauclaire, M. F. Evidence for a new class of scorpion toxins active against K<sup>+</sup> channels. *FEBS Lett.* **1998**, *431* (3), 375–380 DOI: 10.1016/S0014-5793(98)00780-7.
- (52) Cao, Z.; Xiao, F.; Peng, F.; Jiang, D.; Mao, X.; Liu, H.; Li, W.; Hu, D.; Wang, T. Expression, purification and functional characterization of a recombinant scorpion venom peptide BmTXK $\beta$ . *Peptides* **2003**, *24* (2), 187–192 DOI: 10.1016/S0196-9781(03)00025-1.
- (53) Matsushita, N.; Miyashita, M.; Ichiki, Y.; Ogura, T.; Sakuradani, E.; Nakagawa, Y.; Shimizu, S.; Miyagawa, H. Purification and cDNA cloning of LaIT2, a novel insecticidal toxin from venom of the scorpion *Liocheles australasiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2009**, *73* (12), 2769–2772 DOI: 10.1271/bbb.90509.
- (54) Zhu, S.; Gao, B.; Aumelas, A.; del Carmen Rodriguez, M.; Lanz-Mendoza, H.; Peigneur, S.; Diego-García, E.; Martin-Eauclaire, M. F.; Tytgat, J.; Possani, L. D. MeuTXK $\beta$ 1, a scorpion venom-derived two-domain potassium channel toxin-like peptide with cytolytic activity. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2010**, *1804* (4), 872–883 DOI: 10.1016/j.bbapap.2009.12.017.
- (55) Gao, B.; Xu, J.; del Carmen Rodriguez, M.; Lanz-Mendoza, H.; Hernández-Rivas, R.; Du, W.; Zhu, S. Characterization of two linear cationic antimalarial peptides in the scorpion *Mesobuthus eupeus*. *Biochimie* **2010**, *92* (4), 350–359 DOI: 10.1016/j.biochi.2010.01.011.
- (56) Zhu, S.; Tytgat, J. The scorpine family of defensins: gene structure, alternative polyadenylation and fold recognition. *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61* (14), 1751–1763 DOI: 10.1007/s00018-004-4149-1.
- (57) Rodríguez De La Vega, R. C.; Possani, L. D. On the evolution of invertebrate defensins. *Trends Genet.* **2005**, *21* (6), 330–332 DOI: 10.1016/j.tig.2005.03.009.
- (58) Diego-García, E.; Batista, C. V. F.; García-Gómez, B. I.; Lucas, S.; Candido, D. M.; Gómez-Lagunas, F.; Possani, L. D. The

- Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: Genes, peptides and function. *Toxicon* **2005**, *45* (3), 273–283 DOI: 10.1016/j.toxicon.2004.10.014.
- (59) Cerni, F. A.; Pucca, M. B.; Amorim, F. G.; Karla de Castro Figueiredo Bordon, Echterbille, J.; Quinton, L.; Pauw, E. De; Tytgat, J.; Arantes, E. C. Isolation and characterization of Ts19 Fragment II, a new long-chain potassium channel toxin from *Tityus serrulatus* venom. *Peptides* **2015**, *80*, 1–9 DOI: 10.1016/j.peptides.2015.06.004.
- (60) Mouhat, S.; Jouirou, B.; Mosbah, A.; De Waard, M.; Sabatier, J.-M. Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochem. J.* **2004**, *378* (Pt 3), 717–726 DOI: 10.1042/BJ20031860.
- (61) Baker, N. A.; Sept, D.; Joseph, S.; Holst, M. J.; McCammon, J. A. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98* (18), 10037–10041 DOI: 10.1073/pnas.181342398.
- (62) Dolinsky, T. J.; Nielsen, J. E.; McCammon, J. A.; Baker, N. A. PDB2PQR: An automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32* (WEB SERVER ISS.), W665–W667 DOI: 10.1093/nar/gkh381.
- (63) Dolinsky, T. J.; Czodrowski, P.; Li, H.; Nielsen, J. E.; Jensen, J. H.; Klebe, G.; Baker, N. A. PDB2PQR: Expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (SUPPL.2), W522–W525 DOI: 10.1093/nar/gkm276.
- (64) Dauplais, M.; Lecoq, A.; Song, J.; Cotton, J.; Jamin, N.; Gilquin, B.; Roumestand, C.; Vita, C.; de Medeiros, C. L. C.; Rowan, E. G.; et al. On the Convergent Evolution of Animal Toxins. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (7), 4302–4309 DOI: 10.1074/jbc.272.7.4302.
- (65) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 33–38 DOI: Doi 10.1016/0263-7855(96)00018-5.
- (66) Landa, A.; Jiménez, L.; Willms, K.; Jiménez-García, L. F.; Lara-Martínez, R.; Robert, L.; Cirioni, O.; Barańska-Rybak, W.; Kamysz, W. Antimicrobial peptides (Temporin A and Iseganan IB-367): Effect on the cysticerci of *Taenia crassiceps*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2009**, *164* (2), 126–130 DOI: 10.1016/j.molbiopara.2008.12.006.
- (67) Chong, M. S.; Hawkins, C. P.; Cook, G. C.; Hawkes, C. H.; Kocen, R. S. A resistant case of neurocystercosis. *Postgrad. Med. J.* **1991**, *67* (788), 577–578 DOI: 10.1136/pgmj.67.788.577.
- (68) Köhler, P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *Int. J. Parasitol.* **2001**, *31* (4), 336–345 DOI: 10.1016/S0020-7519(01)00131-X.
- (69) Takayanagui, O. M. Therapy for neurocystercosis. *Expert Rev. Neurother.* **2004**, *4* (1), 129–139 DOI: 10.1586/14737175.4.1.129.
- (70) Brandt, H.; Tamayo, R. P. Pathology of human amebiasis. *Hum. Pathol.* **1970**, *1* (3), 351–385 DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0046-8177\(70\)80072-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0046-8177(70)80072-7).
- (71) Stanley, S. L. Amoebiasis. *Lancet* **2003**, *361* (9362), 1025–1034 DOI: 10.1016/S0140-6736(03)12830-9.
- (72) Groman, R. *Metronidazole*; 2011; Vol. 12.
- (73) WHO | Amoebiasis <http://www.who.int/ith/diseases/amoebiasis/en/#.UhY23hzbCL4.mendeley> (accessed May 12, 2016).
- (74) Vermes, I.; Haanen, C.; Steffens-Nakken, H.; Reutelingsperger, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* **1995**, *184* (1), 39–51 DOI: 10.1016/0022-1759(95)00072-I.
- (75) Rodríguez de la Vega, R. C.; Vidal, N.; Possani, L. D. Scorpion Peptides. In *Handbook of Biologically Active Peptides*; Elsevier, 2013; pp 423–429.
- (76) Abdel-Mottaleb, Y.; Coronas, F. V.; De Roodt, A. R.; Possani, L. D.; Tytgat, J. A novel toxin from the venom of the scorpion *Tityus trivittatus*, is the first member of a new  $\alpha$ KTX subfamily. *FEBS Lett.* **2006**, *580* (2), 592–596 DOI: 10.1016/j.febslet.2005.12.073.

## Apéndices

### A.1 Medios de cultivo

#### Medio Luria Bertani (LB). Modificación de Miller

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

Disolver completamente los componentes en 1 L de agua destilada y ajustar el pH de la disolución. Inmediatamente esterilizar la disolución en autoclave a 120 °C y 16.5 psi durante 20 minutos.

#### Medio mínimo M9\*\*

Sales M9 5X	200 ml
NH <sub>4</sub> Cl	1.0 g
Disolución de D-Glucosa 20% w/v <sup>(f)</sup>	20 ml
Vitaminas BME 100X <sup>(f)</sup>	10 ml
MgSO <sub>4</sub> 1.0 M <sup>(a)</sup>	2.0 ml
CaCl <sub>2</sub> 1.0 M <sup>(a)</sup>	100 µl
Metales traza 1000X <sup>(f)</sup>	1.0 ml
pH	7.0

Esterilizar todos los componentes por separado (f: filtración a: autoclave) exceptuando las sales M9 5X. Para un litro cultivo, añadir en un matraz Fernbach o Erlenmeyer 770 ml de agua destilada, 1.0 g cloruro de amonio y 200 ml de sales M9 5X; homogenizar la mezcla y esterilizar por autoclave. Añadir el resto de los componentes estériles cuando la disolución alcance la temperatura ambiente.

---

\*\* Al añadir los metales traza y el CaCl<sub>2</sub> la disolución puede tornarse turbia, se recomienda agitación manual al agregar estos componentes. El cloruro de amonio puede ser sustituido por sulfato de amonio y durante la optimización de las condiciones se utilizan reactivos sin marcaje isotópico.

### Sales M9 5X

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	15.0 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	64.0 g
NaCl	2.5 g
pH	7.2

Ajustar el pH con NaOH. El cloruro de amonio puede agregarse a esta disolución respetando la proporción indicada.

### Metales traza 1000X

$\text{FeCl}_3$ ( $\approx 0.3\%$ HCl)	100 mM	5.0 ml
$\text{CaCl}_2$	200 mM	1.0 ml
$\text{MnCl}_2$	400 mM	250 $\mu\text{l}$
$\text{ZnSO}_4$	200 mM	500 $\mu\text{l}$
$\text{CoCl}_2$	100 mM	200 $\mu\text{l}$
$\text{CuSO}_4$	100 mM	200 $\mu\text{l}$
$\text{NiSO}_4$	100 mM	200 $\mu\text{l}$
$\text{H}_3\text{BO}_3$ (calentar $\text{H}_2\text{O}$ )	100 mM	200 $\mu\text{l}$

Esterilizar por filtración y alicuotar en tubos de 2 ml.

## A.2 Disoluciones amortiguadoras

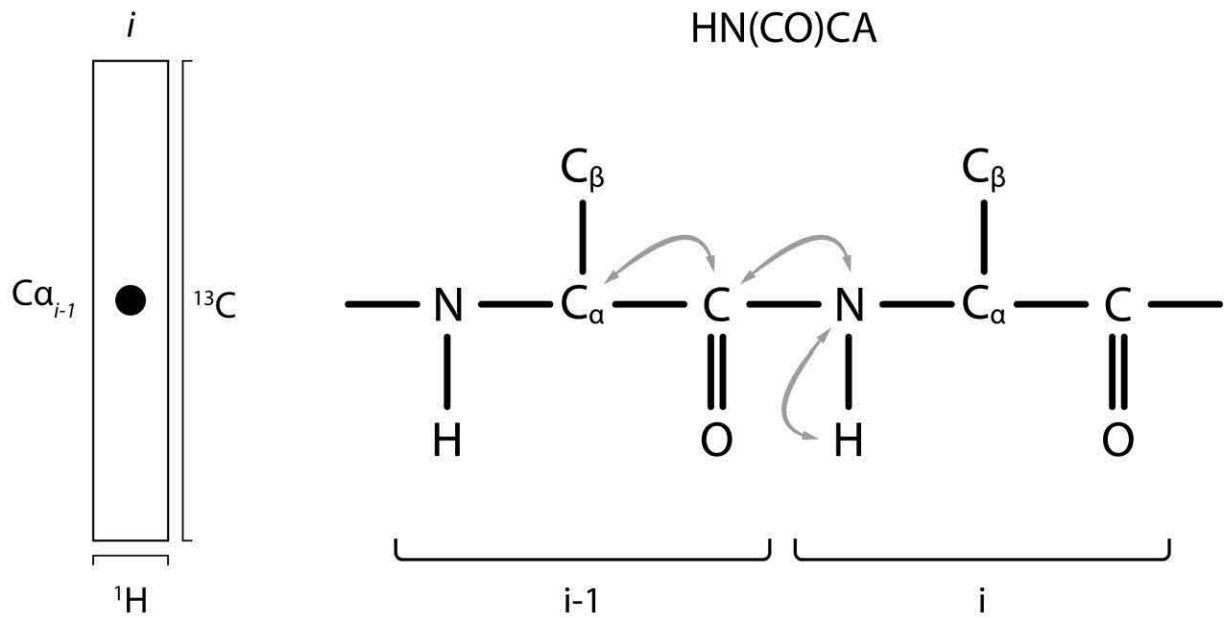
Tabla A.0.1. Disoluciones amortiguadoras utilizadas en la lisis y corte de las proteínas de fusión.

Componente	Disolución amortiguadora			
	BLI	BLII	BCI	BCII
Tris		50 mM		
NaCl		150mM		
Imidazol	-	10 mM	-	-
SDS	-	-	-	5.0% w/v
pH		8.0		

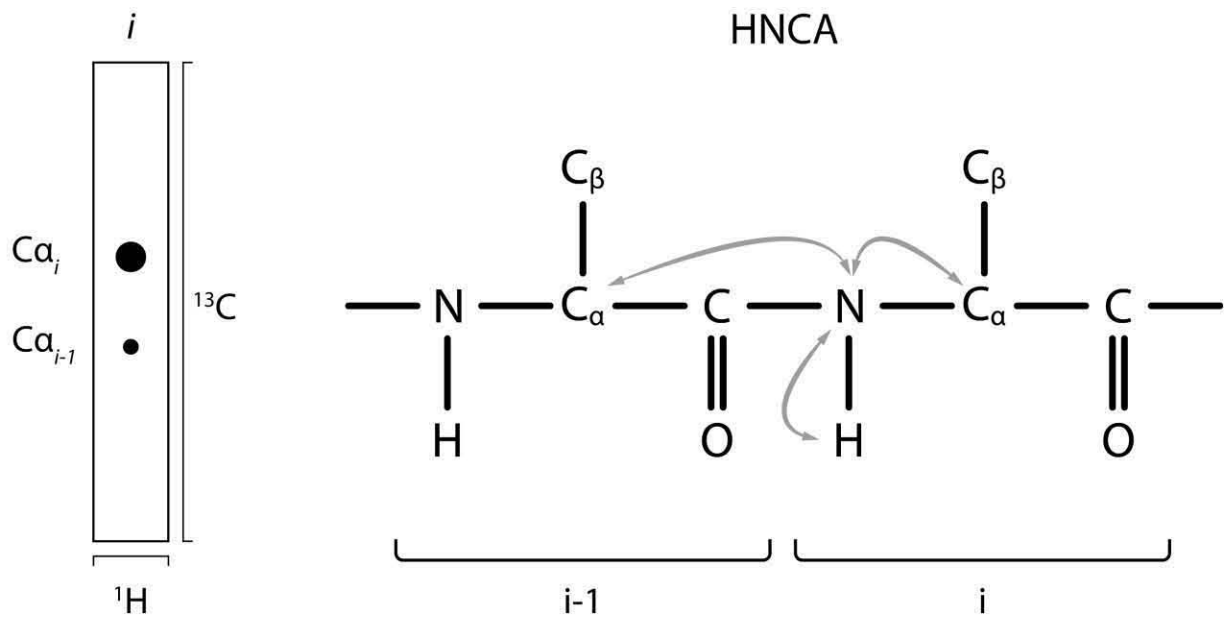
Tabla A.0.2. Disoluciones amortiguadoras utilizadas en la purificación las proteínas de fusión. La diferencia entre las tres disoluciones es la concentración de imidazol.

Componentes	Disolución amortiguadora			
	LHI	LHII	LHIII	BEI
Tris		50 mM		
NaCl		150 mM		
Imidazol	10 mM	20 mM	50 mM	500 mM
pH		8.0		

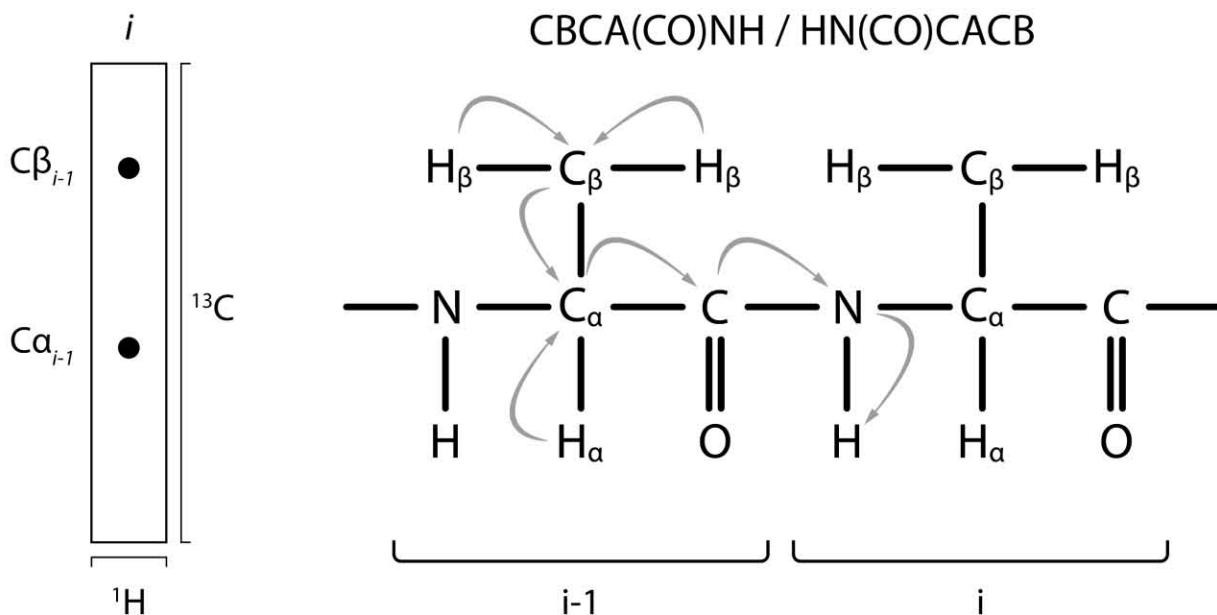
### A.3 Experimentos 3D y asignación de los espectros de rHge36



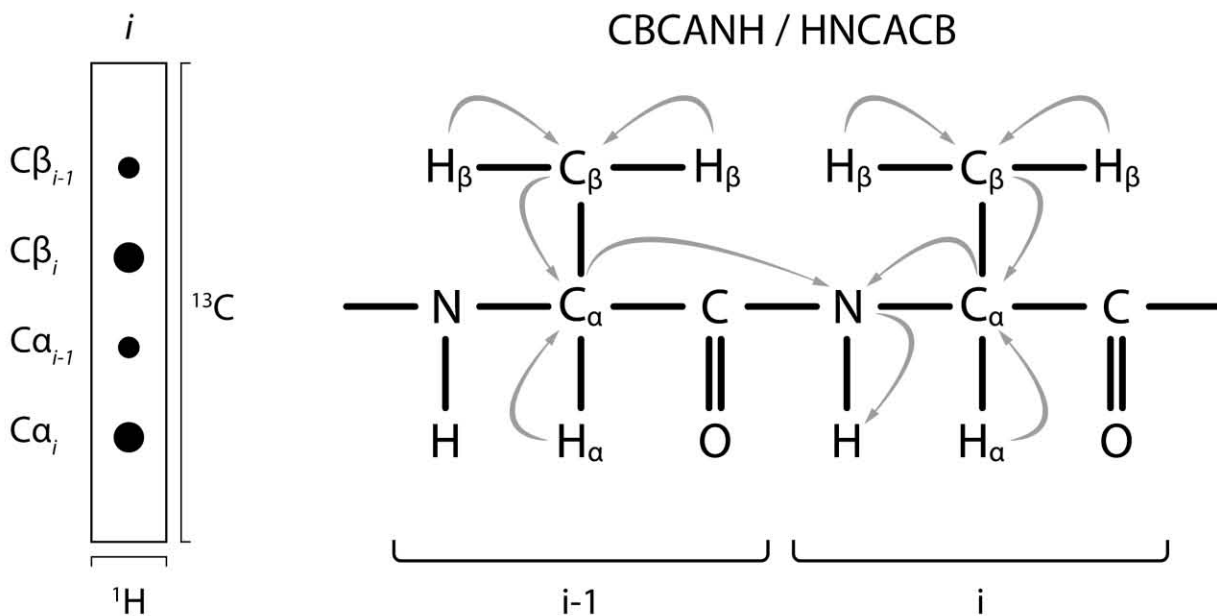
A 1. Interpretación del experimento HN(CO)CA (izquierda) y esquema de la transferencia de magnetización (derecha).



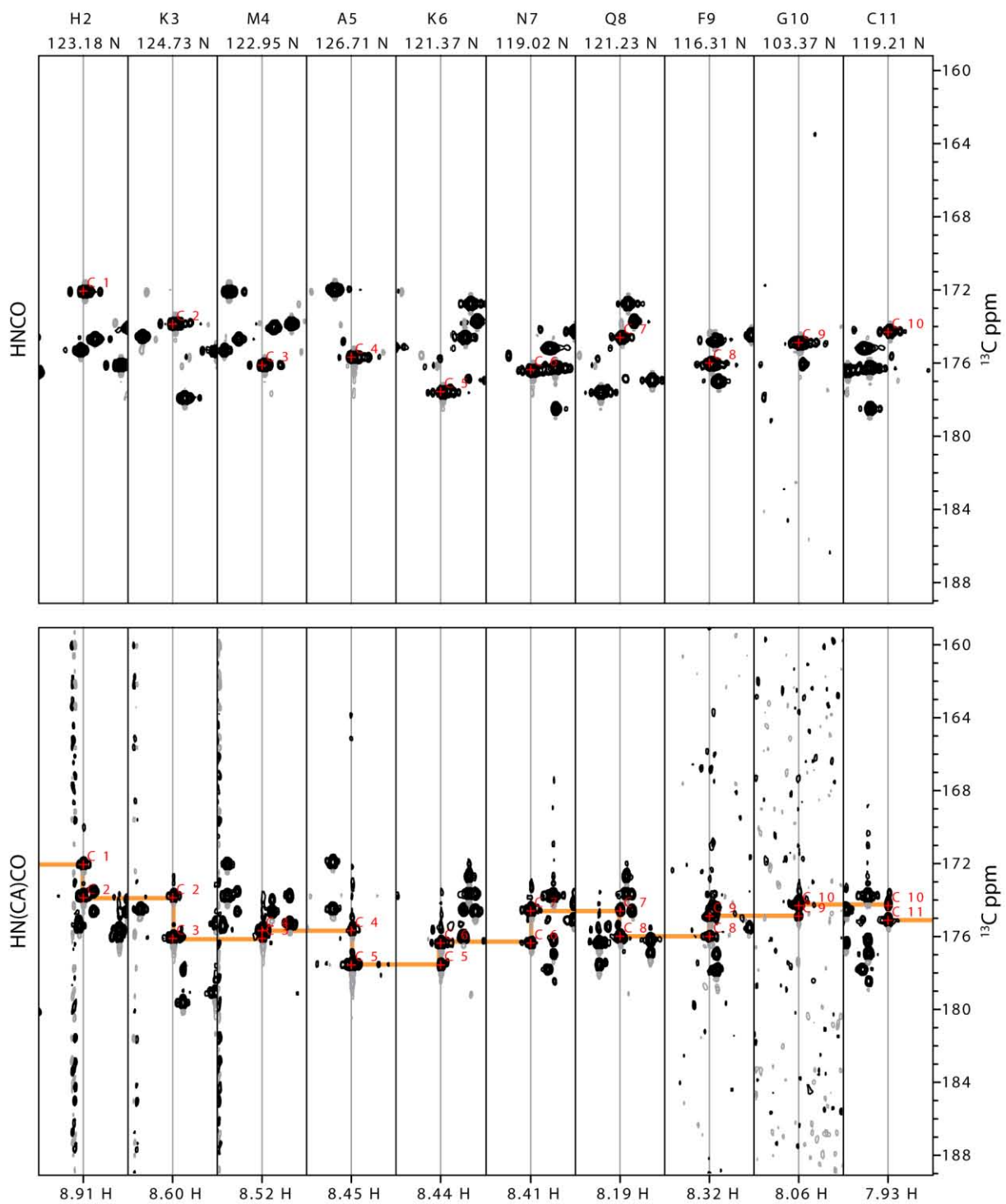
A 2. Interpretación del experimento HNCA (izquierda) y esquema de la transferencia de magnetización (derecha).



A 3. Interpretación del experimento CBCA(CO)NH/HN(CO)CACB (izquierda) y esquema de la transferencia de magnetización (derecha).

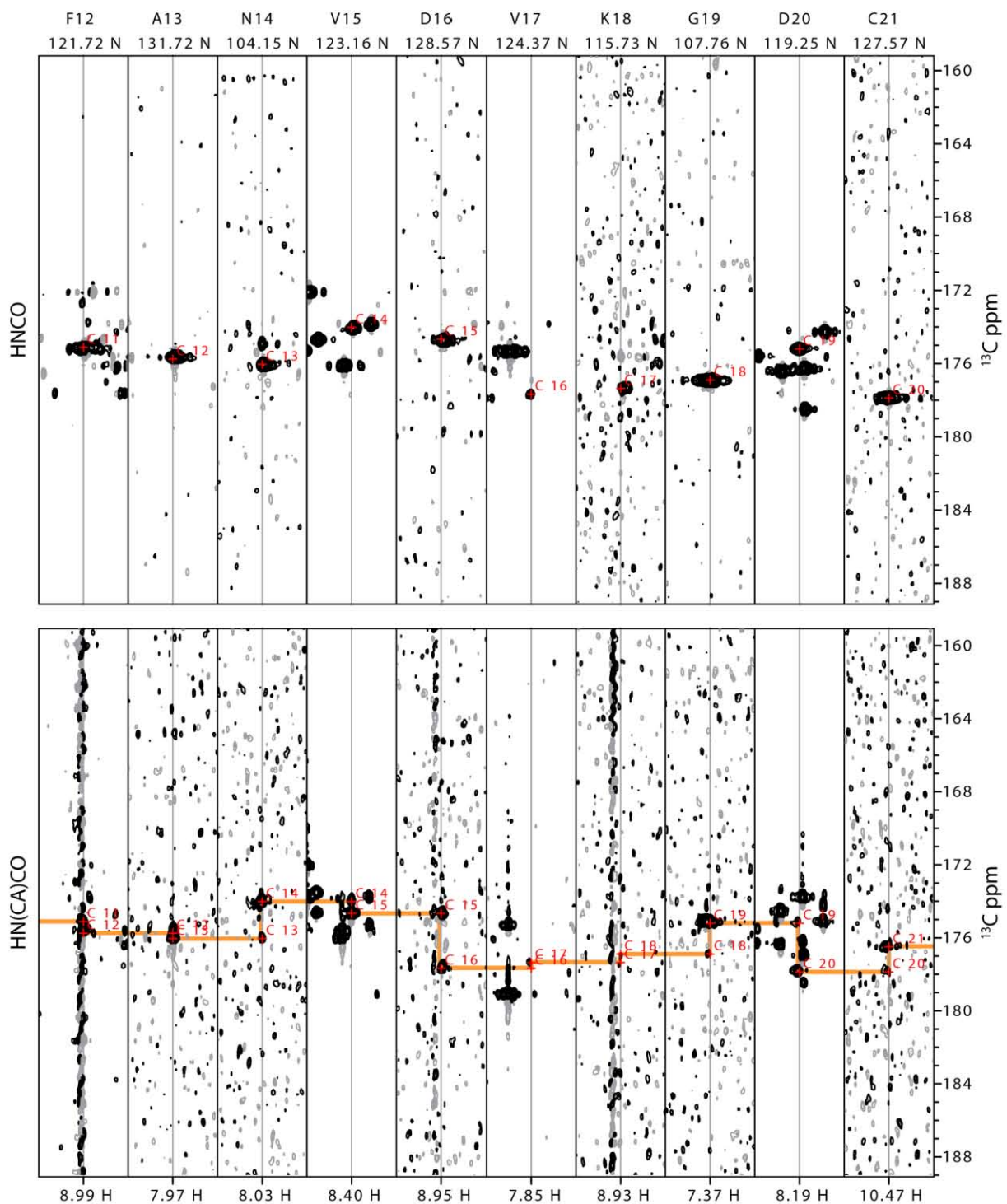


A 4. Interpretación del experimento CBCANH/HNCACB (izquierda) y esquema de la transferencia de magnetización (derecha).

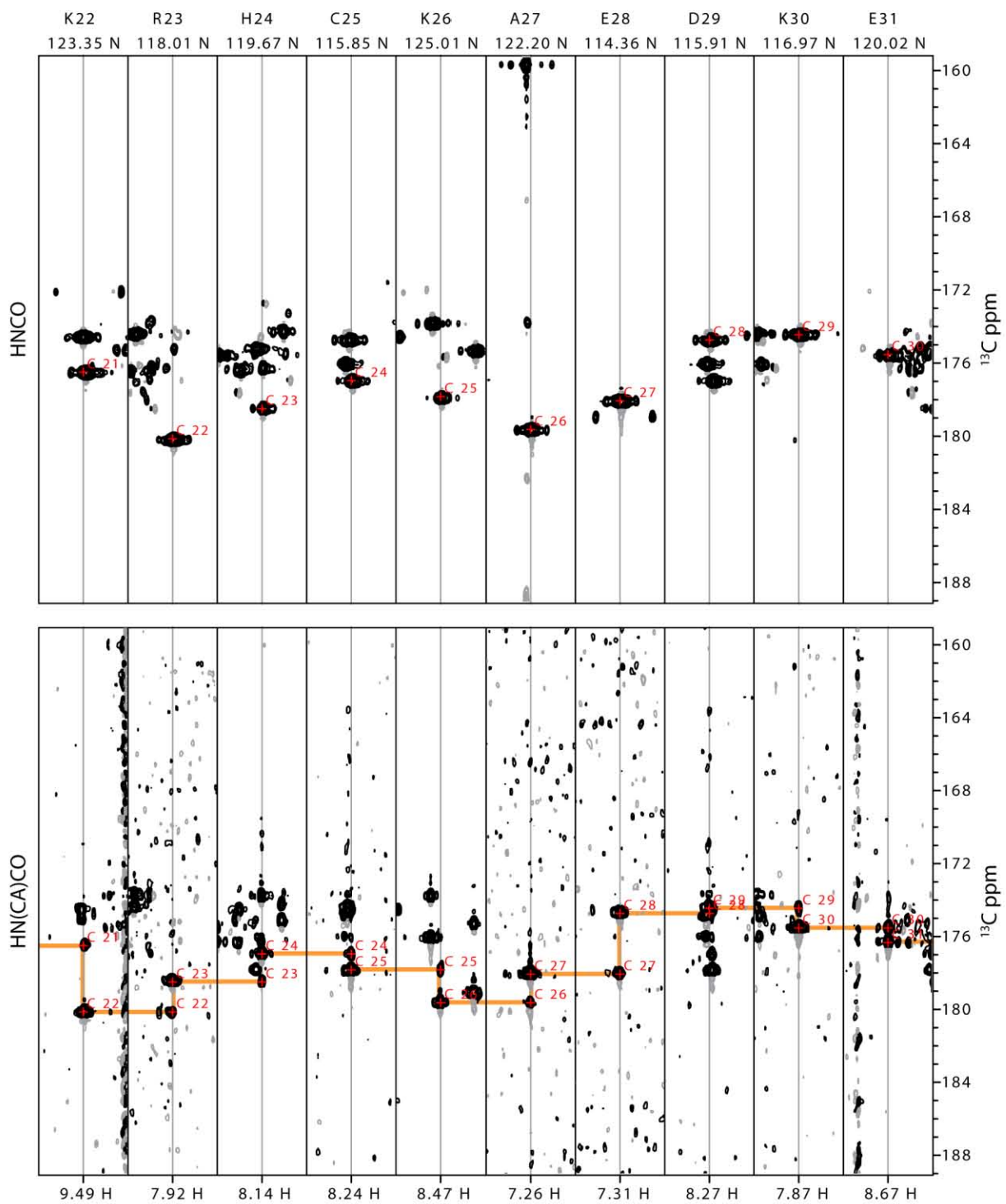


A 5. Asignación de los carbonilos de la proteína recombinante rHge36 del aminoácido 2 al 11. Cada rectángulo representa un segmento del espectro en 3D con dos valores de desplazamientos químicos fijos ( $^1\text{H}$  y  $^{15}\text{N}$ ) y otro continuo ( $^{13}\text{C}$ ).





A 6. Asignación de los carbonilos de la proteína recombinante rHge36 del aminoácido 12 al 21. El valor de desplazamiento químico en la parte inferior corresponde a  $^1\text{H}$ , mientras que en la parte superior se muestra el número de aminoácido y el valor de desplazamiento químico para  $^{15}\text{N}$ . En la parte derecha se muestra la escala correspondiente a  $^{13}\text{C}$  en la zona de carbonilos.



A 7. Asignación de los carbonilos de la proteína recombinante rHge36 del aminoácido 22 al 31.

## A.4 Publicación del trabajo

Revista: FEBS LETTERS

ISSN: 0014-5793

Dirección: WILEY-BLACKWELL, 111 RIVER ST, HOBOKEN, USA, NJ, 07030-5774

DOI: 10.1002/1873-3468.12255

## Solution structure and antiparasitic activity of scorpine-like peptides from *Hoffmannihadrurus gertschi*

David Flores-Solis<sup>1</sup>, Yanis Toledano<sup>1,2</sup>, Oscar Rodríguez-Lima<sup>3</sup>, Patricia Cano-Sánchez<sup>1</sup>, Belen Ernestina Ramírez-Cordero<sup>4</sup>, Abraham Landa<sup>3</sup>, Ricardo C. Rodríguez de la Vega<sup>5</sup> and Federico del Rio-Portilla<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Química de Biomacromoléculas, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, CU, Ciudad de México, México

<sup>2</sup> Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, CU, Ciudad de México, México

<sup>3</sup> Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, CU, Ciudad de México, México

<sup>4</sup> División de Neurociencias, Departamento de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, CU, Ciudad de México, México

<sup>5</sup> Ecologie Systematique Evolution, UMR8079, CNRS, Université Paris-Sud, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Orsay, France

### Correspondence

F. del Rio-Portilla, Departamento de Química de Biomacromoléculas, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, CU, Ciudad de México 04510, México

Fax: +52 565 5616 2203

Tel: +52 55 5622 4613

E-mail: federico.delrio@gmail.com

(Received 16 May 2016, revised 6 June 2016, accepted 7 June 2016)

doi:10.1002/1873-3468.12255

Edited by Maurice Montal

Scorpine-like peptides are two domain peptides found in different scorpion venoms displaying various antimicrobial, cytolytic, and potassium channel-blocking activities. The relative contribution of each domain to their different activities remains to be elucidated. Here, we report the recombinant production, solution structure, and antiparasitic activity of Hge36, first identified as a naturally occurring truncated form of a Scorpine-like peptide from the venom of *Hoffmannihadrurus gertschi*. We also show that removing the first four residues from Hge36 renders a molecule with enhanced potassium channel-blocking and antiparasitic activities. Our results are important to rationalize the structure-function relationships of a pharmacologically versatile molecular scaffold.

**Keywords:** antiparasitic; *Hoffmannihadrurus gertschi* (previously *Hadrurus gertschi*); KTx potassium channel-blocking toxin; scorpine; solution structure NMR and HgeD

Animal venoms contain multiple biologically active compounds, some of which exert functions with therapeutic potential [1,2]. Scorpine-like peptides found in different scorpion venoms [3] are one type of such compounds, displaying various antimicrobial, cytolytic, and potassium channel-blocking activities [4]. Their name makes a direct reference to the first scorpine isolated from the venom of the scorpion *Pandinus imperator* [5]. Scorpine (UniProt: P56972) is a potent inhibitor of *Plasmodium*'s in-vector developmental

stages, both *in vitro* [5–7], and by paratransgenesis *in vivo* [8–10]. Peptides closely resembling scorpine have been purified from the venom of several scorpion species [11,12] and precursors sequenced from venom gland libraries of an even larger number of species (an updated list can be found as part of the UniProt animal toxin annotation program available at <http://venomzone.expasy.org/>, for a review see [13]). Besides the inhibitory activity of scorpine on *Plasmodium*, other scorpine-like peptides display antibacterial (HS-1,

### Abbreviations

ACN, acetonitrile; CNBr, cyanogen bromide; DPGFSE, double pulsed field gradient spin echo; KTx, potassium channel-blocking toxin; TFA, trifluoroacetic acid.

UniProt: P0C2F4 [11]), potassium channel-blocking (Ev7, UniProt: P0DL47 [14]), and cytolytic activities (HgeScplp1, UniProt: Q0GY40 [12] from *Hoffmanni-hadrurus gertschi*, previously named as *Hadrurus gertschi* [15]). Scorpine-like peptides are related with the earlier identified beta-KTx type of scorpion venom components [16–19]. Some beta-KTx peptides are high-affinity potassium channel blockers such as TsTXK-beta (UniProt: P69940 [16]). Other beta-KTx are poor blockers of potassium channels, at least in the limited number of systems tested, yet some display antibacterial (LaIT2, UniProt: C7G3K3 [19]) or antiparasitic activities (MeuTXKbeta1, UniProt: A9XB60 [20]). Scorpine-like and beta-KTx are classified into three subfamilies, whose prototype members are TsTXK-beta for subfamily 1, BmTXK-beta (UniProt: Q9NJC6 [18]) for subfamily 2, and scorpine for subfamily 3.

Scorpine-like and beta-KTx full-length mature peptides are composed by an extended N-terminal domain followed by a three-disulphide bridged C-terminal domain with the sequence signature of the Cysteine-stabilized alpha/beta (CS $\alpha$  $\beta$ ) motif. The N-terminal domains of MeuTXKbeta1 (subfamily 1 [20]), MeuTXKbeta3 (subfamily 2, UniProt: P0CH57 [21]), and Opiscorpine-1 (subfamily 3, UniProt: Q5WR03 [22]) adopt amphipathic alpha-helical structures in solution. The CS $\alpha$  $\beta$  motif-containing domains of scorpine-like and beta-KTx peptides are more closely related to invertebrate defensins, antimicrobial peptides involved in the innate immune response of several invertebrate groups [23], than to the classical scorpion toxins [12,17,22]. Up until now, no experimental structure of any CS $\alpha$  $\beta$  domains of scorpine-like and beta-KTx peptides has been reported in the Protein Data Bank.

The contribution of each domain to the different activities displayed by scorpine-like and beta-KTx peptides remains uncertain. While the N-terminal domain suffices for the antimicrobial effect of MeuTXKbeta1, MeuTXKbeta3, and Opiscorpine-1 [20–22], in the case of HgeScplp1 (subfamily 3), the N-terminal domain (corresponding to residues 4–31) loses the antibacterial effect of the full-length peptide [12]. Moreover, full-length HgeScplp1 is cytolytic, but a potassium channel-blocking activity is unmasked by removing the N-terminal domain by chemical cleavage at a Methionine residue (HgeD, corresponding to residues 33–76 [12]). Interestingly, a naturally occurring truncated form of HgeScplp1, named Hge36, corresponding to residues 29–76, is also a noncytolytic blocker of potassium channels albeit with a more restricted spectrum and lower activity [12]. Several other naturally occurring truncated forms of scorpine-like and beta-

KTx peptides have been described [24,25], some of which display a dramatic switch in the activities when compared with those of their full-length versions. For instance, a variant of AaTXK-beta (subfamily 1, UniProt: P69939) missing the most N-terminal residue (residues 2–64) is a high-affinity activator of Kv7 potassium channels, while the full-length version is inactive in those channels [26].

Here, we report the study by NMR spectroscopy and biological assays of two truncated versions of the scorpine-like peptide HgeScplp1 differing in the presence or absence of four N-terminal residues: Hge36 and HgeD. We show that both peptides reduce the viability of cysticerci of *Taenia crassiceps* and induce apoptosis in throphozoites of *Entamoeba histolytica* at submicromolar concentrations, while having minimal effects on lymphocytes. Finally, we highlight the influence of the N-terminus in their antiparasitic and potassium channel-blocking activities. Our results shed light on the structure-function relationships of a large family of biologically active peptides.

## Material and methods

### rHge36 cloning

On the basis of the amino acid sequence of Hge36 reported in the UniProt entry Q0GY40 [12], we designed a codon usage-optimized gene to carry out the expression in *Escherichia coli*. The gene designed (purchased to Epoch Life Science, Missouri City, TX, USA) includes an enterokinase recognition site at the N-terminus of rHge36 between the restriction sites KpnI and BamHI. The DNA purchased was cloned to extract the fragment designed and ligated in the pET32a expression vector, which has a thioredoxin-A chaperon protein and a His-Tag for purification. The plasmid construction was confirmed by the DNA sequencing service from Laragen Inc (Culver City, CA, USA).

### Production and purification of recombinant Hge36 and HgeD

All the recombinant peptides were produced using the same strategy reported by Marley [27], changing only the culture media by LB instead of M9 by modifying the composition of the culture media to incorporate, or not, magnetically active isotopes in the samples. The recombinant peptide rHge36 were produced in the strain Rosetta of *E. coli* as follows. Cells transformed with pET32a-rHge36 plasmid were incubated in LB media (Miller's modification) at 37 °C and 220 r.p.m. When the optical density of the culture measured at 600 nm reached a value of 0.7 units the expression inducer (IPTG) was added to reach a final IPTG concentration of 0.5 mM. Incubation temperature

and shaking were held for 6 h. We optimized the time (8 h) and temperature (30 °C) after the induction for single- ( $^{15}\text{N}$ ) and double-labeled proteins ( $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$ ). The cells were collected by centrifugation at 5000 *g* for 30 min and subsequently resuspended in 30 mL of lysis buffer (50 mM Tris, 300 mM NaCl at pH 8.0) for each gram of cell pellets in all expressions. The extraction of protein was done by sonication (20 pulses of 30 s with 60 W; 90 s delay between each pulse). Proteins were fractionated by ion-metal affinity chromatography (IMAC; Hi-Trap chelating columns from GE-Healthcare, Waukesha, WI, USA). The fraction with the protein studied was dialyzed overnight against Tris 50 mM 150 NaCl. Protein concentration was determined by Bradford assay and then adjusted to 3.0 mg·mL<sup>-1</sup> for an enzymatic digestion using 0.5 units of enterokinase (EkMax, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for each mg of fusion protein. The cut reaction was incubated 16 h at 37 °C and then centrifuged at 5000 *g* for 15 min and then totally clarified by filtration (0.45 µm poly(vinylidene difluoride) (PVDF); Millipore, Billerica, MA, USA). The fragments with thioredoxin and His-tag were removed by a second IMAC.

### Reverse phase chromatography

Protein samples for reverse phase HPLC were prepared with the wide-pore Strata-C18 cartridges from Phenomenex. Final separations were performed with a Proteo C12 column from Phenomenex (90 Å pore size, 4.0 µm particle size, and 250 × 4.6 mm size). The optimal gradient employed for all purification runs from 15.0% A (H<sub>2</sub>O + 0.05% TFA v/v) to 35.0% B (ACN + 0.05% TFA v/v) in 10 min.

### Mass spectrometry and enzymatic digestions for disulfide bonds connectivity determination

The MALDI-TOF experiments were performed on a Bruker Daltonics Microflex LT mass spectrometer. For each analysis, 1 µL of an eluted fraction from HPLC purifications or enzymatic reaction was mixed with 10 µL of matrix (supersaturated dissolution of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid in acetonitrile and water 2 : 1 added with 0.05% v/v trifluoroacetic acid), and then 1 µL of this mixture was spotted onto the MALDI plate and later analyzed. For disulfide bond connectivity determination, 5 µg of pure rHge36 and 250 ng of trypsin were dissolved in 25 µL of buffer reaction (Tris 50 mM at pH 8.0) and then incubated at 37 °C for 16 h. The products were processed and analyzed by MALDI-TOF.

### CNBr reaction

A sample of M-HgeD was directly dissolved in trifluoroacetic acid at 50.0% v/v to get a final protein

concentration of 10 mg·mL<sup>-1</sup>. Subsequent to the addition of the protein, the oxygen in solution was purged with nitrogen prior to the addition of an excess of 100-fold molar equivalents of cyanogen bromide (CNBr; 5.0 M; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for each methionine in the protein sequence. Reaction was protected from light sources during 24 h under stir in N<sub>2</sub> atmosphere. The reaction was quenched adding water with a proportion of four-fold reaction's volume. The protein solution was diluted with water until the pH was higher than 1.5. Finally, the sample was recovered from the solution by Strata cartridges and prepared for reverse phase HPLC purification.

### NMR spectroscopy

Dry peptide samples were dissolved in deionized water and 5.0% D<sub>2</sub>O v/v (Cambridge Isotopes Laboratories, Tewksbury, MA, USA). The pH value of all samples prepared was near to 3.5 with a protein concentration of 3.0 mM. All experiments in the 500 MHz spectrometer were carried out on a 3.0 mm probe equipped with three channels at 297 K and without spinning the tubes. 2D NMR spectra DQF-COSY, TOCSY, and NOESY were acquired in a Varian INNOVA 500 MHz. Water signal was successfully suppressed with the Double Pulsed Field Gradient Spin Echo (DPFGSE) [28]. The TOCSY-HSQC (80 ms spin lock mixing time) and NOESY-HSQC (150 ms mixing time) experiments were recorded using the single  $^{15}\text{N}$ -labeled protein. 3D NMR spectrum HNCO, HNCOCA, HNCA, HNCACO, CBCANH, and CBCACONH experiments were performed with double-labeled protein sample. The 2D-TOCSY (80 ms of mixing time) and 2D-NOESY (150 ms of mixing time) experiments were acquired in a Bruker ASCEND (Bruker BioSpin, Billerica, MA, USA) spectrometer operating at 700 MHz in the same experimental conditions except for the probe which was a 5.0 mm probe with two channels.

### Structure calculation

Experimental data sets were processed with the NMRPIPE software [29]. Peak picking, spin systems identification, and NOE signals assignment were done in CARA 1.8 [30]. Automatic NOE assignments and structure calculations were performed in CYANA 2.1 [31]. Each protein model was constructed with a set of 20 structural representations selected from calculations using the lowest energy value and no violations constraints. Individually, the assemblies were submitted to a molecular dynamics refinement in AMBER 9 following the protocol previously described by Gurrola *et al.* [32]. Refined structural models of rHge36 and HgeD were validated and uploaded to the Protein Data Bank (PDB ID: 5IPO and 5JYH, respectively) and Biological Magnetic Resonance Bank (BMRB ID: 30033 and 30089, respectively).

## Cysticidal activity

### Biological materials

*Taenia crassiceps* WFU strain cysticerci were obtained from experimentally infected mice, briefly, 6 weeks old female BALB/cJ mice were infected with 10 WFU strain *T. crassiceps* cysticerci in peritoneal cavity using a 20G needle and euthanized 90 days after cysticerci inoculation. The mice were purchased by Harlan Laboratories (Mexico) and maintained in a pathogen free environment at the Medicine School, UNAM animal Care facilities. Animals were monitored every day, all mice presented good health until sacrifice at 90 days. Cysticerci obtained were washed four times with sterile ice-cold PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2) and used for experiments.

### In vitro experiments on *T. crassiceps* cysticerci

Nonbudding *T. crassiceps* cysticerci 2–3 mm in diameter were incubated overnight at 37°C in a humid chamber with 5% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 media (GIBCO-BRL, San Francisco, CA, USA) with 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM penicillin (100 U·mL<sup>-1</sup>), and streptomycin (110 µg·mL<sup>-1</sup>). On the following day, groups of 20 cysticerci were treated with different concentrations of the peptides: 10, 50, 100, 200, 500, and 1000 nM; they were monitored for periods: 1, 3, 6, 12, and 24 h. Motility, integrity of cysticerci, and evagination of the scolex were used as parameters of viability. Motility and integrity of the bladder wall were assessed by observation in an inverted light microscope (Eclipse TS 100-F; Nikon, Tokyo, Japan). Percent evagination was estimated after incubating the cysticerci in 1% pig bile in RPMI for 2 h. As control groups of cysticerci were incubated in RPMI medium (negative control) and with praziquantel (PQZ) dissolved in EtOH (positive control) at different concentrations (0.0001, 0.01, 1, 10, 50, and 100 nM). Additionally, a control for the vehicle (EtOH, final concentration of 0.5% v/v) was also tested.

### Ethics statement

Animals were euthanized using intravenous pentobarbital (210 mg·kg<sup>-1</sup>), according to the Official Mexican Norm: NOM-062-ZOO-1999 for production, care, and use of laboratory animals. All procedures are in strict accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the NIH, USA. The research protocol was approved by Research and Ethic Committee of the Medicine School, Universidad Nacional Autónoma de México (007-2012).

## Amoebicidal activity

### Parasite culture

*Entamoeba histolytica* HM1-IMSS trophozoites were axenically grown in TYI-S33 medium. Amoebas (1 × 10<sup>5</sup> of live

trophozoites) were placed in 96-well plates in an anaerobic chamber with 300 µL TYI-S33 supplemented with each compound so that the final concentrations were as follows: 1000, 100, 10, 1 nM.

### Parasite viability

Amoebic trophozoite viability was assessed employing the vital marker Trypan blue done at 24, 28, and 72 h under a microscope using a hemocytometer. Samples of 100 µL containing around 1 × 10<sup>4</sup> treated parasites were added with 1 µL Trypan blue 0.4% mixed and incubated at room temperature for 3 min.

### Mechanism of cell death

To determine the mechanism of cell death, flow cytometry analysis was done employing the FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with phosphatidylinositol (PI) (Biolend, San Diego, CA, USA) according to the protocol provided. Cells were washed with PBS solution and resuspended in the kit buffer at a concentration of 0.5 × 10<sup>7</sup> cells·mL<sup>-1</sup>. Then, 100 µL of cell suspension were put in a flow cytometry tube; 5 µL of FITC annexin V and 10 µL of propidium Iodide solution were added. After 15 min of incubation at room temperature (25 °C) without light, 400 µL of annexin V binding buffer were added to each tube and finally analyze by flow cytometry in a FACSCan flow cytometer (BD, Franklin Lakes, NJ, USA).

### Human peripheral blood lymphocytes

Lymphocytes were obtained from blood samples of a healthy individual with written consent. Lymphocytes were isolated in a Ficoll gradient, and placed in Petri's dishes with supplemented RPMI 1640 medium on sterile conditions at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub>. Lymphocytes were sorted by flow cytometry using a specific F4/80 antibody.

Effect of scorpine-like peptides was analyzed at the IC50 determined in amoebic cultures. Lymphocytes viability was determined by three independent assays by triplicate. For each experiment, 1 × 10<sup>5</sup> lymphocytes per well were added in 96-well plate with 90 µL of supplemented RPMI 1640 plus 10 µL of the corresponding scorpine-like peptide at final concentrations of 2.6, 8.2, 16.4 nM in each well. Treated cultures were incubated for 72 h and viability, apoptosis and necrosis was determined by flow cytometry using the annexin V-FITC apoptosis detection kit I (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA), according to the protocol of BD Pharmingen. Culture media of each well was removed and replaced with PBS 1×, annexin V, and propidium iodide markers were added and the cells further incubated for 15 min. After the incubation time, the cells were fixed with 50 µL of a stock solution of p-formaldehyde 3.7%, and the samples were read in a FACS Aria flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

## Results

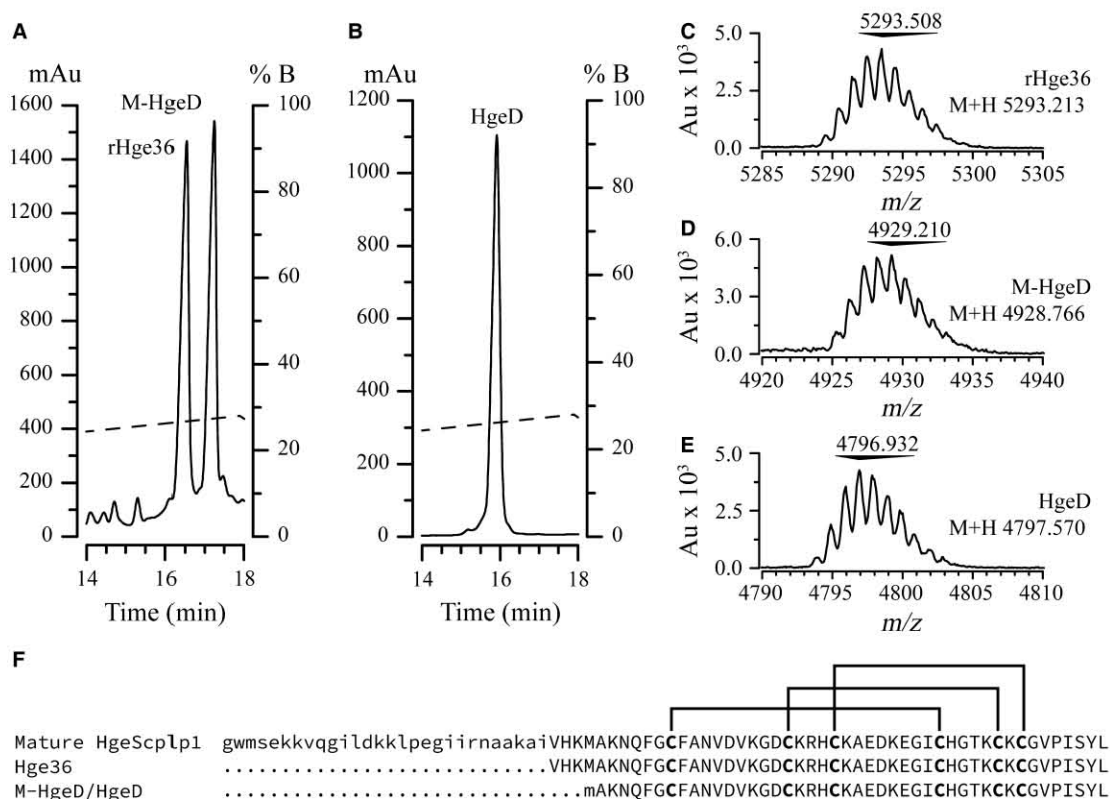
### Production of recombinant peptides

Recombinant Hge36 (rHge36) was produced in Rosetta strain of *Escherichia coli*. We identified an intermediate peptide of 45 amino acids, named M-HgeD, as a subproduct in the production of rHge36 which was used to obtain HgeD by chemical hydrolysis with CNBr (efficiency at 24 h:  $36 \pm 5\%$ ). We were able to incorporate in the peptides  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  isotopes with the strategy development by Marley [27]. After the final purifications by HPLC (Fig. 1), the peptide samples were lyophilized and weighed to establish for each peptide the global yield in function of the volume of culture. For rHge36, M-HgeD, and HgeD,

we obtain  $5.3 \pm 0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $4.9 \pm 0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , and  $1.7 \pm 0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively. The molecular mass of all peptides and the disulfide bond connectivities were confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry (Fig. S1). We obtained the mass spectra partners which confirm the connectivity between the ordinal numbered cysteines C1–C4, C2–C5, and C3–C6, thus confirming the disulfide signature of CS $\alpha\beta$  motif. This connectivity is the common scorpion toxin arrangement which is found in the alpha scorpion subfamily [33]. The connectivity was used in the structure calculations.

### NMR structure

Three disulfide bridge constrains and at least 655 NOE restrictions derived from assignments were used



**Fig. 1.** Purification, identification and amino acid sequences of HgeScplp1-derived peptides rHge36, MHgeD, and HgeD. (A) RP-HPLC purification of rHge36 after the enzymatic digestion of the fusion protein with enterokinase, note the product M-HgeD issued from an unspecific digestion. (B) RP-HPLC purification of HgeD after CNBr cleavage from M-HgeD. The dotted line in all chromatograms represents the amount of the solvent B composed by acetonitrile (ACN) and 0.05% trifluoroacetic acid v/v (TFA). (C), (D), and (E) are the MALDI mass spectra for rHge36, M-HgeD, and HgeD, respectively. The experimental mass of each peptide is underlined and the expected mass is shown at right of each spectrum. (F) Amino acid sequences of HgeScplp1-derived peptides, the fragment naturally processed from HgeScplp1 is shown in lowercase letters. The disulfide pairing is shown above the sequence block.



in order to calculate the structures of Hge36 and HgeD (Table 1). Upper distances limit and root mean square deviations of the two structural assemblies calculated in CYANA 2.1 are summarized in Table 1. The final structures from CYANA 2.1 show an alpha helix along with one beta sheet of two strands stabilized by three disulfide bridges. Amide protons for amino acids GLU and CYS at positions 20 and 21 in rHge36 displayed a broad signal near to the noise level in the 2D NMR experiments difficult to correlate by this type of experiments only. Through the 3D NMR spectra, we were able to find convincing evidence of backbone connectivity for rHge36. We assigned the CYS 21 amide proton signal at 10.21 p.p.m., which is the lowest field proton in the spectrum. The amide proton chemical shift of GLU 20 was inferred by 3D

TOCSY-HSQC NMR experiment. We performed molecular dynamics simulations in AMBER 9 software to refine unrestricted regions in the structural models obtained in CYANA 2.1, as previously described by Xian [34] and adapted by Gurrola *et al.* [32], see Fig. 2. Table 1 shows the structural data of rHge36 and HgeD. The RMSD values of the backbone for the structural assembly models of rHge36 and HgeD were 0.34 and 0.24 Å, respectively (calculated from the second to the penultimate amino acid in each sequence). The Fig. 2E shows the backbone alignment between the amino acids 5–47, in rHge36, and the amino acids 2–43 in HgeD with the lowest energy structural model of each peptide. The RMSD value for this alignment was 0.869 Å.

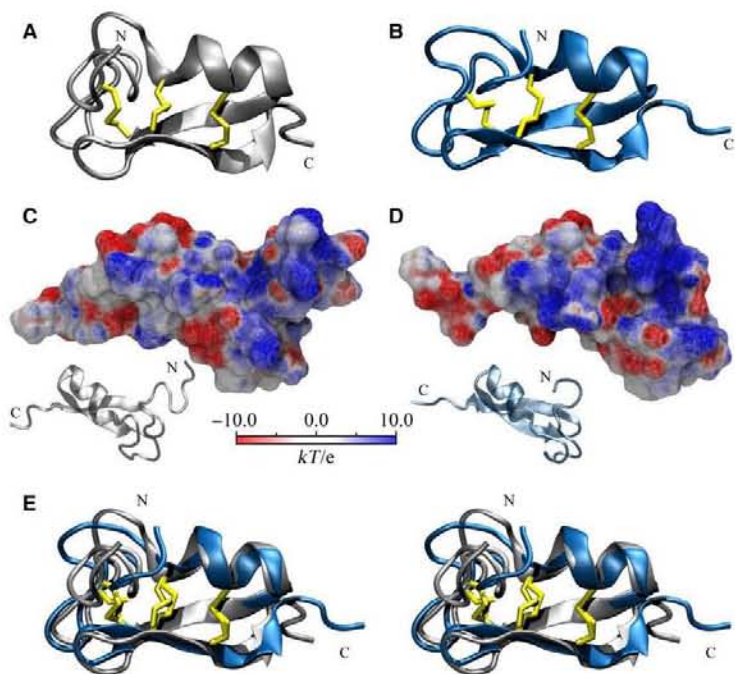
## Antiparasitic activity

### Cysticerci

To evaluate the effect of peptides over tapeworms cysticerci, we determined viability of *T. crassiceps* WFU cysticerci using the parameters motility, damage on the bladder wall, and evagination of scolex. Table S1 summarized the qualitative observations of the effects of each peptide and positive (PQZ) and negative (RPMI) controls on *T. crassiceps* WFU cysticerci. The three peptides induced damage to and reduced the mobility

**Table 1.** Upper distance limits obtained in CYANA 2.1 for NMR structure determination of Hge36, M-HgeD, and HgeD.

	rHge36	HgeD
Total	715	655
Short-range, $ i - j  \leq 1$	496	433
Medium-range, $1 <  i - j  < 5$	100	90
Long-range, $ i - j  \geq 5$	119	132
Average target function value	0.15	0.21
Average backbone RMSD to mean	0.34	0.24



**Fig. 2.** NMR structures of rHge36 and HgeD. (A) Ribbon diagram of the solution structure of rHge36 with the secondary elements stabilized by the disulfide bridges. (B) Ribbon of the solution structure of HgeD showing the same phase for rHge36. (C) and (D) the potential surfaces with their ribbon orientations of rHge36 and HgeD, respectively. The N-terminus is highlighted in the top-right side of each surface. (E) Superposition of the cartoon solution structure of rHge36 and HgeD in stereo view. N and C terminus are stated accordingly.

and evagination of *T. crassiceps* cysticerci, albeit to a different extent at the same concentration and with different IC50s (Fig. 3A–D). In all three parameters, HgeD is more potent than the other two peptides: HgeD, damage first seen at 1 h and complete loss of mobility at 6 h at 1000 nM, IC50 on evagination of  $65 \pm 10$  nM; M-HgeD, damage first seen at 6 h and complete loss of mobility at 12 h at 1000 nM, IC50 on evagination of  $178 \pm 9$  nM; Hge36, damage first seen at 3 h and complete loss of mobility at 12 h at 1000 nM, IC50 on evagination of  $167 \pm 16$  nM (see Table S1). The positive control Praziquantel (PQZ) produced a decrement of mobility at 1 h incubated with 0.01 nM and totally loss of mobility at 3 h with 10 nM. PQZ do not present visible damage in the bladder wall of the cysticerci in all incubation at different concentrations. PQZ shows a IC50  $0.05 \pm 0.02$  nM; moreover, the vehicle (EtOH) used to dissolve PQZ has no effect in cysticerci viability. The negative control with RPMI had a 100% of evagination.

### Amoebas

We evaluated the amoebicidal activity by determining the viability of amoebas in 24 h intervals after the treatment with different concentrations of the scorpine-like peptides. A time- and dose-dependent effect was observed with IC50s of  $16.4 \pm 1.3$ ,  $8.2 \pm 0.7$ , and  $2.6 \pm 0.2$  nM for rHge36, M-HgeD, and HgeD, respectively (Fig. 3E–G). Moreover, at these concentrations, we found that apoptosis was the main cell death pathway, as evaluated by flow cytometry. In this case, we found no differences between the three peptides using the IC50 values for each one, although the ratio between late apoptotic and apoptotic cells follows the pattern HgeD < M-HgeD < rHge36 (Table 2). We also tested the effect of the three peptides on lymphocytes which are cells from the immune system that respond to pathogens, substances or particles that enter into the body. Notably, when scorpine-like peptides were assayed on peripheral blood cultures ( $16.4$ ,  $8.2$ , and  $2.6$  nM for rHge36, M-HgeD, and HgeD, respectively), less than 30% of death cells were

observed, principally by apoptosis, comparing with around 70% of viable cells (Table 2). In all cases, at same concentrations, the effect was more evident on amoebas than in lymphocytes.

## Discussion

### Structure

NMR structures were determined using 2D and 3D spectra. 2D spectra were not enough to disperse all spin systems. Regions around 8.56 and 8.86 p.p.m. in 1H were the most crowded regions which made really difficult the complete assignment. It was needed to obtain 3D NMR spectra in order to assign all the amino acids. Connectivity of the disulphide bridges was also corroborated in 2D NOESY NMR spectra by the presence of cross peaks due to the proximity between the beta protons in the cysteines' side chains. It is important to mention that the presence of cross peaks between hydrogen of the side chains of cysteines could be incidental, but several NOEs were found additionally that corroborate these results. The final structures from CYANA 2.1 shows an alpha helix along with one beta sheet of two strands stabilized by three disulphide bridges, folding into a CS $\alpha$  $\beta$  motif. This structural motif is the most common in scorpion venom toxins [33,35]. However, the N-terminal region poses more NOE's than the C-terminus, producing that the N-terminus is better defined. These well-defined regions of HgeD allow the structure to get a better RMSD at the same experimental conditions.

The peptides rHge36 and its shortened versions M-HgeD and HgeD are derived from a naturally occurring truncated version of HgeScplp1, which belongs to the subfamily 3 of scorpione-like and beta-KTx peptides according to the classification previously reported [12,22]. The structures reported here are the first structural models of the CS $\alpha$  $\beta$  domain of this subfamily. We show in Fig. 2A,B the structures of rHge36 and HgeD; both structures are shown on the same orientation aligned over the backbone, and are shown superimposed in Fig. 2E (figures displayed with VMD [36]).

**Table 2.** Cell death mechanism. Quadrants Q1, Q2, and Q3 are related to a necrotic, late apoptotic or apoptotic mechanism of cell death, respectively. The Q4 quadrant is related with the percentage of live cells.

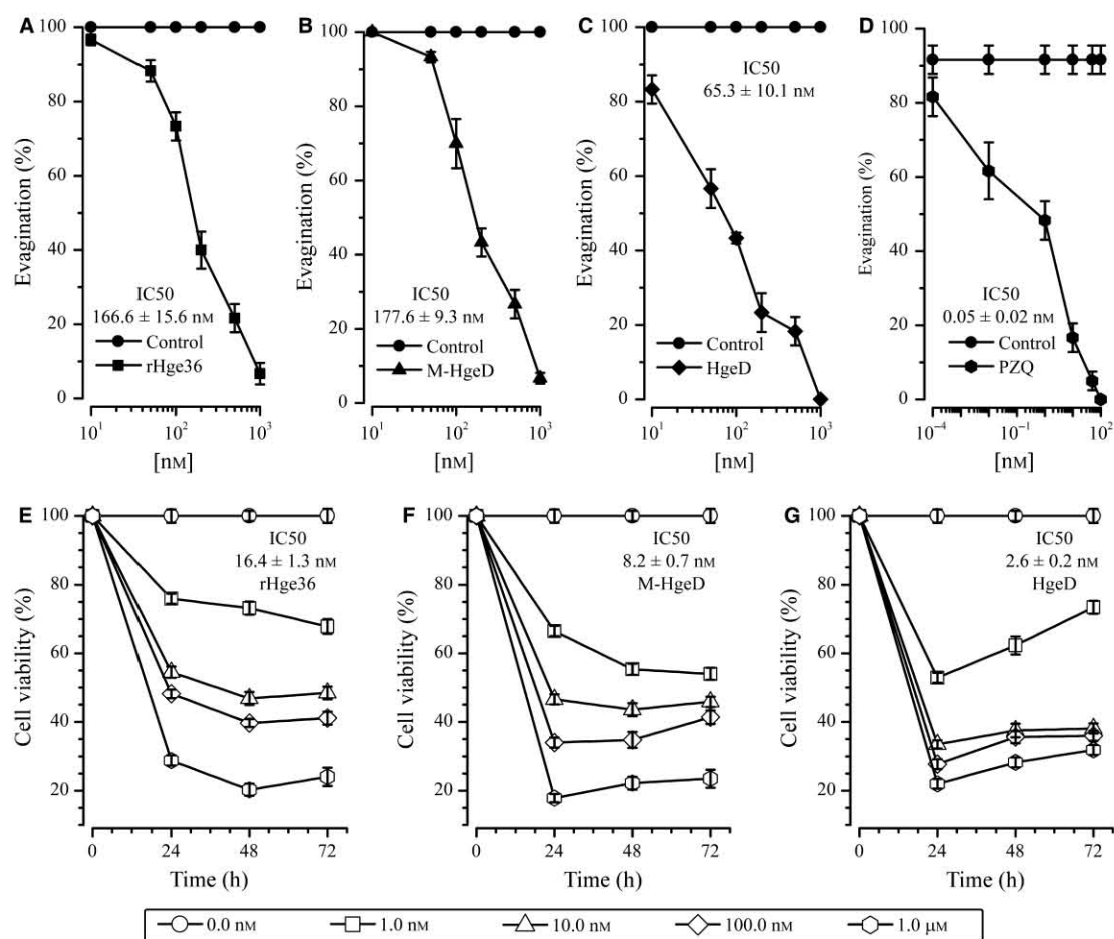
Peptide	Lymphocytes				Amoebas			
	Q1 (%)	Q2 (%)	Q3 (%)	Q4 (%)	Q1 (%)	Q2 (%)	Q3 (%)	Q4 (%)
rHge36	0	$7.4 \pm 0.6$	$22.6 \pm 1.3$	$70 \pm 0.7$	0	$13.3 \pm 0.3$	$51 \pm 1.3$	$35.7 \pm 1.6$
M-Hge36	0	$3.2 \pm 0.4$	$23.1 \pm 2.3$	$73.7 \pm 1.9$	0	$6.3 \pm 2.0$	$57.5 \pm 4.3$	$36.2 \pm 2.3$
HgeD	$0.2 \pm 0.1$	$2.2 \pm 0.1$	$21.6 \pm 3.8$	$76.2 \pm 3.9$	0	$2.4 \pm 0.9$	$58.9 \pm 2.6$	$38.7 \pm 1.5$

HgeD does not have significant changes in its secondary structure with respect to the rHge36; both of them exhibit the same structural motif (RMSD 0.869 Å). The suppression of the first four amino acids of rHge36 in HgeD can be more easily contrasted visualizing their potential surfaces calculated with the APBS web server (pH 7.0) [37]. In rHge36 model, the N-terminus is emerging from the rest of the molecule, Fig. 2C. In contrast, the same region from HgeD is oriented in the opposite direction leaving a more positive charge surface, Fig. 2D. Both peptides have a positive charge density near to the N-terminus and the charge distributions are modified by different shapes. HgeD has less positive charges due to the loss of a

lysine residue among the four amino acids suppressed; however, it shows a bigger positive region due to the exposure of the positive charge amino acids present in the N-terminus.

### Antiparasitic activities

We observed that M-HgeD and Hge36 peptides have similar deleterious effects on the viability of *T. crassiceps* cysticerci as the antimicrobial peptide of Isegran IB-367, previously reported [38] (Fig. 3). Although the HgeD peptide has a stronger effect on the parasite than its longer relatives and Isegran IB-367, it has no better effect than the antihelminthic drug PZQ and



**Fig. 3.** Antiparasitic effect of the peptides tested on *Taenia crassiceps* WFU cysticerci (A–D) and *Entamoeba histolytica* (E–G). For *T. crassiceps*, the graphic representations show the effect and the IC<sub>50</sub> of: (A) rHge36, (B) M-HgeD, and (C) HgeD compared with control (D) PZQ. Data are mean ± SD (*n* = 20). For cell viability tested in amoebas, (E) shows the effect of rHge36 with an IC<sub>50</sub> 16.4 ± 1.3 nM, (F) M-HgeD IC<sub>50</sub> 8.2 ± 0.7 nM, and (G) HgeD IC<sub>50</sub> 2.6 ± 0.2 nM. The IC<sub>50</sub> determined were used in the mechanism of cell death assay. Inhibitory concentrations for amoebas were calculated by a multivariable analysis.

further experiments are needed to clarify the mechanisms by which these peptides cause damage to the bladder wall of the cysticerci. In any case, evagination of the larvae is a necessary step to reach the adult stage in the definitive host; therefore, inhibition of evagination is important to disrupt the life cycle of these parasites. Neurocysticercosis and taeniosis diseases caused by *Taenia solium* are a real health problem in developing countries. PZQ and Albendazole are the two effective antihelmintic drugs used against this parasite; however, helminthes are acquiring resistance to them [39]. The use of peptides could be tolerated in humans and pigs (host for *T. solium*) better than antihelmintic drugs which are often administered with dexamethasone to decrease the inflammatory reaction produced by the host in response to the death of the parasite. If this inflammation is not avoided, the host could die [38,40]. Peptides that kill parasites are being studied by different research groups to find alternative antihelmintic drugs [39,41].

Amoebiasis is the disease caused by the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. It is estimated that 10% of world's population is a carrier of antibodies anti-*Entamoeba* and approximately 40 000–100 000 deaths per year are related to this parasitic disease, principally in developing countries [42,43]. Metronidazole is the first choice drug for the treatment of amoebiasis; however, several side effects that may vary from vomiting, diarrhea, and up to hallucinations have been reported [44]. These and the presence of resistant strains [45] are markers of the need of new and less toxic therapies for amoebiasis treatment. In this case, scorpine-like peptides affect the cell viability of the amoebas at nanomolar scale. For instance, their IC<sub>50</sub> values are in average 2000 times more effective than metronidazole. Moreover, the results obtained by flow cytometry demonstrates that the main cell death pathway is apoptosis. This suggests that the interaction among peptides and cells at the concentrations evaluated could not generate a cell lysis [46] like other antimicrobial peptides tested against these parasites [47]. The mechanism of action on this type of cells is not known at the moment, yet HgeD is more active than Hge36. In addition to the low effect in lymphocytes cultures at the same concentrations, these results support the idea to use scorpine-like peptides as antiparasitic agents.

### Concluding remarks

In summary, we report for the first time the structure of the CS $\alpha$  $\beta$  domain of a scorpine-like/beta-KTx peptide. As no major structural differences between Hge36 and HgeD were found besides the extended N-terminus in Hge36, we suspect that these four amino acids

interfere with the recognition of the potassium channels, Hge36 has a twofold lower potency than HgeD [12], and also disrupt the antiparasitic mechanism(s), leading to a two- to fourfold lower activity of Hge36 against tapeworms cysticerci and amoebas. Our results suggest that Hge36 and its truncated forms have targets on the bladder wall and in the scolex of cysticerci, thus giving the opportunity to develop new molecules against helminthes. Amoebicide activity of HgeD was up to 2000 times better than metronidazole, showing an apoptotic death pathway. Furthermore, the low cytotoxic effect on human peripheral blood lymphocytes cultures allow us to suggest that peptides derived from scorpine-like peptides could be good alternatives for the antiparasitic treatments used nowadays.

### Acknowledgements

DFS and ORL acknowledge to the national council of science and technology (CONACyT) for the scholarships number 240052 and 240037, respectively. FRP acknowledges CONACyT project number 166472. This work was partially supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico with grants DGAPA-PAPIIT IN215714 and IN207713 to AL and FRP, respectively. RCRV research was funded by a Marie Skłodowska-Curie/Pres-SUD grant (Cofund No. 246556). We acknowledge the LURMN at IQ-UNAM which is funded by CONACyT (Project 0224747) and UNAM.

### Author contributions

DFS wrote the paper, cloned, produced, purified, and determined the NMR protein structures; YT contributed writing paper, performed amoeba activity, and cell histology; ORL and AL contributed writing the paper and realized cysticerci experiments; BERC and PCS contributed writing the paper and did molecular biology optimization; RCRV wrote the paper and designed the study; and FRP wrote the paper, designed experiments, and acquired NMR data.

### References

- 1 King GF (2011) Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. *Expert Opin Biol Ther* **11**, 1469–1484.
- 2 Becton C (2013) Targets and therapeutic properties. In *Handbook of Biologically Active Peptides* (Kastin AJ, ed), pp. 473–482. Academic Press, San Diego, CA.
- 3 Diego-García E, Schwartz EF, D'Suze G, González SAR, Batista CVF, García BI, Rodríguez de la Vega

- RC and Possani LD (2007) Wide phylogenetic distribution of Scorpine and long-chain beta-KTx-like peptides in scorpion venoms: identification of "orphan" components. *Peptides* **28**, 31–37.
- 4 Rodríguez de la Vega RC, Corzo G and Possani LD (2015) Scorpion venoms as platform for drug development. In *Venoms to Drugs* (King GF, ed), pp. 204–220. Royal Society of Chemistry, Croydon.
  - 5 Conde R, Zamudio FZ, Rodríguez MH and Possani LD (2000) Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Lett* **471**, 165–168.
  - 6 Carballar-Lejarazú R, Rodríguez MH, de la Cruz Hernández-Hernández F, Ramos-Castañeda J, Possani LD, Zurita-Ortega M, Reynaud-Garza E, Hernández-Rivas R, Loukeris T, Lycett G *et al.* (2008) Recombinant scorpine: a multifunctional antimicrobial peptide with activity against different pathogens. *Cell Mol Life Sci* **65**, 3081–3092.
  - 7 Zhang C, He X, Gu Y, Zhou H, Cao J and Gao Q (2014) Recombinant scorpine produced using SUMO fusion partner in *Escherichia coli* has the activities against clinically isolated bacteria and inhibits the *Plasmodium falciparum* parasitemia *in vitro*. *PLoS ONE* **9**, e103456.
  - 8 Fang W, Vega-Rodríguez J, Ghosh AK, Jacobs-Lorena M, Kang A and St Leger RJ (2011) Development of transgenic fungi that kill human malaria parasites in mosquitoes. *Science* **331**, 1074–1077.
  - 9 Wang S, Ghosh AK, Bongio N, Stebbings KA, Lampe DJ and Jacobs-Lorena M (2012) Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 12734–12739.
  - 10 Bongio NJ and Lampe DJ (2015) Inhibition of *Plasmodium berghei* development in mosquitoes by effector proteins secreted from *Asaia* sp. bacteria using a novel native secretion signal. *PLoS ONE* **10**, e0143541.
  - 11 Uawonggul N, Thammasirak S, Chaveerach A, Arkaravichien T, Bunyatratchata W, Ruangjirachuporn W, Jeeranaiprepame P, Nakamura T, Matsuda M, Kobayashi M *et al.* (2007) Purification and characterization of Heteroscorpine-1 (HS-1) toxin from *Heterometrus laoticus* scorpion venom. *Toxicon* **49**, 19–29.
  - 12 Diego-García E, Abdel-Mottaleb Y, Schwartz EF, Rodríguez de la Vega RC, Tytgat J and Possani LD (2008) Cytolytic and K<sup>+</sup> channel blocking activities of beta-KTx and scorpine-like peptides purified from scorpion venoms. *Cell Mol Life Sci* **65**, 187–200.
  - 13 Jungo F, Bougueleret L, Xenarios I and Poux S (2012) The UniProtKB/Swiss-Prot Tox-Prot program: a central hub of integrated venom protein data. *Toxicon* **60**, 551–557.
  - 14 Feng J, Yu C, Wang M, Li Z, Wu Y, Cao Z, Li W, He X and Han S (2013) Expression and characterization of a novel scorpine-like peptide Ev37, from the scorpion *Euscorpions validus*. *Protein Expr Purif* **88**, 127–133.
  - 15 Santibáñez-López CE, Francke OF, Ureta C and Possani LD (2016) Scorpions from Mexico: from species diversity to venom complexity. *Toxins* **8**, 2.
  - 16 Rogowski RS, Krueger BK, Collins JH and Blaustein MP (1994) Tityustoxin K $\alpha$  blocks voltage-gated noninactivating K<sup>+</sup> channels and unblocks inactivating K<sup>+</sup> channels blocked by  $\alpha$ -dendrotoxin in synaptosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 1475–1479.
  - 17 Legros C, Céard B, Bougis PE and Martin-Eauclaire M-F (1998) Evidence for a new class of scorpion toxins active against K<sup>+</sup> channels. *FEBS Lett* **431**, 375–380.
  - 18 Cao Z, Xiao F, Peng F, Jiang D, Mao X, Liu H, Li W, Hu D and Wang T (2003) Expression, purification and functional characterization of a recombinant scorpion venom peptide BmTXK $\beta$ . *Peptides* **24**, 187–192.
  - 19 Matsushita N, Miyashita M, Ichiki Y, Ogura T, Sakuradani E, Nakagawa Y, Shimizu S and Miyagawa H (2009) Purification and cDNA cloning of LaIT2, a novel insecticidal toxin from venom of the scorpion *Liocheles australasiae*. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**, 2769–2772.
  - 20 Zhu S, Gao B, Aumelas A, del Carmen Rodríguez M, Lanz-Mendoza H, Peigneur S, Diego-García E, Martin-Eauclaire MF, Tytgat J and Possani LD (2010) MeuTXKbeta1, a scorpion venom-derived two-domain potassium channel toxin-like peptide with cytolytic activity. *Biochim Biophys Acta* **1804**, 872–883.
  - 21 Gao B, Xu J, Rodriguez Mdel C, Lanz-Mendoza H, Hernández-Rivas R, Du W and Zhu S (2010) Characterization of two linear cationic antimalarial peptides in the scorpion *Mesobuthus eupeus*. *Biochimie* **92**, 350–359.
  - 22 Zhu S and Tytgat J (2004) The scorpine family of defensins: gene structure, alternative polyadenylation and fold recognition. *Cell Mol Life Sci* **61**, 1751–1763.
  - 23 Rodríguez de la Vega RC and Possani LD (2005) On the evolution of invertebrate defensins. *Trends Genet* **21**, 330–332.
  - 24 Diego-García E, Batista CVF, García-Gómez BI, Lucas S, Candido DM, Gómez-Lagunas F and Possani LD (2005) The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: genes, peptides and function. *Toxicon* **45**, 273–283.
  - 25 Cerni FA, Pucca MB, Amorim FG, de Castro Figueiredo Bordon K, Echterbille J, Quinton L, De Pauw E, Peigneur S, Tytgat J and Arantes EC (2016) Isolation and characterization of Ts19 Fragment II, a new long-chain potassium channel toxin from *Tityus serrulatus* venom. *Peptides* **80**, 9–17.
  - 26 Landoulsi Z, Miceli F, Palmese A, Amoresano A, Marino G, El Ayeb M, Taghialatela M and Benkhalifa R (2013) Subtype-selective activation of K(v)7 channels by AaTXK $\beta_{2-64}$ , a novel toxin variant from the

- Androctonus australis* scorpion venom. *Mol Pharmacol* **84**, 763–773.
- 27 Marley J, Lu M and Bracken C (2001) A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins. *J Biomol NMR* **20**, 71–75.
  - 28 Nguyen BD, Meng X, Donovan KJ and Shaka AJ (2007) SOGGY: solvent-optimized double gradient spectroscopy for water suppression. A comparison with some existing techniques. *J Magn Reson* **184**, 263–274.
  - 29 Delaglio F, Grzesiek S, Vuister GW, Zhu G, Pfeifer J and Bax A (1995) NMRPipe – a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* **6**, 277–293.
  - 30 Keller R (2004) *The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial*, pp. 1–81. CANTINA Verlag, Goldau. ISBN 3-85600-112-3.
  - 31 Güntert P (2004) Automated NMR structure calculation with CYANA. *Methods Mol Biol* **278**, 353–378.
  - 32 Gurrola GB, Hernández-López RA, Rodríguez de la Vega RC, Varga Z, Batista CVF, Salas-Castillo SP, Panyi G, del Río-Portilla F and Possani LD (2012) Structure, function, and chemical synthesis of *Vaejovis mexicanus* peptide 24: a novel potent blocker of Kv1.3 potassium channels of human T lymphocytes. *Biochemistry* **51**, 4049–4061.
  - 33 Mouhat S, Jouirou B, Mosbah A, De Waard M and Sabatier JM (2004) Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochem J* **378**, 717–726.
  - 34 Xia B, Tsui V, Case DA, Dyson HJ and Wright PE (2002) Comparison of protein solution structures refined by molecular dynamics simulation in vacuum, with a generalized Born model, and with explicit water. *J Biomol NMR* **22**, 317–331.
  - 35 Rodríguez de la Vega RC, Vidal N and Possani LD (2015) Scorpion peptides. In *Handbook of Biologically Active Peptides* (Kastin AJ, ed), pp. 423–429. Academic Press, San Diego, CA.
  - 36 Humphrey W, Dalke A and Schulten K (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph Model* **14**, 33–38.
  - 37 Dolinsky TJ, Czodrowski P, Li H, Nielsen JE, Jensen JH, Klebe G and Baker NA (2007) PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. *Nucleic Acids Res* **35**, W522–W525.
  - 38 Landa A, Jiménez L, Willms K, Jiménez-García LF, Lara-Martínez R, Robert L, Cirioni O, Barañska-Rybak W and Kamysz W (2009) Antimicrobial peptides (Temporin A and Iseganan IB-367): effect on the cysticerci of *Taenia crassiceps*. *Mol Biochem Parasitol* **164**, 126–130.
  - 39 Chong MS, Hawkins CP, Cook GC, Hawkes CH and Kocan RS (1991) A resistant case of neurocystercosis. *Postgrad Med J* **67**, 577–578.
  - 40 Takayanagui OM (1992) Therapy for neurocystercosis. *Arch Neurol* **49**, 290.
  - 41 Köhler P (2001) The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *Int J Parasitol* **31**, 336–345.
  - 42 Brandt H and Tamayo RP (1970) Pathology of human amoebiasis. *Hum Pathol* **1**, 351–385.
  - 43 Stanley SL (2003) Amoebiasis. *Lancet* **361**, 1025–1034.
  - 44 WHO | Amoebiasis. URL: <http://www.who.int/ith/diseases/amoebiasis/en/>
  - 45 Groman R (2011) Metronidazole. *Rep Carcinog* **12**, 269–270.
  - 46 Vermees I, Haanen C, Steffens-Nakken H and Reutellingsperger C (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* **184**, 39–51.
  - 47 Torrent M, Pulido D, Rivas L and Andreu D (2012) Antimicrobial peptide action on parasites. *Curr Drug Targets* **13**, 1138–1147.

## Supporting information

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article:

**Table S1.** Effects observed *in vitro* by incubation of *Taenia crassiceps* cysticerci with peptides and Praziquantel (PQZ), and its vehicle (ETOH 0.5% v/v).

**Fig. S1.** Disulfide bond connectivity determination by enzymatic reaction with trypsin and MALDI-TOF mass spectrometry data.