

**MODELO COMPUTACIONAL DEL BLOQUEO DEL CANAL DE POTASIO Kv1.3
POR MUTANTES DE LAS TOXINAS MeuTXK α 1 Y MeuTXK α 3**

KATHERIN DUQUE VALDERRUTÉN

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI
2016**

**MODELO COMPUTACIONAL DEL BLOQUEO DEL CANAL DE POTASIO Kv1.3
POR MUTANTES DE LAS TOXINAS MeuTXK α 1 Y MeuTXK α 3**

KATHERIN DUQUE VALDERRUTÉN

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE PREGRADO EN
QUÍMICA**

TUTOR: CARLOS ALBERTO ARANGO, Ph.D.

SANTIAGO DE CALI

2016



APROBADO POR:

Ma. Francisca Villegas
María Francisca Villegas Torres
Evaluador Externo.

James Fairbanks Weston
James Fairbanks Weston
Evaluador Externo.

Carlos Alberto Arango
Carlos Alberto Arango
Director del Proyecto.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	10
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	12
2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	12
2.2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....	13
2.2.1. Canales iónicos:	13
2.2.2. Canales de potasio:	13
2.2.3. Péptidos bloqueadores de Kv1.3.....	15
2.2.4. Enlaces importantes para la interacción entre biomoléculas.	18
2.2.5. Herramientas computacionales	19
2.3. OBJETIVOS.....	21
2.3.1. Objetivo general	21
2.3.2. Objetivos específicos.....	21
2.4. METODOLOGÍA	21
2.4.1. Matriz de marco lógico	21
2.4.2. Modelamiento del canal Kv1.3.....	23
2.4.3. Modificación y modelamiento 3-dimensional de las toxinas.	24
2.4.4. Modelamiento del bloqueo del canal Kv1.3 por las toxinas modificadas 25	
2.4.5. Separación de los complejos canal-toxina.....	26
2.5. RESULTADOS	27
2.5.1. Modificación y modelamiento 3-dimensional de las toxinas.	27
2.5.2. Modelamiento del bloqueo del canal Kv1.3 por las toxinas modificadas 31	
2.5.3. Separación de los complejos canal – toxina por medio de SMD.	34
2.6. DISCUSIÓN.....	44
2.7. CONCLUSIONES	49
2.8. RECOMENDACIONES.....	50
3. BIBLIOGRAFÍA	51

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Energía inicial y final de las toxinas modificadas de MeuTXK α 1.	27
Tabla 2. Energía inicial y final de las toxinas modificadas de MeuTXK α 3.	30
Tabla 3. Energía inicial y final de los complejos en vacío y en solvente toxina – canal para las mutantes de MeuTXK α 1 y energía necesaria para desprender la toxina del canal (trabajo).	31
Tabla 4. Energía inicial y final de los complejos en vacío y en solvente toxina – canal para las mutantes de MeuTXK α 3 y energía necesaria para desprender la toxina del canal (trabajo).	33
Tabla 5. Residuos separados durante la dinámica SMD para el complejo 30 y fuerza necesaria en pN.	39
Tabla 6. Residuos separados durante la dinámica SMD para el complejo 6 y fuerza necesaria en pN.	40
Tabla 7. Residuos separados durante la dinámica SMD para complejo 27 y fuerza necesaria en pN.	40
Tabla 8. Residuos separados durante la dinámica SMD para el complejo 26 y fuerza necesaria en pN.	41
Tabla 9. Residuos separados durante la dinámica SMD para el complejo 20.	42
Tabla 10. Residuos separados durante la dinámica SMD para el complejo 23.	43
Tabla 11. Residuos del canal y cada una de las toxinas que interactúan en la separación del complejo canal - MeuTXK α 1 y canal – MeuTXK α 3. ^A residuo perteneciente a la cadena A. ^C residuo perteneciente a la cadena C (Velásquez, 2014).	47

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Gráfica de energía en función del <i>TimeStep</i> durante el proceso de minimización de la toxina modificada 1.....	29
Gráfica 2. Gráficas de Fuerza (pN) vs <i>TimeStep</i> para los complejos 5, 45, 43 y 20; los cuales requirieron mayor energía para ser desprendidos de canal en comparación con la toxina sin modificar MeuTXK α 1.	35
Gráfica 3. Gráficas de Fuerza (pN) vs <i>TimeStep</i> para los complejos 49 (izquierda) y 38 (derecha); los cuales fueron los complejos que necesitaron la menor energía para ser desprendidos de canal en comparación con la toxina sin modificar MeuTXK α 1.....	37
Gráfica 4. Gráficas de Fuerza (pN) vs <i>TimeStep</i> para los complejos 30, 6, 27 y 26; los cuales requirieron mayor energía para ser desprendidos de canal en comparación con la toxina sin modificar MeuTXK α 3.	38
Gráfica 5. Gráfica de Fuerza (pN) vs <i>TimeStep</i> (ns) para los complejos 20 y 23; los cuales fueron los complejos que necesitaron la menor energía para ser desprendidos de canal en comparación con la toxina sin modificar MeuTXK α 3. ..	42
Gráfica 6. Gráfica de fuerza (pN) en función del <i>TimeStep</i> (ns) para el complejo 5 de MeuTXK α 1 (izquierda) y el complejo 30 de MeuTXK α 3 (derecha).	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación de la activación de los canales de potasio (O'Connor & Adams, 2010).....	14
Figura 2. Representación esquemática de las subunidades de un canal de potasio (Rudy et al., 2010).	15
Figura 3. Complejo MeuTXK α 1 con Kv1.3. Los residuos naranjas corresponden a Val ¹ y Pro ²⁸ que se acercan a las Val ⁴⁰⁶ (esferas azules) del filtro del canal. El residuo amarillo es Lys ¹⁸ que interactúa con el aspartato (color morado) ubicado en el filtro del canal (Velásquez, 2014).	16
Figura 4. Alineamiento de las secuencias de las toxinas MeuTXK α 1-4 (Zhu et al, 2011).....	17
Figura 5. Complejo MeuTXK α 3 con Kv1.3. Los residuos naranjas corresponden a Val ¹ y Phe ³⁶ que se acercan a las Val ⁴⁰⁶ (esferas azules) del filtro del canal. El residuo amarillo es Lys ¹⁸ que interactúa con el aspartato (color morado) ubicado en el filtro del canal (Velásquez, 2014).	17
Figura 6. Alineamiento de secuencias de toxinas KTxS de la subfamilia 8 (Zhu et al., 2011).....	18
Figura 7. Canal Kv1.3, turreta, poro y filtro (Velásquez, 2014).	24
Figura 8. Cadenas A y C del canal Kv1.3. Valina 406, esferas azul oscuro; aspartato, fragmentos púrpura (Velásquez, 2014).....	25
Figura 9. Toxina MeuTXK α 1 en morado, mutante 6 en rosado y mutante 25 en amarillo. Los residuos señalados corresponden a las posiciones 1, 18 y 28 en las que se realizaron las modificaciones.	45
Figura 10. Figura de los complejos MeuTXK α 1 – canal Kv1.3 (en morado) y complejo 5 (verde) y complejo 45 (naranja). Los residuos de Asp del canal señalados en rojo.....	46

RESUMEN DEL PROYECTO

Los canales de potasio dependientes de voltaje son sumamente importantes para la vida, ya que se encuentran en células excitables como las neuronales y en células musculares (O'Connor & Adams, 2010). En especial se ha demostrado que el canal de potasio Kv1.3 se encuentra implicado en la señalización, función y proliferación de células T (Wulff et al., 2003). Debido a lo anterior, el canal Kv1.3 es asociado a patologías mediadas por células T, como esclerosis múltiple, diabetes mellitus y artritis reumatoide. Por ello, un bloqueador selectivo de este canal podría impedir la propagación de las células T y sería un potente inmunosupresor.

Se han encontrado toxinas en el veneno del escorpión *Mesobuthus eupeus* que han demostrado bloquear este canal selectivamente, como lo son MeuTXK α 1 y MeuTXK α 3 (Gao, Peigneur, Tytgat, & Zhu, 2010).

Los avances en dinámica molecular permiten hoy en día obtener resultados *in silico* de biomoléculas de considerable tamaño. Cadenas peptídicas como las toxinas MeuTXK α 1 y MeuTXK α 3 pueden ser modeladas en un computador de mediano tamaño.

En este proyecto se obtuvo una descripción *in silico*, por medio de dinámica molecular, del bloqueo del canal de potasio dependiente de voltaje KV1.3 por mutantes de las toxinas MeuTXK α 1 y MeuTXK α 3.

Para ello, primero se sustituyeron residuos de aminoácidos en la estructura primaria de las toxinas por otros aminoácidos. Después, se analizaron los efectos de dichos cambios sobre la conformación 3-dimensional de las toxinas. Posteriormente, se estudió cómo aquellas modificaciones afectaron el acoplamiento de los péptidos con el canal. Finalmente, se empleó la técnica *Steered Molecular Dynamics* para calcular la energía necesaria para separar las toxinas mutadas del canal.

El análisis de los cálculos permitió identificar que la modificación de valina 1 y lisina 18 de MeuTXK α 1 por una lisina y una arginina, respectivamente, favorecieron la interacción toxina-canal. También se identificó que el cambio de valina 1 y fenilalanina 36 por lisina y arginina, respectivamente, en la estructura de MeuTXK α 3 resultó en un complejo toxina-canal más estable energéticamente.

Palabras clave: dinámica molecular, *Steered Molecular Dynamics*, *NAMD*, *VMD*.

ABSTRACT

Voltage-gated potassium channels are extremely important for life, since they are located in excitable cells such as neuronal and muscular cells (O'Connor & Adams, 2010). In particular it has been shown that the potassium channel Kv1.3 is involved in signaling, function and proliferation of T-cells (Wulff et al., 2003). Due to that, the Kv1.3 channel is associated to pathologies mediated by T-cells, such as multiple sclerosis, diabetes mellitus, and rheumatoid arthritis. Thus, a selective blocking of this channel could prevent the spread of T-cells and would be a potent immunosuppressant.

Toxins found in the venom of the *Mesobuthus Eupeus* Scorpion, such as MeuTXK α 1 and MeuTXK α 3, have demonstrated to have capacity to block Kv1.3 channel selectively (Gao et al., 2010). Nowadays advances in molecular dynamics allow obtaining results *in silico* on biomolecules. Peptide chains such as the MeuTXK α 1 and MeuTXK α 3 toxins may be model in a medium-sized computer.

In this project it was obtained an *in silico* description, by molecular dynamics, of the blockage of voltage-gated potassium channels Kv1.3 by mutants of toxins MeuTXK α 1 and MeuTXK α 3.

To accomplish this objective, first, the aminoacids in the primary structure of the toxins were substituted by other natural occurring aminoacids. Later, it was performed an analysis of the effects of these changes on the 3-dimensional conformation of the toxins. Subsequently, it was studied how those modifications affected the docking of the peptides in the channel. Finally, the Steered Molecular Dynamics technique was used to calculate the energy required to separate the mutated toxins from the channel.

The analysis of the results of the calculations allowed identifying that the modification of valine 1 and lysine 18 of MeuTXK α 1 for a lysine and an arginine, respectively, favored the toxin-channel interaction. Also was identified that the change of valine 1 and 36 phenylalanine for lysine and arginine, respectively, in the structure of MeuTXK α 3 resulted in a toxin-channel complex more stable.

Keywords: molecular dynamics, Steered Molecular Dynamics, VMD, NAMD.

1. INTRODUCCIÓN

En la naturaleza se encuentran moléculas con funciones biológicas importantes para el tratamiento terapéutico de enfermedades. Durante los últimos años, se han estudiado venenos provenientes de escorpiones, anémonas, entre otros, los cuales se han propuesto como potentes inmunosupresores. Estos venenos contienen toxinas que presentan una capacidad para bloquear canales de potasio (Pennington et al., 2015; Zhu et al., 2011).

El canal de potasio dependiente de voltaje Kv1.3 ha sido estudiado durante las 3 últimas décadas debido a su rol en las enfermedades autoinmunes (Pennington et al., 2015). Kv1.3 está presente en la membrana celular y en la membrana interna mitocondrial de los linfocitos T y ha sido demostrada la importancia de su actividad en la proliferación de estas células (Gulbins, Sassi, Grassmè, Zoratti, & Szabò, 2010).

En la actualidad se conoce que Kv1.3 regula el potencial de membrana y cumple una función importante en la señalización de las células T efectoras de memoria (TEM). Debido a lo anterior, el canal Kv1.3 se le asocia a patologías mediadas por células T, como esclerosis múltiple (SM), diabetes mellitus y artritis reumatoide. Por ello, un inhibidor selectivo de Kv1.3 sería un potente supresor de la proliferación de células TEM, lo cual se ha convertido en un enfoque para la terapia de enfermedades autoinmunes mediadas por linfocitos T (Rudy et al., 2010; Wulff et al., 2003).

Entre las toxinas que se han encontrado capaces de bloquear selectivamente al canal Kv1.3 están MeuTXK α 1 y MeuTXK α 3 provenientes del veneno del escorpión *Mesobuthus eupeus* (Gao et al., 2010). Ya se han realizado estudios del bloqueo del canal empleando estas toxinas, tanto a nivel experimental como a nivel *in silico* (Velásquez, 2014; Zhu et al., 2011).

Este proyecto busca avanzar los resultados anteriores (Velásquez, 2014) y analizar sustituciones a nivel de aminoácidos en las toxinas MeuTXK α 1 y MeuTXK α 3 con el fin de encontrar mutantes que presenten mayor afinidad por el canal Kv1.3 comparados con la estructura nativa.

Los objetivos de este proyecto son encontrar estructuras 3-dimensionales estables de las toxinas modificadas y del complejo toxina-canal, luego, empleando *Steered Molecular Dynamics* (SMD) se midió la energía necesaria para desprender la toxina (modificada) del canal. Los anteriores resultados se compararon y analizaron con el fin de buscar las sustituciones de aminoácidos que fortalecieron la interacción de la toxina con el canal.

Para llevar a cabo lo mencionado, primero se escogieron los residuos de aminoácidos en la estructura primaria de las toxinas que ya habían sido reportados

como importantes para la interacción con el canal (Velásquez, 2014). Una vez escogidos, se modificaron por otros aminoácidos y se obtuvo la estructura 3-dimensional, energéticamente estable, de las toxinas mutadas. Después, se unieron dichas toxinas al canal hasta alcanzar la estructura que minimizó la energía del complejo toxina-canal. Posteriormente, se estudió cómo aquellas modificaciones afectaron el acoplamiento de los péptidos con el canal. Después, se empleó la técnica SMD para calcular la energía necesaria para separar las toxinas mutadas del canal.

Para entender los resultados de SMD, se analizaron las gráficas fuerza (requerida para la separación de la toxina del canal) en pN vs el *TimeStep* (ns), que es la separación entre cada uno de los instantes de tiempo discreto requeridos en la simulación; y finalmente se analizaron las trayectorias de separación de la toxina para observar cómo interactúan las toxinas modificadas con el canal Kv1.3.

Este proyecto presenta toxinas modificadas que pueden ser consideradas como candidatas por su potencial inmunosupresor en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, sin embargo, sería necesario realizar los estudios experimentales para comprobar su afinidad y selectividad por Kv1.3.

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Cuando el cuerpo es atacado por un patógeno desconocido la respuesta inmune es lenta. Una vez se crean mecanismos de defensa, si dicho patógeno infecta el cuerpo de nuevo la respuesta es rápida; esto se debe a la memoria inmunológica. Para este mecanismo, las células T efectoras de memoria (TEM) son esenciales, puesto que proveen protección frente a la exposición a un antígeno ya conocido y evitan la reproducción de este mismo, gracias a su capacidad efectora (Sallusto, Geginat, & Lanzavecchia, 2004).

En primera instancia, las células TEM deben ser protegidas porque nos proveen defensa frente a agentes infecciosos. No obstante, existen problemas como las enfermedades autoinmunes, en las el mismo cuerpo ataca a las células sanas. Este tipo de desórdenes ha generado gran controversia, ya que ha provocado el siguiente interrogante: ¿cómo proteger al cuerpo del ataque hacia sí mismo? Como respuesta, se ha demostrado que los canales de potasio dependientes de voltaje Kv1.3, localizados en la membrana celular y membrana interna mitocondrial de las células TEM del sistema inmune, se encuentran implicados en la señalización, función y proliferación de estas (Wulff et al., 2003). Por lo tanto, un bloqueador de este canal podría impedir la propagación de las células T y sería un potente inmunosupresor.

Lo anterior conlleva a preguntarse si los bloqueadores pueden ser selectivos para las células TEM y no alterar los canales de otras células. El responder esa duda ha provisto un enfoque para hallar bloqueadores selectivos hacia estos canales y que así se controle la multiplicación de células TEM. Con el fin de usarlos a modo de terapia para las enfermedades autoinmunes mediadas por linfocitos T como: la diabetes mellitus, la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple, entre otras. Durante las investigaciones de esta problemática, se han encontrado toxinas presentes en escorpiones, capaces de bloquear selectivamente los canales Kv1.3 con respecto a otros canales de potasio (Zhu et al., 2011). La selectividad es un parámetro sumamente importante, ya que si los bloqueadores son no selectivos hacia el canal Kv1.3, van a bloquear a otros canales de potasio de otras células que no están involucradas en las enfermedades autoinmunes y por lo tanto podrían afectar el funcionamiento de células sanas.

Para entender cómo se da el bloqueo del canal por las toxinas, se han realizado estudios tanto experimentales como simulaciones *in silico*. Un ejemplo de las toxinas que han demostrado bloquear este canal, son MeuTXK α 1 y MeuTXK α 3, encontradas en el veneno del escorpión *Mesobuthus eupeus* (Gao et al., 2010).

En consecuencia, el siguiente trabajo busca estudiar por medio de dinámica molecular, cómo sustituyendo algunos de los aminoácidos en la estructura primaria de cada toxina, puede alterarse el efecto de bloqueo al canal Kv1.3. El efecto del modificar los aminoácidos naturales de la toxina, es buscar mejorar la afinidad de éstas por el canal. Para ello se determinará la fuerza necesaria para desprender cada toxina modificada del canal.

Por todo lo ya mencionado, es importante el estudio de bloqueadores eficientes y el análisis de sus características, con el fin de mejorar sus propiedades para lograr diferentes maneras de combatir y controlar las enfermedades autoinmunes que se presentan en todo el mundo.

2.2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

2.2.1. Canales iónicos:

El movimiento de iones a través de canales conlleva a la señalización eléctrica en el sistema nervioso. Los iones más importantes son Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- ya que se ha encontrado que están involucrados en la mayoría de las acciones celulares (Hille, 2001). La transferencia de información entre células, a pesar de las largas distancias, se da rápidamente debido a que los impulsos eléctricos o potenciales de acción se producen en muchas células y se propagan a través de la membrana celular (Jiang et al., 2003).

El flujo y acción de estos iones, está mediado por canales iónicos que se encuentran en la membrana celular y son sensibles tanto a estímulos químicos como mecánicos. Estos canales convierten los mensajes químicos o mecánicos en señales eléctricas que son responsables de funciones celulares como el movimiento, metabolismo, diferenciación, reproducción, supervivencia y muerte. A nivel de la célula se encuentran diferentes gradientes de concentración, debidos a que la concentración de los iones en el citoplasma celular, es diferente a la que se encuentra en el exterior de la célula. Estos gradientes generan una diferencia potencial en la membrana celular que se encarga de la activación o desactivación de los canales, para permitir o bloquear la entrada de iones a la célula a través de la membrana (O'Connor & Adams, 2010).

2.2.2. Canales de potasio:

Existen canales iónicos individuales que son específicos para iones particulares, como los canales de potasio. La diferencia de concentración intra y extracelular de potasio en las células, provoca un gradiente electroquímico que permite la abertura

del canal para que se transporte el ion a favor del gradiente, es decir de mayor a menor concentración. Así, se genera el flujo del ion de un lado a otro, que produce una señal eléctrica que viaja rápidamente por toda la célula (O'Connor & Adams, 2010).

La apertura de los canales de potasio permite el flujo de iones K^+ a través de la membrana, generado una corriente que repolariza la membrana. Estos canales se encuentran normalmente en células excitables como células neuronales y musculares; y en células no excitables regulan la concentración de iones Ca^{2+} (O'Connor & Adams, 2010).

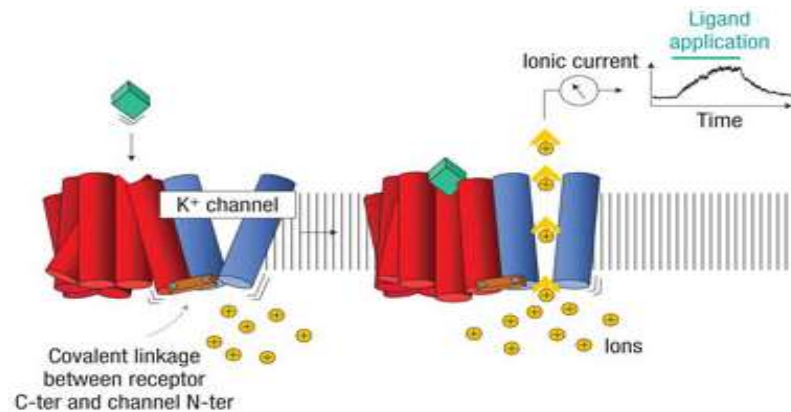


Figura 1. Representación de la activación de los canales de potasio (O'Connor & Adams, 2010).

En cuanto a su estructura, son tetrámeros y pueden interactuar con proteínas. Las subunidades de estos canales contienen seis dominios transmembrana que se conectan por medio de bucles, la secuencia peptídica de los bucles es altamente conservada. Un dominio importante es el S4, éste contiene residuos cargados positivamente que abren o cierran el poro en respuesta al potencial (Rudy et al., 2010).

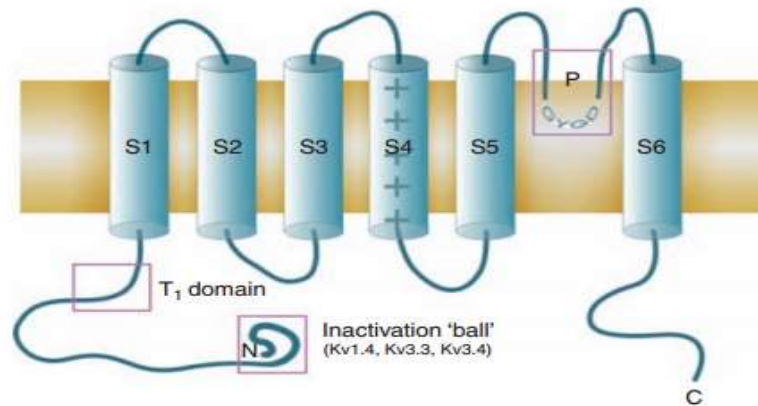


Figura 2. Representación esquemática de las subunidades de un canal de potasio (Rudy et al., 2010).

En especial, los canales de potasio dependientes de voltaje Kv1.3 son el interés principal de este proyecto, ya que se ha encontrado que se localizan en la membrana celular de los linfocitos T y tienen funciones como regular la excitabilidad de las neuronas. También se encuentran en la membrana interna mitocondrial de los linfocitos T y se ha confirmado que su presencia y activación es vital para la proliferación de estas células (Gulbins et al., 2010).

Actualmente se conoce que el canal de potasio dependiente de voltaje Kv1.3 tiene la función de regular el potencial de la membrana y la señalización de las células T efectoras de memoria (TEM). Además, son mediadores de la activación de los linfocitos T por lo cual se le asocia a patologías mediadas por células T, como esclerosis múltiple (SM), diabetes mellitus y artritis reumatoide. De esta manera, un inhibidor selectivo de Kv1.3 sería un potente supresor de la proliferación de células TEM. Lo cual, se ha convertido en un enfoque para la terapia de enfermedades autoinmunes mediadas por linfocitos T (Rudy et al., 2010; Wulff et al., 2003)

2.2.3. Péptidos bloqueadores de Kv1.3

Los escorpiones han ganado importancia a nivel biomédico, gracias a que sus venenos presentan compuestos biológicamente activos como toxinas y péptidos que reconocen canales iónicos (Possani, Becerril, Delepierre, & Tytgat, 1999). Por ello, se han estudiado venenos de diferentes especies de escorpiones y se ha encontrado un gran número de toxinas que afectan los canales de potasio. A estas se les ha llamado toxinas "KTxs" y se han propuesto como potenciales candidatas para tratamientos farmacológicos (Zhu et al., 2011).

Existen diferentes grupos de toxinas KTxs, estos pueden ser α , β , γ y κ ; que difieren entre sí en la longitud de las cadenas peptídicas y en motivos estructurales. Por

ejemplo, en el proyecto se trabajará con toxinas del grupo α , las cuales contienen un motivo hélice α /lámina β conservado y son péptidos formados por 23 a 42 aminoácidos que se enlazan por medio de 3 o 4 puentes disulfuro (Zhu et al., 2011). La acción bloqueadora de este grupo de toxinas, es atribuida a una diada funcional, compuesta por una lisina separada aproximadamente 6.6 Å de un aminoácido aromático, como fenilalanina o tirosina, en ocasiones una treonina. El grupo amonio positivo de la lisina puede ser confundido por el poro como si fuera un ion K^+ , provocando la obstrucción en la entrada y el bloqueo del flujo de iones K^+ (Dauplais et al., 1997).

Las toxinas de interés para el proyecto son MeuTXK α 1 y MeuTXK α 3, provenientes del veneno del escorpión *Mesobuthus eupeus*. En el caso de MeuTXK α 1, la cual es una toxina con 29 residuos de aminoácidos, es conocido que presenta propiedades que la hacen una candidata con potencial terapéutico, debido a su alta afinidad por el Kv1.3. Para analizar esta toxina, se han realizado estudios experimentales del bloqueo y la selectividad de este péptido hacia varios canales de potasio como rKv1.1, rKv1.2, rKv1.3, Kv1.3, rKv1.3, rKv1.3, rKv1.5, *Shaker* IR y hERG. Se encontró que a una concentración 3 μ M, esta toxina logró inhibir el flujo de iones K^+ en Kv1.3 en un 100%. En contraste, inhibió en un 35 y 70% a los canales rKv1.1 y *Shaker* IR, y no afectó a los otros canales estudiados. Además, demostró impedir la proliferación de células T (Zhu et al., 2011).

En los estudios *in silico* de MeuTXK α 1 se han identificado residuos importantes para su interacción con Kv1.3, algunos de estos son la Val¹ y Pro²⁸ que se acercan a la Val⁴⁰⁶ ubicada en el filtro del canal y la Lys¹⁸ que interactúa con un residuo de ácido aspártico situado en el filtro del canal (Velásquez, 2014).

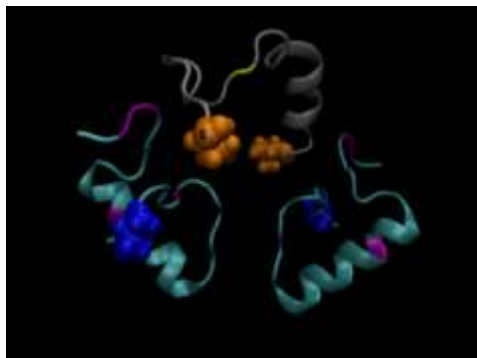


Figura 3. Complejo MeuTXK α 1 con Kv1.3. Los residuos naranjas corresponden a Val¹ y Pro²⁸ que se acercan a las Val⁴⁰⁶ (esferas azules) del filtro del canal. El residuo amarillo es Lys¹⁸ que interactúa con el aspartato (color morado) ubicado en el filtro del canal (Velásquez, 2014).

En cuanto a MeuTXK α 3, el estudio de su estructura evidencia su posible función bloqueadora debida a su superficie con alta carga positiva, compuesta por residuos de lisina y arginina, y contiene tres diadas funcionales compuestas por Lys⁹-Thr¹⁸,

Lys²⁰-Phe²⁹ y Lys²⁷-Phe³⁶ (Zhu, y otros, 2011). Como se observa en la figura 3, los residuos de color azul son residuos básicos o cargados positivamente.

	Mature Peptide	Size	NC
MeuTXKα1	-----VSC---EDCPEHCATKD--QRAKCDND-KCVCEPK--	29	-2.0
MeuTXKα2	-----VSC---EDCPEHCATKD--QRAKCDND-KCVCEPK--	29	-2.0
MeuTXKα3	-----VDFPNKGGKC--DRKECRKTCCKLN--YRGKCFPN-YCRCFPG--	37	7.7
MeuTXKα4	-----QYCCYTC---IPDCSKSCQDSG-LRFKACIPYRSCLCQY---	35	1.7

Figura 4. Alineamiento de las secuencias de las toxinas MeuTXKα1-4 (Zhu et al, 2011).

En estudios con dinámica molecular del acoplamiento de esta toxina con Kv1.3, se observó que algunos residuos como Val¹, Phe³⁶, Arg³⁴, Arg²⁵, Arg¹², Arg¹⁶, Lys⁹ y Lys²⁷ son importantes en la interacción con el canal (Velásquez, 2014). Tanto estos residuos como los ya mencionados de MeuTXKα1 son el blanco para las modificaciones a realizar en este proyecto, debido a que se espera que al cambiarlos, se afecte la unión al canal.

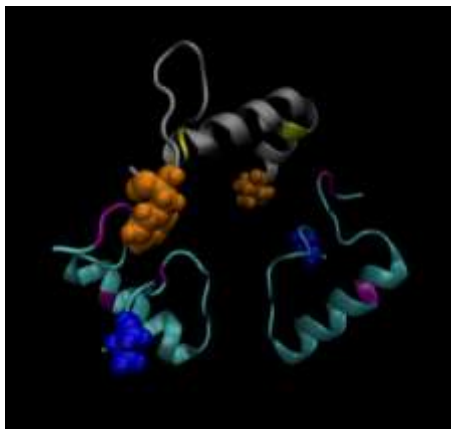


Figura 5. Complejo MeuTXKα3 con Kv1.3. Los residuos naranjas corresponden a Val¹ y Phe³⁶ que se acercan a las Val⁴⁰⁶ (esferas azules) del filtro del canal. El residuo amarillo es Lys¹⁸ que interactúa con el aspartato (color morado) ubicado en el filtro del canal (Velásquez, 2014).

Como ya se ha mencionado, la descripción del bloqueo hacia el canal Kv1.3 por estas dos toxinas se ha obtenido tanto experimentalmente como *in silico*. Lo que se hará en este proyecto es realizar sustituciones de un aminoácido por otros aminoácidos naturales, en la estructura primaria de ambas toxinas y analizar los efectos que dichos cambios crean en la conformación del péptido y cómo se ve afectado el acoplamiento con el canal. Este interés surgió a partir, de evidenciar que en previos estudios se observó que la toxina BmP01 del veneno del escorpión *Mesobuthus martensii* y MeuTXKα1, tienen una secuencia de aminoácidos muy

similar. Sin embargo, las diferencias que presenta MeuTXK α 1 la hacen tener mejores propiedades de bloqueo, selectividad e inhibición de la proliferación de células T (Zhu et al., 2011). Con base en estas observaciones, las modificaciones dirigidas en estos péptidos pueden llevar a mejores candidatos para fármacos que bloqueen los canales de potasio.

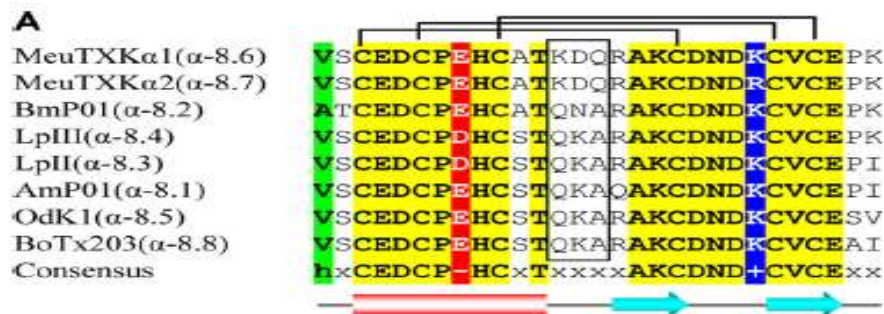


Figura 6. Alineamiento de secuencias de toxinas KTxs de la subfamilia 8 (Zhu et al., 2011).

2.2.4. Enlaces importantes para la interacción entre biomoléculas.

Los sistemas que se estudiarán en este proyecto serán el canal de potasio Kv1.3 y mutantes de las toxinas MeuTXK α 1 y MeuTXK α 3. Como ya se mencionó, estas toxinas son capaces de bloquear el canal debido a que presentan residuos que interactúan fuertemente con sitios específicos del canal.

Es importante mencionar que los átomos de las biomoléculas interactúan entre sí por medio de enlaces químicos. Estos enlaces pueden ser covalentes o no covalentes, ambos son vitales para la estructura de las biomoléculas y su dinámica con el entorno que las rodea (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2009).

Los enlaces covalentes, son los más fuertes y se caracterizan por mantener unidos los átomos del esqueleto de las proteínas y los átomos de las bases nitrogenadas de la estructura del ADN. En este enlace, se comparten electrones entre átomos adyacentes, un ejemplo es el enlace entre carbono – carbono (C-C) con una longitud de 1.54 Å. También dos átomos pueden compartir más de un par de electrones y así formar un enlace covalente múltiple, como lo es el enlace doble carbono – oxígeno (C=O) o carbono – carbono (C=C) con distancias más cortas que las del enlace sencillo. El esqueleto carbonado de las proteínas, está compuesto por enlaces sencillos carbono-carbono, carbono-nitrógeno y enlaces dobles entre carbono – oxígeno (Berg et al., 2009).

Adicionalmente, existen enlaces no covalentes los cuales son esenciales para los procesos dinámicos de la vida. Hay cuatro tipos importantes en la estructura

proteica y su interacción con otras moléculas: interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals e interacciones hidrofóbicas. Las interacciones electrostáticas, se dan entre un grupo cargado de una molécula que atrae a otro grupo con carga opuesta de otra molécula (Berg et al., 2009), esta fuerza atractiva depende de la carga, la distancia entre los átomos y la constante dieléctrica del medio. Cuando la constante dieléctrica es muy grande, como la del agua, la fuerza atractiva es menor. A estas interacciones también se les conoce como enlaces iónicos, pares iónicos y puentes salinos; la distancia entre átomos para la formación de puentes salinos es aproximadamente 2.8 Å (Copeland, 2000).

En los enlaces de hidrógeno, un átomo de hidrógeno está parcialmente compartido entre dos átomos muy electronegativos como el oxígeno y el nitrógeno, el donador del enlace es el átomo que está más unido al hidrógeno y el aceptor es el átomo menos unido. La distancia entre el hidrógeno y el aceptor varía entre 1.5 a 2.6 Å. Este enlace tiene un carácter sumamente direccional, ya que el átomo dador, el hidrógeno y el átomo aceptor están alineados (Berg et al., 2009). Gracias a este enlace se deben las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas, así como su interacción con el agua y otras biomoléculas.

Las interacciones hidrofóbicas se dan cuando moléculas no polares están en un medio acuoso (polar), por ejemplo los aminoácidos con cadenas laterales no polares suelen encontrarse en lugares internos de la proteína donde no haya casi contacto con el agua e interactúan con las cadenas de otros aminoácidos no polares (Copeland, 2000).

Las interacciones de van der Waals se deben a que la distribución de los electrones alrededor los átomos no es estacionaria, se dan fluctuaciones que generan momentos de dipolo temporales que pueden a su vez inducir dipolos sobre moléculas vecinas. Los dipolos inducidos interactúan entre si permitiendo la formación de complejos moleculares que van desde simples dímeros hasta cientos de átomos. Estas interacciones son mucho más débiles que las presentes en los puentes salinos o en los enlaces de hidrógeno. No obstante, un gran número de interacciones de van der Waals pueden estabilizar una interacción entre dos proteínas o una proteína y un ligando (Copeland, 2000).

2.2.5. Herramientas computacionales

Finalmente, cabe mencionar que hace algunos años se vienen estudiando diferentes maneras de obtener predicciones utilizando herramientas computacionales. El auge de estos estudios se debe a que cada vez el acceso a mayor poder de cómputo es más fácil, lo cual permite realizar cálculos que antes eran muy difíciles de hacer por las limitaciones de memoria y velocidad de los computadores de hace unas décadas.

Los estudios *in silico* a sistemas biológicos incluyen emplear dinámica molecular para: determinar la configuración espacial de moléculas, evaluar la dinámica y el equilibrio termodinámico, entre otros. Estos estudios han permitido conocer a nivel atómico movimientos internos de biomoléculas. Los avances teóricos y computacionales permitirán ampliar el alcance de la dinámica molecular (DM) a sistemas cada vez más grandes y complejos (Karplus & McCammon, 2002).

Las simulaciones computacionales de la DM dan como resultados la dinámica de todos los átomos de una molécula de interés biológico. Esta información puede utilizarse para predecir las propiedades de sistemas conformados por macromoléculas biológicas. Es importante resaltar que estos modelos se basan en los resultados experimentales como difracción de rayos X, secuencias peptídicas, entre otros. Los resultados de las simulaciones DM deben ser validados con los datos obtenidos experimentalmente (Karplus & McCammon, 2002).

Durante el análisis del bloqueo de las toxinas modificadas al canal Kv1.3, se utilizarán herramientas y cálculos computacionales que buscan imitar el comportamiento de sistemas moleculares, para poder predecir y entender cómo funcionan.

Para los cálculos computacionales que se realizarán se necesita el software NAMD el cual está diseñado para la simulación, con altos rendimientos de sistemas biomoleculares. Este trabaja con cientos de procesadores para realizar los cálculos de manera eficiente y utiliza al programa VMD como visualizador gráfico de los resultados (Phillips et al., 2005).

La herramienta VMD (*Visual Molecular Dynamics*) es un programa gráfico diseñado para la visualización y análisis de moléculas biológicas, además, su interfaz gráfica interactiva permite analizar desde una molécula pequeña hasta sistemas biológicos más complejos (Humphrey, Dalke, & Schulten, 1996) como lo son las toxinas MeuTXK α 1, MeuTXK α 3 y el canal iónico Kv1.3. Igualmente, es un programa capaz de realizar cálculos de trayectorias dinámicas y presenta varios paquetes de simulación dinámica molecular que se acomodan a diferentes necesidades. Por ejemplo, hay un *plugin* especial para el manejo y visualización de las propiedades de los canales iónicos (Kaats, Nadeau, & Dang'ana, 2009), lo cual hace que VMD sea una herramienta indispensable para el proyecto.

También, se empleará una técnica conocida como *Steered Molecular Dynamics* (SMD) para calcular la energía necesaria para desprender las toxinas modificadas del canal de potasio. Esta técnica acelera los cambios conformacionales en biomoléculas por medio de la aplicación de fuerzas externas (Dynamics, 2005). En SMD se aplican fuerzas a una parte del sistema, que en este caso es la toxina, con el fin de dirigirla lejos del canal en una dirección predeterminada. Los resultados que se obtienen por este medio, sirven para dar descripción cualitativa del comportamiento del sistema (Gumbart, 2011). Se utilizará SMD ya que ha sido una

técnica empleada en varias investigaciones para estudiar la separación de biomoléculas (Guan, Han, Zhang, Wang, & Shan, 2015). Por ejemplo, en la interacción de anticuerpo llamado monocuerpo YS1 y su ligando MBP (maltose – binding protein), se estudió como dos mutaciones en YS1 desestabilizaron la unión YS1 – MBP (Cheung et al., 2015).

2.3. OBJETIVOS

2.3.1. Objetivo general

Identificar, por medio de simulaciones computacionales, mutantes de las toxinas MeuTXK α 1 y MeuTXK α 3 que alteren el efecto de bloqueo al canal de potasio dependiente de voltaje Kv1.3, empleando la técnica *Steered Molecular Dynamics*.

2.3.2. Objetivos específicos

Encontrar las estructuras 3-dimensionales de mínima energía, de las toxinas modificadas, empleando VMD/NAMD y dinámica molecular.

Simular el proceso de separación de los complejos toxina-canal por medio de la técnica *Steered Molecular Dynamics*.

Identificar las toxinas modificadas que bloqueen con mayor fuerza al canal, con respecto a las toxinas no mutadas.

2.4. METODOLOGÍA

2.4.1. Matriz de marco lógico

Objetivo General

Identificar por medio de simulaciones computacionales mutantes de las toxinas MeuTXK α 1 y MeuTXK α 3, que alteren el efecto de bloqueo al canal de potasio dependiente de voltaje Kv1.3, empleando la técnica *Steered Molecular Dynamics*.

Supuesto general: el computador debe estar en funcionamiento continuo mientras corren las simulaciones, no puede apagarse.

Objetivos Específicos	Actividades	Indicadores	Supuestos
<p>Objetivo específico 1: Encontrar las estructuras 3-dimensionales de las toxinas mutadas de mínima energía, empleando VMD/NAMD y dinámica molecular.</p>	<p>1. Revisión bibliográfica</p> <p>2. Obtener las secuencias peptídicas de las toxinas MeuTXKα1 y MeuTXKα3 del pdb.</p> <p>3. Modificar residuos por los otros aminoácidos, en la estructura primaria de la toxina MeuTXKα1. Modificar residuos por los otros aminoácidos, en la estructura primaria de la toxina MeuTXKα3.</p> <p>4. Obtener la configuración de menor energía de las toxinas modificadas.</p> <p>5. Generar los archivos .pdb de cada toxina modificada.</p> <p>6. Identificar las modificaciones que no alteren el acoplamiento con el canal.</p>	<p>Obtención de la configuración de mínima energía libre de las toxinas modificadas.</p>	<p>Se parte de una estructura que no se encuentra en equilibrio.</p>
<p>Objetivo específico 2: Simular el proceso de separación de los complejos</p>	<p>7. Escoger las toxinas mutadas más estables para simular el acoplamiento.</p>	<p>Energía necesaria para separar las toxinas mutadas de</p>	<p>Las toxinas mutadas deben bloquear el</p>

toxina-canal por medio de la técnica <i>Steered Molecular Dynamics</i> .	8. Optimizar los complejos toxina-canal.	menor energía libre, del complejo toxina-canal.	poro del canal Kv1.3. Cada modificación debe requerir una energía diferente.
	9. Emplear SMD para obtener la energía necesaria para separar cada toxina del complejo toxina canal en vacío.		
	10. Emplear SMD para obtener la energía necesaria para separar algunas toxinas del complejo toxina canal en solvente.		
Objetivo específico 3: Identificar las toxinas modificadas que bloqueen con mayor fuerza al canal, con respecto a las toxinas no mutadas.	11. Una vez obtenidas las energías, compararlas para obtener la o las toxinas modificadas que serían un buen candidato con posible uso en tratamientos farmacológicos de enfermedades autoinmunes.	Toxinas modificadas que necesitaron mayor energía para ser separadas del complejo toxina-canal.	Debe encontrarse al menos una toxina que necesite más energía para ser desprendida del canal, con respecto a las <i>wild-type</i> .
	12. Terminar el documento escrito.		

2.4.2. Modelamiento del canal Kv1.3.

Las partes de interés del canal son la turreta (bucles en la parte superior del poro), el poro (hélices- α) y el filtro (bucles desde la parte inferior a la superior) como se observa en la Figura 7, puesto que son los sitios de interacción con la toxina. Para ello, se trabajó con la estructura obtenida por Velásquez (Velásquez, 2014).

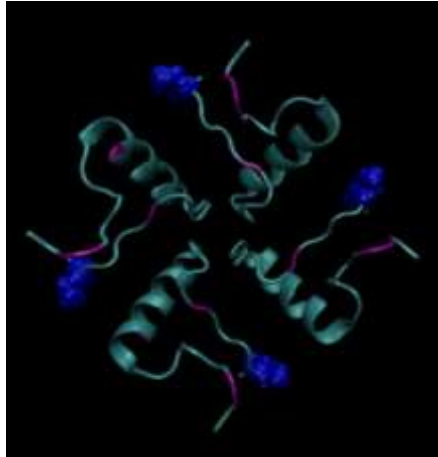


Figura 7. Canal Kv1.3, turreta, poro y filtro (Velásquez, 2014).

2.4.3. Modificación y modelamiento 3-dimensional de las toxinas.

Para realizar las modificaciones en las estructuras primarias de las toxinas, se partió de la estructura obtenida por Velásquez y se realizaron los cambios en el archivo .pdb, por medio de un editor de texto, para cada toxina. Los residuos seleccionados para hacer la mutación fueron residuos que previamente se identificaron como aminoácidos importantes para la interacción de la toxina con el canal. Con el fin de disminuir la cantidad de toxinas modificadas, los cambios realizados se hicieron solo por residuos listados (presentes) en la estructura primaria de cada toxina.

En el caso de MeuTXK α 1 se modificaron 3 residuos: Val¹, Lys¹⁸ y Pro²⁸. La valina se modificó por prolina, alanina, glicina, aspartato y lisina. La lisina 18 se modificó por arginina e histidina. La prolina 28 se cambió por valina, alanina, histidina, treonina y aspartato. Lo anterior dio un total de 50 modificaciones posibles.

Para MeuTXK α 3 se modificaron 4 residuos: Val¹, Asp², Arg³⁴ y Phe³⁶. La valina fue mutada por prolina, leucina, fenilalanina, glicina, aspartato y lisina. El aspartato se modificó por glutamato. La arginina se mutó por lisina. Por último, el residuo de fenilalanina fue modificado por prolina, valina, leucina, glutamato, arginina y tirosina. De acuerdo a esto, se obtuvieron 36 combinaciones posibles, por tanto un total de 36 modificaciones realizadas.

Una vez realizados las modificaciones en el editor de texto, se abrió VMD para crear los nuevos archivos .psf y .pdb a partir de la herramienta *automatic PSF builder*, que se encuentra en la pestaña de *Extensions* → *Modeling* → *Automatic PSF builder*.

Con dichos archivos se procedió a optimizar la estructura 3-dimensional de las toxinas mutadas. En lo anterior, se necesitó el archivo de parámetros `par_all27_prot_lipid_na.inp`, que contiene información acerca de los átomos presentes en los aminoácidos de las proteínas, este archivo se puede encontrar en: http://www.ks.uiuc.edu/Training/Tutorials/namd/namd-tutorial-files/common/par_all27_prot_lipid.inp; y el archivo `.conf` en el cual están los comandos necesarios para realizar la optimización. El archivo `.conf` usado se creó basado en las instrucciones dadas por (Physics, 2005). Esta minimización produjo un archivo `.log` que contiene la energía inicial y final de la estructura, estos datos se encuentran en la sección de resultados en las tablas 1 y 2. Además, a partir del archivo `.coor` obtenido en la minimización, se puede visualizar en VMD para generar los archivos `.pdb` y `.psf` a partir de la herramienta *Automatic PSF Builder*, así se obtuvo la estructura 3-dimensional minimizada de 86 toxinas: 50 y 36 para MeuTXK α 1 y MeuTXK α 3, respectivamente.

2.4.4. Modelamiento del bloqueo del canal Kv1.3 por las toxinas modificadas

Se utilizaron solo dos de las cuatro subunidades idénticas del tetrámero de Kv1.3, ilustradas en la figura 8, las cadenas A y C que se encuentran una enfrente de la otra, con el fin de disminuir el tiempo de cálculo. Para ello, primero se concatenaron los archivos `.pdb` del canal obtenidos por Velázquez y los de cada toxina modificada minimizada obtenidas en el paso anterior, esto se hizo por medio del editor de texto.

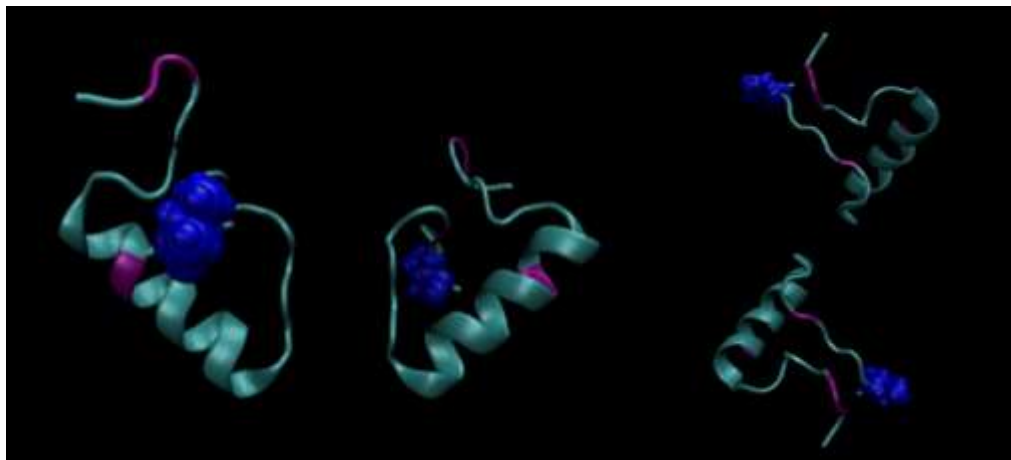


Figura 8. Cadenas A y C del canal Kv1.3. Valina 406, esferas azul oscuro; aspartato, fragmentos púrpura (Velázquez, 2014).

Una vez obtenidos los archivos `.pdb` del canal y la toxina modificada, se visualizó en el programa VMD y luego se ubicó la toxina cerca de la turreta del canal.

Después, se guardaron las coordenadas resultantes en un archivo .pdb que corresponde al complejo canal-toxina. Por último, se minimizó el complejo usando un archivo .conf para obtener la configuración de menor energía libre. Lo anterior, se realizó en vacío y utilizando agua como solvente con el fin de obtener resultados más aproximados al comportamiento biológico.

Para realizar la minimización el solvente, se ubicó el complejo en una esfera de agua siguiendo las instrucciones planteadas por (Isgro, Phillips, Sotomayor, & Villa, 2010), para ello se usó el script `wat_sphere.tcl`, disponible en: <http://www.ks.uiuc.edu/Training/Tutorials/namd/namd-tutorial-files/1-1-build/>. El script produce las coordenadas del centro de la esfera de agua y el radio de esta, estos datos se introdujeron en el archivo .conf y se procedió a realizar la minimización. Finalmente, a partir de los archivos .log se tabuló la energía antes y después de la minimización, tanto en vacío como en solvente, esto se puede ver en las tablas 3 y 4.

2.4.5. Separación de los complejos canal-toxina

Se empleó la técnica *Steered Molecular Dynamics* (SMD) con el fin de obtener la energía necesaria para separar cada toxina del canal. Para ello, se siguió la metodología empleada por Velásquez. Los archivos necesarios para esta dinámica fueron `rest06.ref`, `smd01.ref` y `smd.conf`, para obtenerlos se siguieron las instrucciones sugeridas por (Gumbart, 2011).

Lo anterior da como resultado un archivo .log, el cual contiene la información del *TimeStep* (ns), posición del canal (Å), fuerza (pN) y energía (Kcal/mol). A partir de estos datos se calculó la energía necesaria para desprender la toxina del canal, por medio de la integración de la fuerza por velocidad (posición de la toxina / tiempo) por el cambio en el tiempo, lo cual da como resultado el trabajo acumulado necesario para desprender la toxina del canal.

Con los complejos que necesitaron mayor energía que las toxinas *wild-type*, se procedió a graficar la fuerza vs el *TimeStep*. Estas gráficas presentan la fuerza como función del tiempo, donde se aprecian picos de alta o baja intensidad en determinados momentos. De esta manera, a cada pico se le asignó la separación de los residuos de la toxina con los del canal. Para ello, se visualizó el archivo .dcd obtenido después de hacer SMD y el archivo .psf, con ellos se pudo crear un video que muestra la separación de la toxina para cada *TimeStep*. Analizando este video, se pudo asignar a los picos más relevantes la separación de los aminoácidos como se presenta en las gráficas 3, 4, 5 y 6.

El procedimiento anterior se realizó para los 4 complejos que necesitaron mayor energía para desprenderse del canal y para los 2 que requirieron la menor energía, comparados con los complejos en los que no se alteraron los residuos de las toxinas. Para MeuTXK α 1 se analizaron los complejos 5, 45, 43, 20, 49 y 38; y para MeuTXK α 3 se analizaron 30, 6, 27, 26, 20 y 23.

También se realizó SMD usando agua como solvente para los complejos de las toxinas nativas y para los complejos 5, 45, 43, 20 de MeuTXK α 1 y los complejos 30, 6, 27 y 26 de MeuTXK α 3.

2.5. RESULTADOS

2.5.1. Modificación y modelamiento 3-dimensional de las toxinas.

A partir de la información registrada en los archivo .log obtenidos durante la minimización de las toxinas, se extrajo la energía antes (inicial) y después (final) de la optimización de la estructura 3-dimensional de las modificaciones realizadas en la estructura primaria de MeuTXK α 1, lo cual se resume en la tabla 1. En esta tabla también se muestran las modificaciones realizadas en las posiciones 1, 18 y 28 de la toxina, para dar un total de 50 combinaciones posibles, es decir 50 mutantes. En dicha tabla también se puede observar que la energía final de todas las mutantes fue negativa.

La energía final de la minimización de MeuTXK α 1 fue -808 kcal/mol, de esta manera se puede evidenciar en la tabla 1 que hubo mutaciones con energía menor a esta, es decir, que resultaron en una toxina más estable que la *wild-type*.

Tabla 1. Energía inicial y final de las toxinas modificadas de MeuTXK α 1.

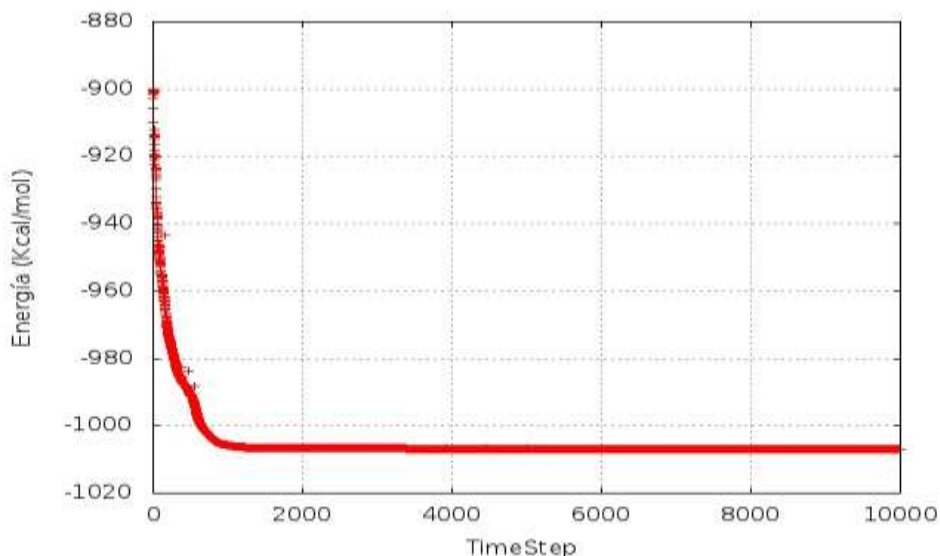
POSICIÓN	1	18	28		
RESIDUO	VAL	LYS	PRO		
MUTACIÓN				ENERGÍA INICIAL*	ENERGÍA FINAL*
1	PRO	ARG	VAL	-900	-1007
2	ALA	ARG	VAL	-937	-1030
3	GLY	ARG	VAL	-944	-1036
4	ASP	ARG	VAL	-581	-1090
5	LYS	ARG	VAL	-907	-1062
6	PRO	HSD	VAL	5589	-770

7	ALA	HSD	VAL	5552	-793
8	GLY	HSD	VAL	5546	-799
9	ASP	HSD	VAL	5908	-853
10	LYS	HSD	VAL	5583	-823
11	PRO	ARG	ALA	-894	-1006
12	ALA	ARG	ALA	-931	-1029
13	GLY	ARG	ALA	-938	-1035
14	ASP	ARG	ALA	-575	-1089
15	LYS	ARG	ALA	-901	-1107
16	PRO	HSD	ALA	5595	-769
17	ALA	HSD	ALA	5558	-792
18	GLY	HSD	ALA	5618	-923
19	ASP	HSD	ALA	5914	-852
20	LYS	HSD	ALA	5589	-822
21	PRO	ARG	HSD	1763	-1023
22	ALA	ARG	HSD	1725	-1046
23	GLY	ARG	HSD	1719	-1053
24	ASP	ARG	HSD	2081	-1103
25	LYS	ARG	HSD	1756	-1125
26	PRO	HSD	HSD	8252	-782
27	ALA	HSD	HSD	8215	-805
28	GLY	HSD	HSD	8208	-811
29	ASP	HSD	HSD	8571	-865
30	LYS	HSD	HSD	8245	-835
31	PRO	ARG	THR	1749	-1025
32	ALA	ARG	THR	1712	-1048
33	GLY	ARG	THR	1705	-1055
34	ASP	ARG	THR	2068	-1109
35	LYS	ARG	THR	1742	-1080
36	PRO	HSD	THR	8238	-789
37	ALA	HSD	THR	8201	-811
38	GLY	HSD	THR	8194	-818
39	ASP	HSD	THR	8557	-871
40	LYS	HSD	THR	8232	-842
41	PRO	ARG	ASP	-718	-1045
42	ALA	ARG	ASP	-755	-1068
43	GLY	ARG	ASP	-761	-1074
44	ASP	ARG	ASP	-399	-1128
45	LYS	ARG	ASP	-724	-1099

46	PRO	HSD	ASP	5772	-807
47	ALA	HSD	ASP	5734	-830
48	GLY	HSD	ASP	5728	-836
49	ASP	HSD	ASP	6090	-890
50	LYS	HSD	ASP	5765	-861

*Las energías se expresan en kcal/mol.

Al graficar la energía de las toxinas en función del *TimeStep* para todas se obtuvo una gráfica muy similar a la gráfica 1, en todas se notó que aproximadamente a partir del paso 2000 la energía varía muy poco, lo cual indica que la estructura alcanzada es termodinámicamente estable.



Gráfica 1. Gráfica de energía en función del *TimeStep* durante el proceso de minimización de la toxina modificada 1.

De igual manera, en la tabla 2 se presenta la energía inicial y final durante la minimización; y las modificaciones realizadas a la estructura de MeuTXK α 3 que fueron 36 en total. En esta se puede observar que para las mutantes 1 a 6 y 25 a 30 la energía final es positiva o desfavorable, en ellos hubo un cambio en la posición 36 que naturalmente es una fenilalanina por prolina para las mutantes 1 a 6 y arginina para las 25 a 30, lo cual puede indicar que el cambio de Phe por Pro no fue favorable para la estructura de la toxina y por tanto resultó en una estructura menos estable.

La energía final de la minimización de MeuTXK α 3 fue -11587 kcal/mol, de esta manera se puede evidenciar en la tabla 2 que aunque la mayoría de las toxinas obtenidas tuvo una energía favorable, ninguna tuvo una energía menor a la *wild-*

type. Lo anterior indica que si se desea encontrar una mutación más estable que la toxina natural, deben realizarse otras modificaciones.

Igual que para MeuTXK α 1, se graficó en gnuplot la energía de las toxinas en función del *TimeStep*, la gráfica para todas las toxinas fue muy similar a la gráfica 1 y para todas se observa que se alcanza un equilibrio.

Tabla 2. Energía inicial y final de las toxinas modificadas de MeuTXK α 3.

POSICIÓN	1	2	34	36		
RESIDUO	VAL	ASP	ARG	PHE		
MUTANTE					ENERGÍA INICIAL*	ENERGÍA FINAL*
1	PRO	GLU	LYS	PRO	10305	8239
2	LEU	GLU	LYS	PRO	10297	8231
3	PHE	GLU	LYS	PRO	10287	8228
4	GLY	GLU	LYS	PRO	10270	8211
5	ASP	GLU	LYS	PRO	10193	8134
6	LYS	GLU	LYS	PRO	10304	8245
7	PRO	GLU	LYS	VAL	-805	-955
8	LEU	GLU	LYS	VAL	-813	-987
9	PHE	GLU	LYS	VAL	-823	-973
10	GLY	GLU	LYS	VAL	-840	-991
11	ASP	GLU	LYS	VAL	-917	-1072
12	LYS	GLU	LYS	VAL	-806	-953
13	PRO	GLU	LYS	LEU	-633	-965
14	LEU	GLU	LYS	LEU	-641	-998
15	PHE	GLU	LYS	LEU	-651	-983
16	GLY	GLU	LYS	LEU	-668	-1000
17	ASP	GLU	LYS	LEU	-745	-1075
18	LYS	GLU	LYS	LEU	-827	-1004
19	PRO	GLU	LYS	GLU	-818	-969
20	LEU	GLU	LYS	GLU	-827	-1004
21	PHE	GLU	LYS	GLU	-836	-987
22	GLY	GLU	LYS	GLU	-854	-1001
23	ASP	GLU	LYS	GLU	-930	-1080
24	LYS	GLU	LYS	GLU	-820	-965
25	PRO	GLU	LYS	ARG	694	584

26	LEU	GLU	LYS	ARG	685	577
27	PHE	GLU	LYS	ARG	675	571
28	GLY	GLU	LYS	ARG	658	554
29	ASP	GLU	LYS	ARG	582	477
30	LYS	GLU	LYS	ARG	692	588
31	PRO	GLU	LYS	TYR	-807	-955
32	LEU	GLU	LYS	TYR	-815	-988
33	PHE	GLU	LYS	TYR	-825	-973
34	GLY	GLU	LYS	TYR	-842	-987
35	ASP	GLU	LYS	TYR	-919	-1068
36	LYS	GLU	LYS	TYR	-808	-954

*Las energías se expresan en kcal/mol.

2.5.2. Modelamiento del bloqueo del canal Kv1.3 por las toxinas modificadas

Una vez ubicada la toxina cerca de la turreta y el filtro del canal, luego de minimizar dicha estructura y organizando la información presente en los archivos .log se tabuló la energía inicial y final de los complejos tanto en vacío como utilizando agua como solvente. En la tabla 3 se encuentran los resultados para las mutaciones de MeuTXK α 1 y en la tabla 4 las de MeuTXK α 3. En todas las variaciones se pudo observar que la energía final de los complejos tanto en vacío como en agua fue favorable. Se puede destacar que todos los complejos de las toxinas modificadas de MeuTXK α 1, resultaron en una energía menor en comparación con el complejo nativo.

En cuanto al trabajo o la energía necesaria para separar la toxina del canal, se observa que los complejos 5, 45, 43, 20 y 21 requirieron mayor energía que el complejo MeuTXK α 1 – canal; y los complejos que necesitaron la menor energía entre todos los complejos fueron el 38 y el 49.

Tabla 3. Energía inicial y final de los complejos en vacío y en solvente toxina – canal para las mutantes de MeuTXK α 1 y energía necesaria para desprender la toxina del canal (trabajo).

Complejo Toxina – canal en vacío	Energía inicial ^a	Energía final ^a	Trabajo ^b	Complejo solvatado Toxina - canal	Energía inicial ^a	Energía final ^a
MeuTXKα1	65944	-893	44611	MeuTXKα1	48222	-33883
1	-256	-1126	24347	1	-19077	-35609
2	1401	-1153	34505	2	-17314	-35686
3	29285	-1153	33512	3	11182	-34414

4	26963805	-1184	19529	4	26945428	-35215
5	23917	-1310	60864	5	6361	-33787
6	25600	-893	18912	6	8102	-33279
7	145973	-904	4213	7	128025	-33966
8	1480797555	-905	26789	8	1480779266	-34259
9	508316984	-956	12986	9	508299312	-33528
10	10000000000	-1026	42530	10	10000000000	-32830
11	4157005	-1150	18683	11	4139169	-34076
12	-787	-1107	34676	12	-18332	-33892
13	62596	-1129	24301	13	44746	-34511
14	10000000000	-1188	21577	14	10000000000	-34975
15	26822740	-1199	43825	15	26805296	-33610
16	18002687	-893	23372	16	17985029	-33857
17	724164	-891	12052	17	707455	-32241
18	227386	-962	10368	18	74268	-34513
19	7706950	-970	4574	19	7689025	-34151
20	676108652	-1027	54643	20	676091105	-33445
21	552222	-1169	51809	21	534196	-27567
22	-1075	-1130	22874	22	-18283	-33486
23	10378721	-1168	37288	23	10360698	-34605
24	10986836	-1262	27122	24	10969139	-34277
25	59463	-1230	38797	25	41835	-33946
26	10000000000	-889	10160	26	10000000000	-34647
27	6206	-918	29067	27	-12216	-34864
28	10000000000	-941	25379	28	10000000000	-35071
29	6252842154	-990	16217	29	6252824049	-34757
30	117398	-1030	37323	30	107649	-33516
31	10000000000	-1140	28893	31	10000000000	-34689
32	1188629	-1158	23094	32	1170278	-34861
33	14249	-1178	23145	33	-4082	-34980
34	113168	-1239	26250	34	93649	-36895
35	122402	-1290	36312	35	103718	-35652
36	10000000000	-882	26990	36	10000000000	-35373
37	10000000000	-967	9718	37	10000000000	-34110
38	27587	-924	1215	38	9762	-33835
39	54036430	-970	2478	39	54018413	-34284
40	42098	-1135	41342	40	25076	-32855
41	12316	-1146	12747	41	-5113	-33833
42	16048	-1162	21623	42	-1637	-34152
43	-744	-1198	55982	43	-19982	-36382

44	2353615696	-1240	13104	44	2353597919	-34241
45	80576417	-1272	57775	45	80559000	-33561
46	10000000000	-943	9457	46	10000000000	-34274
47	17832	-969	36851	47	-812	-35159
48	1303738	-948	27820	48	1284634	-36001
49	56234929	-1030	1996	49	56217474	-33671
50	10000000000	-1141	21731	50	10000000000	-34045

^a Las energías están en unidades kcal/mol.

^b El trabajo es en unidades pN Å.

En contraste con lo notado para MeuTXK α 1, los complejos en vacío de las toxinas mutadas de MeuTXK α 3 no todos presentaron una energía menor al complejo nativo. No obstante, se destacan 25, 26, 27 y 30 entre los que fueron más estables.

En cuanto al trabajo o la energía necesaria para separar la toxina del canal, se observa que los complejos 30, 6, 27, 26, 33, 28, 16, 9, 25, 24, 7, 8 y 1; requirieron mayor energía que el complejo MeuTXK α 3 – canal; y los complejos que necesitaron la menor energía de todos los complejos fueron el 20 y el 23.

Tabla 4. Energía inicial y final de los complejos en vacío y en solvente toxina – canal para las mutantes de MeuTXK α 3 y energía necesaria para desprender la toxina del canal (trabajo).

Complejo Toxina – canal en vacío	Energía inicial ^a	Energía final ^a	Trabajo ^b	Complejo solvatado Toxina-canal	Energía inicial ^a	Energía final ^a
MeuTXKα3	-1158	-1466	168734	MeuTXKα3	-19480	-35526
1	114703	-1385	170223	1	95483	-37080
2	914024	-1305	157948	2	893716	-38447
3	100984	-1386	165520	3	80026	-39146
4	86707	-1417	168509	4	67439	-36582
5	219299	-1516	159217	5	198886	-38643
6	51701242	-1351	198804	6	51680051	-39689
7	4279	-1276	172600	7	-15509	-37609
8	1063372779	-1471	170518	8	1063352408	-38303
9	1001800	-1445	184009	9	982705	-36744
10	7150247249	-1330	155536	10	7150227446	-37615
11	1361236	-1505	143565	11	1342594	-36182
12	22702799	-1504	167383	12	22681764	-39377
13	31291542	-1397	154569	13	31271100	-38538

14	17176	-1329	158626	14	-3393	-39003
15	277046921	-1400	167087	15	277026359	-38697
16	2141	-1424	185215	16	-17494	-37504
17	10000000000	-1505	152804	17	10000000000	-39282
18	14122	-1490	153402	18	-5779	-37757
19	309818	-1410	158821	19	289241	-38768
20	-761	-1503	133896	20	-21235	-38901
21	26033	-1444	139455	21	5348	-38613
22	3640	-1356	153702	22	-16298	-38127
23	467576	-1589	126366	23	447703	-38083
24	9459950677	-1351	177108	24	9459930679	-38115
25	208272193	-1742	178466	25	208252853	-37085
26	5045	-1683	195824	26	-15510	-39019
27	-939	-1625	197766	27	-21249	-38780
28	2652	-1565	186385	28	-17145	-37710
29	291251357	-1757	153898	29	291231794	-37447
30	67266295	-1772	200593	30	67247459	-36465
31	13053	-1396	153335	31	-7255	-38562
32	-1013	-1435	160472	32	-19396	-35784
33	26745	-1325	191535	33	5899	-39221
34	6569	-1424	161125	34	-12925	-37033
35	10000000000	-1503	159842	35	10000000000	-37777
36	4121223	-1502	166126	36	4101091	-38311

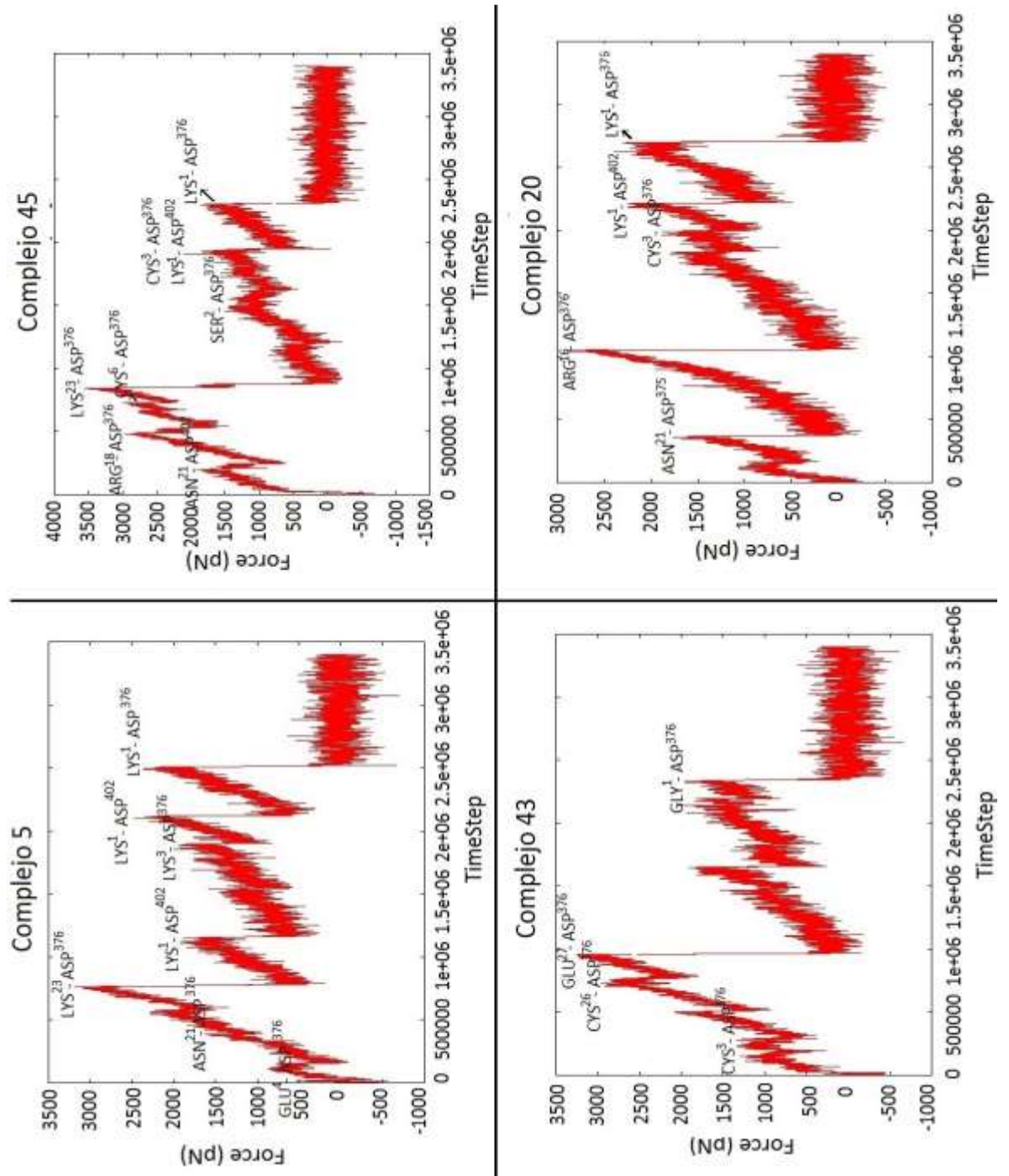
^a Las energías están en unidades Kcal/mol.

^b El trabajo es en unidades pN Å.

2.5.3. Separación de los complejos canal – toxina por medio de SMD.

A partir de la dinámica SMD, se obtuvieron las gráficas 2, 3, 4 y 5 de Fuerza (pN) en función del *TimeStep* (ns). En el caso de MeuTXK α 1, primero se analizaron las gráficas de los complejos 5, 45, 43 y 20 como se presenta en la gráfica 3, ya que estos fueron los que necesitaron la mayor energía para ser desprendidos de canal con respecto a la toxina sin modificar.

En las gráficas se relacionó cada pico a la separación de los aminoácidos o al rompimiento de las interacciones entre estos. Las fuerzas requeridas para la separación de los residuos que se explicarán a continuación, son fuerzas aproximadas debido a la complejidad de las gráficas.



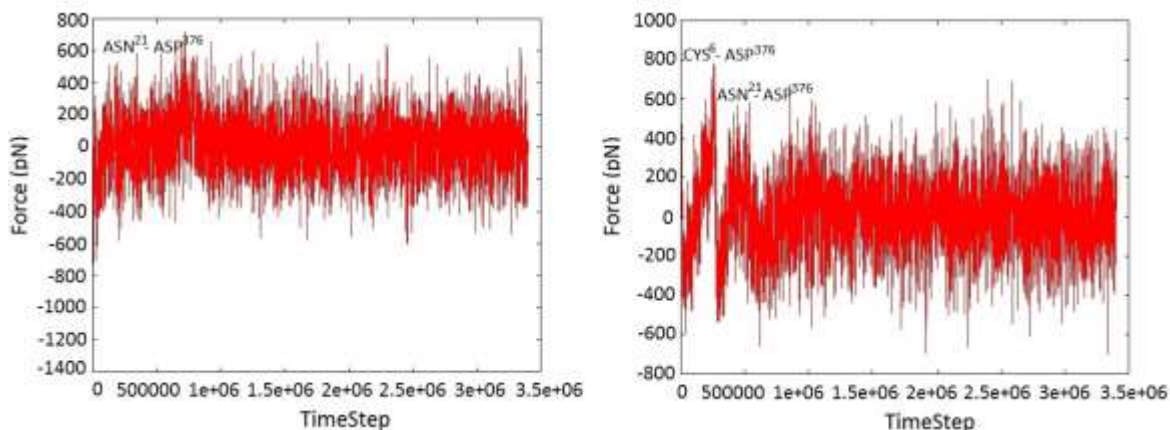
Gráfica 2. Gráficas de Fuerza (pN) vs TimeStep para los complejos 5, 45, 43 y 20; los cuales requirieron mayor energía para ser desprendidos de canal en comparación con la toxina sin modificar MeuTXKα1.

En el complejo 5, el primer pico señalado corresponde a la separación de Glu⁴ y Asp^{376 A} con una fuerza estimada de 535.817 pN. El segundo, representa la separación de Asn²¹ y Asp^{376C} con una fuerza de 1626.61 pN. El tercero, muestra la separación de Lys²³ y Asp^{376C} con una fuerza de 3008.06 pN. El cuarto y el sexto indican la separación de Lys¹ y Asp^{402A} con fuerzas de 2006.09 pN y 1700.26 pN. El quinto señala la separación de Lys³ y Asp^{376 A} con una fuerza de 1773.69 pN y por último se separan Lys¹ y Asp^{376 A} con una fuerza necesaria de 2149.54 pN, en este momento la toxina se aleja completamente del canal.

En el complejo 45, el primer pico resaltado corresponde a la separación de Asn²¹ y Asp^{376C} que requirió 1502.28 pN. El segundo, es la separación de Arg¹⁸ y Asp^{376C} utilizando una fuerza de 2758.77 pN. El tercero, muestra la separación de Cys⁶ y Asp^{376 A} con una fuerza de 2674.2 pN. El cuarto, corresponde a la separación de Lys²³ y Asp^{376C} con una fuerza de 3402.38 pN. El quinto, indica la separación de Ser² y Asp^{376A} lo cual necesitó una fuerza de 1415.99 pN. El sexto es la separación de Cys³ y Asp^{376A}; y Lys¹ y Asp^{402A} requiriendo 1774.55 pN. El séptimo, señala la ruptura entre las interacciones de Lys¹ y Asp^{376A} con una fuerza de 1726.99 pN y se separa la toxina del canal la cual al final estaba unida únicamente por este residuo al canal.

En el complejo 43, el primer pico señalado corresponde a la separación de Cys y Asp^{376A} necesitando 1159.14 pN. El segundo, muestra la separación Cys²⁶ y Asp^{376C} con una fuerza de 2904.26 pN. El tercero, indica el alejamiento Glu²⁷ y Asp^{376C} usando una fuerza de 3110.06 pN. El último residuo en retirarse del canal es Gly¹ unido a Asp^{376A} requiriendo 1724.06 pN y se separa la toxina del canal.

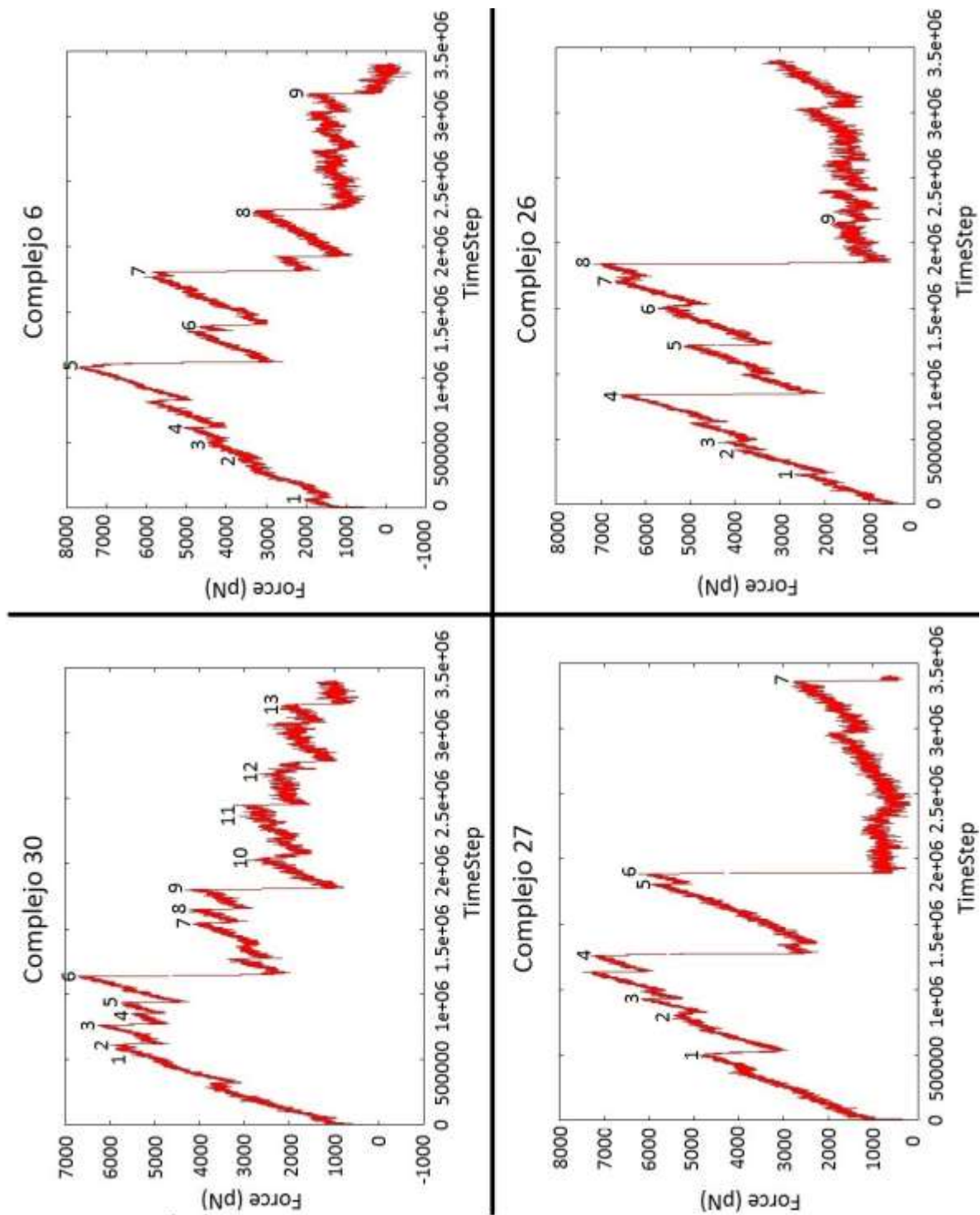
En el complejo 20, el primer pico señalado corresponde a la separación de Asn²¹ y Asp^{375C} con una fuerza de 1612.8 pN. El segundo, indica la ruptura de las interacciones entre Arg¹⁶ y Asp^{376C} lo cual se empleó una fuerza de 2872.52 pN. El tercero, muestra el alejamiento entre Cys³ y Asp^{376A} con una fuerza de 1655.69 pN. El cuarto, corresponde la separación entre Lys¹ y Asp^{402A} que necesitó 2059.35 pN. El quinto fue la ruptura Lys¹ y Asp^{376A} que consumió una fuerza de 2102.15 pN.



Gráfica 3. Gráficas de Fuerza (pN) vs TimeStep para los complejos 49 (izquierda) y 38 (derecha); los cuales fueron los complejos que necesitaron la menor energía para ser desprendidos de canal en comparación con la toxina sin modificar MeuTXK α 1.

Como ya se mencionó, también se estudiaron los dos complejos que necesitaron la menor energía para separar la toxina del canal. Estos fueron los complejos 49 y 38 como se presenta en la gráfica 3. Al visualizar en VMD la separación de la toxina modificada en ambos complejos, se observó que la toxina se desprende durante los primeros pasos de la simulación y los residuos que mantienen la toxina unida al canal durante ese corto tiempo son: Asn²¹ en el caso del complejo 49 y Cys⁶ y Asn²¹ en el complejo 38. En el complejo 49 hubo un cambio de Val¹ por Asp, Lys¹⁸ por Hsd y Pro²⁸ por Asp, los nuevos Asp en la toxina mutada pueden sentirse repelidos por los residuos de Asp del canal y por lo tanto se separa la toxina rápidamente. En el caso del complejo 38 hubo una alteración de Val¹ por Gly, Lys¹⁸ por Hsd y Pro²⁸ por Thr; de los cuales Gly y Thr no interactúan fuertemente con los residuos de aspartato del canal. Lo anterior, explica el hecho de que estas toxinas fueron las que necesitaron menor energía para desprenderse el canal.

También se realizó el análisis de las gráficas obtenidas a partir de la dinámica SMD para los complejos con toxinas mutadas de MeuTXK α 3. En este caso, los 4 complejos que requirieron mayor energía en el proceso de separación de la toxina modificada del canal fueron el 30, 6, 27 y 26 los cuales se presentan en la gráfica 4; y los dos complejos que necesitaron la menor energía de todos los complejos fueron el 23 y el 20 representados en la gráfica 5.



Gráfica 4. Gráficas de Fuerza (pN) vs TimeStep para los complejos 30, 6, 27 y 26; los cuales requirieron mayor energía para ser desprendidos de canal en comparación con la toxina sin modificar MeuTXK α 3.

Las tablas 5 a 8 corresponden a los complejos 30, 6, 27 y 26, en ellas se relaciona cada pico señalado en las gráficas con la separación de los residuos de la toxina y el canal, y la fuerza aproximada requerida para la ruptura de cada interacción.

Tabla 5. Residuos separados durante la dinámica SMD para el complejo 30 y fuerza necesaria en pN.

Pico	Separación de los residuos	Pico	Separación de los residuos	Pico	Separación de los residuos
1	Lys ³⁴ - Asp ^{376 C}	2	Arg ²⁵ -Asp ^{375C} Tyr ²⁴ -Asp ^{376C}	3	Arg ²⁵ - Asp ³⁷⁶ Lys ⁶ - Hsd ⁴⁰⁴
Fuerza	5561.03	Fuerza	5837.57	Fuerza	6100.89
4	Lys ⁹ - Asp ^{375A} Arg ³⁶ -Hsd ^{404C}	5	Lys ³⁴ - Asp ³⁷⁵	6	Arg ³⁶ - Asp ^{376C}
Fuerza	5194.73	Fuerza	5685.72	Fuerza	6733.35
7	Lys ¹⁷ - Asp ^{376C} Arg ¹⁶ -Asp ^{376C}	8	Lys ¹³ - Asp ^{375A}	9	Asn ⁵ - Asp ^{376A}
Fuerza	3946.56	Fuerza	3840.38	Fuerza	3852.46
10	Arg ¹² - Asp ^{375A}	11	Gly ⁷ - Asp ^{376A} Lys ⁹ - Asp ^{376A} Lys ⁶ - Asp ^{402A}	12	Lys ⁶ - Asp ^{376A} Lys ¹ - Ala ^{406A} Hsd ^{404A} Pro ^{405A}
Fuerza	2516.92	Fuerza	2611.98	Fuerza	2153.34
13	Lys ¹ - Asp ^{402A}				
Fuerza	2001.63				

Tabla 6. Residuos separados durante la dinámica SMD para el complejo 6 y fuerza necesaria en pN.

Pico	Separación de los residuos	Pico	Separación de los residuos	Pico	Separación de los residuos
1	Glu ¹⁴ – Asp ^{376A}	2	Lys ²⁴ – Asp ^{376C}	3	Lys ¹⁵ – Asp ^{376A}
Fuerza	1802.11	Fuerza	3422.05	Fuerza	4125.52
4	Lys ⁹ – Asp ^{375A}	5	Lys ¹ – Hsd ^{404A} Pro ^{57A} Phe ³ – Hsd ^{404A}	6	Arg ¹² – Asp ^{375A} Arg ¹⁶ – Asp ^{402C}
Fuerza	4891.13	Fuerza	7750.12	Fuerza	4841.65
7	Arg ¹⁶ –Asp ^{376C} Asp ^{375C} Lys ¹⁷ – Asp ^{376C}	8	Arg ²⁵ –Asp ^{376C}	9	Lys ³⁴ – Asp ^{375C}
Fuerza	5818.25	Fuerza	3179.44	Fuerza	1756.75

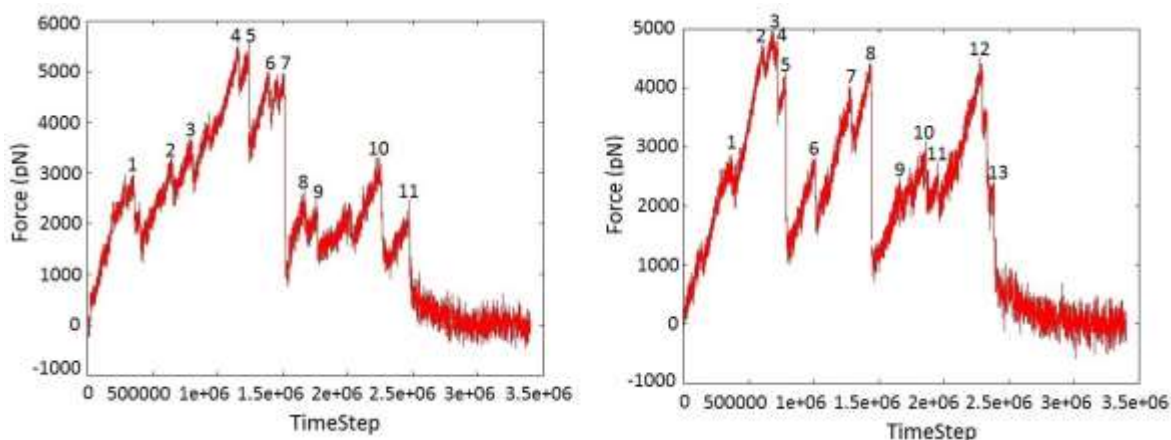
Tabla 7. Residuos separados durante la dinámica SMD para complejo 27 y fuerza necesaria en pN.

Pico	Separación de los residuos	Pico	Separación de los residuos	Pico	Separación de los residuos
1	Phe ¹ – Pro ^{405A}	2	Phe ¹ – Asp ^{376A} Arg ¹² –Asp ^{375A}	3	Tyr ²⁴ – Asp ^{376C} Arg ²⁵ – Asp ^{402C}
Fuerza	4445.96	Fuerza	5214.92	Fuerza	6109.87

4	Phe ¹ – Asp ^{375A} Lys ⁶ – Asp ^{375A} Arg ¹⁶ –Asp ^{402C}	5	Lys ¹⁷ – Asp ^{376C}	6	Arg ¹⁶ – Asp ^{375C}
Fuerza	7036.39	Fuerza	5807.22	Fuerza	6076.4
7	Lys ²⁴ – Asp ^{376C}				
Fuerza	2545.33				

Tabla 8. Residuos separados durante la dinámica SMD para el complejo 26 y fuerza necesaria en pN.

Pico	Separación de los residuos	Pico	Separación de los residuos	Pico	Separación de los residuos
1	Arg ²⁵ –Gly ^{399C}	2	Leu ¹ – Hsd ^{404A}	3	Arg ¹² – Asp ^{375A}
Fuerza	2514.09	Fuerza	3687.12	Fuerza	4134.81
4	Leu ¹ – Asp ^{376A} Lys ⁹ – Asp ^{375A} Arg ¹⁶ –Gly ^{399C}	5	Arg ¹⁶ –Asp ^{402C}	6	Thr ²⁴ – Asp ^{376C} Arg ²⁵ – Asp ^{402C}
Fuerza	6325.29	Fuerza	5093.12	Fuerza	5558.92
7	Lys ¹⁷ – Asp ^{376C} Arg ³⁶ –Hsd ^{404C}	8	Arg ²⁵ –Asp ^{376C}	9	Arg ³⁶ – Gly ^{399C}
Fuerza	6468.67	Fuerza	7033.44	Fuerza	1310.91



Gráfica 5. Gráfica de Fuerza (pN) vs TimeStep (ns) para los complejos 20 y 23; los cuales fueron los complejos que necesitaron la menor energía para ser desprendidos de canal en comparación con la toxina sin modificar MeuTXK α 3.

En las tablas 9 y 10 se relaciona cada pico señalado en las gráficas de los complejos 20 y 23 con la separación de los residuos de la toxina y el canal, y la fuerza aproximada requerida para la ruptura de cada interacción entre estos. A diferencia de los complejos 49 y 38 de MeuTXK α 1, en estos complejos las toxinas no se separaron del canal en los primeros pasos, pero sí se separaron antes que en los complejos que necesitaron mayor energía.

Tabla 9. Residuos separados durante la dinámica SMD para el complejo 20.

Pico	Separación de los residuos	Pico	Separación de los residuos	Pico	Separación de los residuos
1	Leu ¹ - Hsd ^{404A}	2	Lys ⁹ – Asp ^{375A}	3	Glu ¹⁴ – Asp ^{376C}
Fuerza	2730.48	Fuerza	3125.67	Fuerza	3593.51
4	Arg ¹² – Asp ^{375A}	5	Arg ¹⁶ –Asp ^{402C}	6	Arg ¹⁶ – Asp ^{376C} Tyr ²⁴ – Tyr ^{400C}
Fuerza	5479.42	Fuerza	5360.21	Fuerza	4760.61
7	Arg ¹⁶ –Asp ^{375C} Lys ¹⁷ – Asp ^{376C}	8	Lys ³⁴ – Asp ^{376C}	9	Arg ²⁵ – Asp ^{402C} Gly ²⁶ – Asp ^{376C}
Fuerza	4714.69	Fuerza	2266.13	Fuerza	2189.89

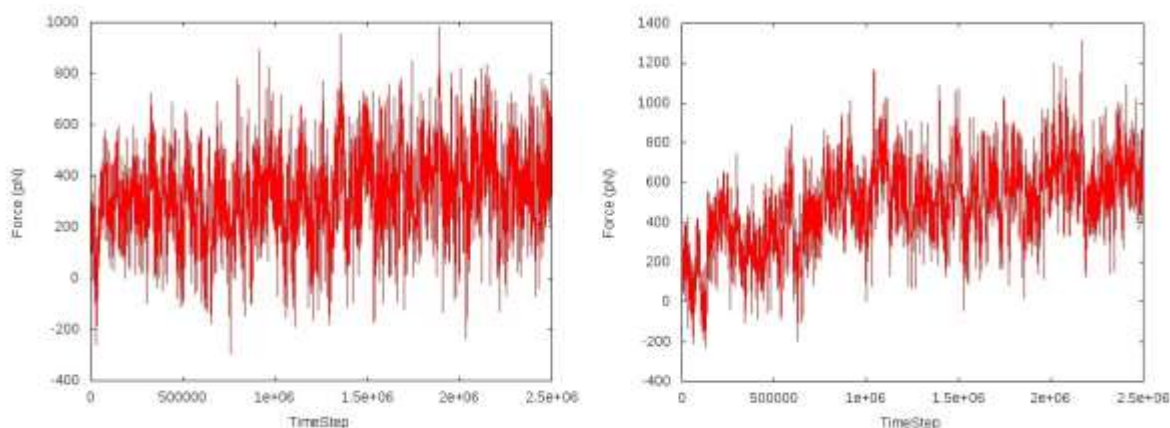
10	Arg ²⁵ -Asp ^{376C}	11	Lys ²⁷ -Asp ^{375C}
Fuerza	3008.99	Fuerza	2169.12

Tabla 10. Residuos separados durante la dinámica SMD para el complejo 23.

Pico	Separación de los residuos	Pico	Separación de los residuos	Pico	Separación de los residuos
1	Cys ¹⁵ -Asp ^{376C}	2	Asn ²³ -Tyr ^{400C} Tyr ³² -Asp ^{375C}	3	Asn ⁵ -Asp ^{376A} Phe ¹ -Hsd ^{404A}
Fuerza	2800.36	Fuerza	4209.52	Fuerza	4771.61
4	Lys ⁹ -Asp ^{375A}	5	Asp ¹ -asp ^{376A}	6	Arg ¹⁶ -Asp ^{402C}
Fuerza	4728.52	Fuerza	4061.08	Fuerza	2780.3
7	Arg ¹⁶ -Asp ^{375C} Lys ¹⁷ -Asp ^{376C}	8	Arg ¹⁶ -Asp ^{376C}	9	Arg ²⁵ -Gly ^{399C} Gly ²⁶ -Asp ^{376C}
Fuerza	3546.4	Fuerza	4277.94	Fuerza	2014.18
10	Arg ²⁵ -Asp ^{402C} Gly ²⁶ -Asp ^{376C}	11	Arg ²⁵ -Hsd ^{404C}	12	Arg ²⁵ -Hsd ^{376C}
Fuerza	3095.88	Fuerza	2303.52	Fuerza	4189.23
13	Lys ²⁷ -Asp ^{376C}				
Fuerza	2225.89				

Por último, al realizar SMD en agua se obtuvieron gráficas similares a las presentadas en la gráfica 6. Los picos de estas corresponden a la constante

formación y rompimiento de enlaces de hidrógeno entre la toxina y moléculas de agua, y el canal con moléculas de agua.



Gráfica 6. Gráfica de fuerza (pN) en función del TimeStep (ns) para el complejo 5 de MeuTXK α 1 (izquierda) y el complejo 30 de MeuTXK α 3 (derecha).

2.6. DISCUSIÓN

Para empezar se debe mencionar que la estructura del canal de potasio dependiente de voltaje Kv1.3 que se utilizó durante este proyecto fue modelada con una precisión mayor al 90% y las estructuras base MeuTXK α 1 y MeuTXK α 3 también fueron obtenidas con precisión (Velásquez, 2014).

En cuanto a las modificaciones realizadas a MeuTXK α 1, como se presenta en la tabla 1, las mutaciones 6, 7, 8, 16, 17, 26, 27, 36 y 46 luego de ser minimizadas resultaron con una energía mayor que MeuTXK α 1, es decir que fueron menos estables. Estas mutaciones tienen en común el cambio de la lisina 18 por una histidina y como se puede observar en la Tabla 1, las toxinas menos estables presentaron esta misma alteración, lo cual puede ser un indicio de que la histidina en esta posición, por su estructura más compleja no favorece la estabilidad termodinámica de la toxina. Al visualizar sus estructuras en VMD (figura 9), claramente se puede ver que hay diferencia en las cadenas laterales de los aminoácidos cambiados y su orientación. Sin embargo, con respecto a la estructura secundaria se observa que la toxina natural (en morado) es un poco más compacta que la toxina mutada 6 (en rosado), a diferencia de lo que se observa al superponer la estructura de MeuTXK α 1 con la toxina mutada 25 (en amarillo), la cual presentó una energía menor y una estructura un poco más compacta que la toxina sin modificar. Para todas las mutaciones menos estables se visualizó un comportamiento similar.



Figura 9. Toxina MeuTXK α 1 en morado, mutante 6 en rosado y mutante 25 en amarillo. Los residuos señalados corresponden a las posiciones 1, 18 y 28 en las que se realizaron las modificaciones.

Con el fin de entender por qué los complejos modificados 5, 45, 43 y 20 de MeuTXK α 1 necesitaron más energía para desprender la toxina del canal se analizó cada complejo y las interacciones de la toxina con el canal.

En el complejo 5, los picos señalados en la gráfica 2 como la separación de Glu⁴ y Asp^{376A}, Asn²¹ y Asp^{376C}, corresponden al rompimiento de un enlace de hidrógeno entre estos residuos, siendo un átomo de oxígeno del aspartato el átomo aceptor. Los otros picos representan la separación de Lys¹ y Asp^{402A}, Lys³ y Asp^{376A} y Lys¹ y Asp^{376A} entre los cuales primero se han roto enlaces de hidrógeno y después los puentes salinos, ya que la lisina es un aminoácido básico y el aspartato un residuo ácido. El rompimiento de las interacciones entre Lys¹ y Asp^{376A} conlleva a la separación de la toxina del canal. Según esto, las interacciones responsables de la gran afinidad de la toxina por el canal en este complejo, han sido los enlaces de hidrógeno y las interacciones electrostáticas por medio de puentes salinos.

En el complejo 45, se da la separación de enlaces de hidrógenos formados por Asn²¹ y Asp^{376C}, Arg¹⁸ y Asp^{376C}, Cys⁶ y Asp^{376A}, Lys²³ y Asp^{376C}, Ser² y Asp^{376A}, Cys³ y Asp^{376A}, Lys¹ y Asp⁴⁰², Lys¹ y Asp^{376A}; un total de 8 enlaces de hidrógeno que se forman durante la dinámica SMD y se rompen a medida que se aleja la toxina del canal. Adicionalmente, entre los residuos de arginina y lisina se establecen puentes salinos con los aspartatos del vestíbulo del canal.

En el complejo 43 se formaron enlaces de hidrógeno entre Cys³ y Asp^{376A}, Cys²⁶ y Asp^{376C}, Glu²⁷ y Asp^{376C}, Gly¹ y Asp^{376A}.

En el complejo 20 se formaron enlaces de hidrógeno Asn²¹ y Asp^{375C}, y Cys³ y Asp^{376A}, entre Arg¹⁶ y Asp^{376C}, Lys¹ y Asp^{402A}, Lys¹ y Asp^{376A} hubo tanto enlaces de hidrógeno como puentes salinos.

En contraste con lo anterior, las interacciones entre la toxina *wild-type* y el canal Kv1.3 reportadas por Velásquez, resumidas en la tabla 11, son básicamente interacciones de Van der Waals entre cisteínas y los residuos de aspartato (Velásquez, 2014), las cuales son menos fuertes que los puentes salinos.

Los complejos 5, 45 y 43 coinciden en que se mutó la valina 1 por una lisina, esta valina 1 es importante en la orientación de la toxina, ya que presenta interacciones hidrofóbicas con la Val⁴⁰⁶ del canal, pero no a la hora de aplicar la fuerza debido a que dichas interacciones son muy débiles (Velásquez, 2014). Por ello, al cambiar la valina por la lisina, esta interactúa con los residuos Asp^{375A}, Asp^{376A} y Asp^{402A} formando enlaces de hidrógeno y puentes salinos, lo cual resulta en una unión más fuerte de la toxina con el canal y por tanto una mayor energía fue requerida para separarla del canal. En los videos obtenidos por SMD se observó que para estos 4 complejos la parte que se desprende primero del canal, es la parte de las láminas β antiparalelas, contrario a lo que sucede con MeuTXK α 1 y con otras toxinas como la kalitoxina del veneno del escorpión *Androctonus mauretanicus mauretanicus* (Martin-Eauclaire & Bougis, 2012; Velásquez, 2014).

En la figura 10 se muestra la unión de las toxinas al canal en los complejos 5 (verde) y 45 (naranja) contrastadas con MeuTXK α 1 (en morado). En los dos complejos modificados, debido a que la posición 1 es una lisina, se observó que la cadena lateral de la lisina se acerca mucho más a los residuos de aspartato del canal señalados en rojo, a diferencia de la valina presente en MeuTXK α 1 que por el contrario se aleja de estos residuos. Otra característica importante es que en los complejos 5, 45 y 43 se varió una lisina 18 por arginina, la cual tiene propiedades básicas igual que la lisina, pero tiene una cadena lateral más extensa que se acerca más a los residuos de aspartato del canal con los que pueden tener interacciones electrostáticas.

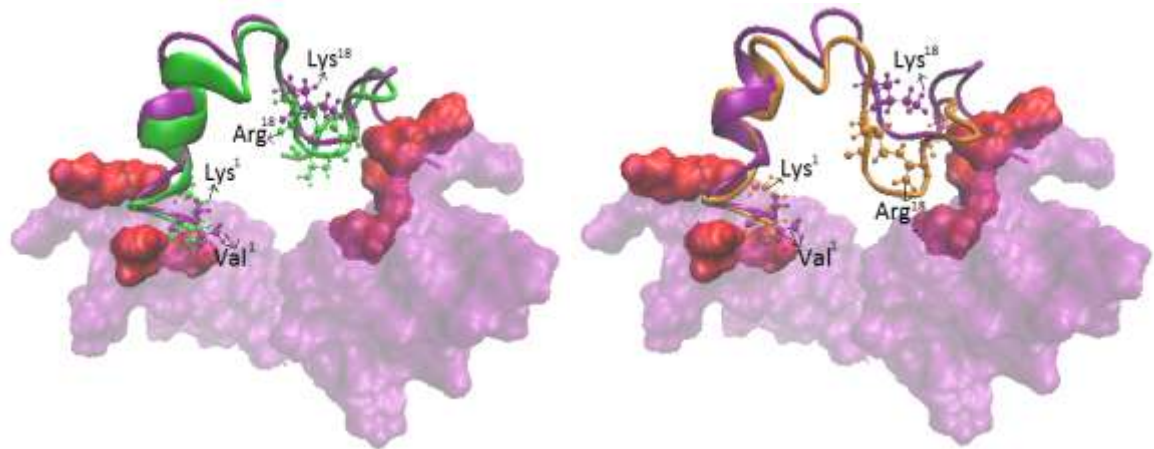


Figura 10. Figura de los complejos MeuTXK α 1 – canal Kv1.3 (en morado) y complejo 5 (verde) y complejo 45 (naranja). Los residuos de Asp del canal señalados en rojo.

Con respecto a los complejos que necesitaron la menor energía para que la toxina se alejara del canal, en el complejo 49 se observó que solo el Asn²¹ formó un enlace

de hidrógeno con Asp ^{376C}, pero una vez este se rompió la toxina se alejó por completo del canal. En el 38 ocurrió lo mismo, pero también hubo interacción entre Cys ⁶ y Asp ^{376A}.

De acuerdo con lo mencionado, el cambio de la valina 1 por una lisina y la lisina 18 por una arginina fueron modificaciones que resultaron ser favorables para interacción de la toxina con el canal. En contraste, la modificación de la valina 1 por un aspartato y la lisina 18 por una histidina no favoreció la interacción toxina – canal.

Tabla 11. Residuos del canal y cada una de las toxinas que interactúan en la separación del complejo canal - MeuTXK α 1 y canal – MeuTXK α 3. ^A residuo perteneciente a la cadena A. ^C residuo perteneciente a la cadena C (Velásquez, 2014).

Complejo	Residuo de Kv1.3	Residuo de la toxina
Canal - MeuTXKα1	ASP ⁴⁰²	SER ²
	ASP ^{376 A}	CYS ³ – CYS ⁶
	ASP ^{376 C}	CYS ²⁶ – CYS ²⁴
	GLU ³⁷³	GLU ²⁷
Canal – MeuTXKα3	TYR ⁴⁰⁰	TYR ²⁴
	ASP ³⁷⁶	CYS ³⁵ – ARG ³⁴ – TYR ²⁴ – ARG ²⁵
	ASP ³⁷⁵	ARG ¹² – CYS ¹⁵ – ARG ¹⁶ – ASP ²
	HSD ⁴⁰⁴	ASP ²

En cuanto a las modificaciones realizadas a la toxina MeuTXK α 3, no se observó ningún mutante más estable. No obstante, al crear los complejos las energías de los complejos toxina MeuTXK α 3 modificada – canal fueron favorables para todas mutaciones.

Durante el análisis SMD de los 4 complejos que necesitaron mayor energía para separar la toxina del canal, los cuales fueron 30, 6, 27 y 26 se analizaron los videos para observar las interacciones entre las toxinas y el canal.

En el complejo 30, se evidenció que los residuos de la toxina responsables de la interacción con el canal fueron Lys¹, Lys⁶, Lys⁹, Lys¹⁷, Lys³⁴, Arg¹², Asn⁵ y Gly⁷; los cuales establecieron enlaces de hidrógeno, puentes salinos entre los residuos de lisina y arginina con los residuos de aspartato del canal; e interacciones de Van der Waals. En el complejo 6 hubo enlaces de hidrógeno, puentes salinos entre Lys¹, Lys⁹, Lys¹⁵, Lys¹⁷, Lys²⁴, Arg¹², Arg¹⁶ y los Asp³⁷⁵, Asp³⁷⁶, Asp⁴⁰²; y fuerzas inducidas entre Phe³ y Hsd^{404A}. En el complejo 27 se observaron puentes salinos entre Lys⁶, Lys¹⁷, Lys²⁴, Arg¹² y Arg¹⁶ con los residuos de aspartato del canal y enlaces de hidrógeno entre Phe¹ con Pro^{405A}, Phe¹ con Asp^{375A}, Asp^{376A} y Tyr²⁴ con Asp^{376C}. En el complejo 26 hubo enlaces de hidrógeno entre Lys⁹, Lys¹⁷, Arg¹², Arg¹⁶, Arg²⁵ y Arg³⁶ con Asp³⁷⁵, Asp³⁷⁶, Asp⁴⁰², Hsd⁴⁰⁴ y Gly³⁹⁹; y fuerzas inducidas entre Leu¹ y Hsd^{404A}.

También se vio en los videos que los complejos 30, 27 y 26 las toxinas no alcanzan a separarse completamente del canal a diferencia del complejo MeuTXKα3 – canal, en el cual la toxina se aleja completamente. En el primero, queda la toxina unida por un enlace de hidrógeno entre Lys¹ a Asp^{376A}. En el segundo, no se alcanza a romper un puente salino entre Arg³⁴ y Asp^{375C}. En el último, la toxina permanece unida al canal por medio de 2 enlaces de hidrógeno entre Arg³⁶ con Asp^{375C} y Lys²⁴ con Asp^{376C}.

Lo anterior es similar a las interacciones reportadas para la toxina MeuTXKα3 sin modificar, ya que como se resume en la tabla 11, sus interacciones con el canal son predominantemente de tipo puente salino, entre un aminoácido básico y un aminoácido ácido, también interacciones de van der Waals entre anillos aromáticos (Velásquez, 2014). Lo que se puede deducir respecto a las modificaciones realizadas es que igual a lo que sucedió con MeuTXKα1, mutar la valina 1 por lisina favorece la interacción con los aminoácidos ácidos del canal. Igualmente, el cambio de la fenilalanina 36 por arginina conlleva a interacciones más fuertes de tipo puente salino con los residuos de aspartato del canal.

Con respecto a los complejos 23 y 20 que requirieron menos fuerza para poder separar las toxinas del canal, se observan las mismas interacciones ya mencionadas como enlaces de hidrógeno, puentes salinos e interacciones electrostáticas. Sin embargo, dichas interacciones no alcanzan a ser tan fuertes como las de MeuTXKα3 y el canal, por ello es que en estos complejos la toxina se separa más rápidamente del canal.

Finalmente, al realizar SMD en agua para las toxinas sin modificar y para los 8 complejos que requirieron mayor energía para desprender la toxina del canal, se observó un comportamiento diferente al estudiado en vacío. Por un lado, el análisis SMD usando una esfera de agua como solvente es mucho más complejo y demorado, debido a las miles de moléculas de agua que rodean a todo el sistema. El analizar la interacción entre la toxina y el canal en agua, fue complejo debido a que ya no se formaban enlaces de hidrógeno entre la toxina y el canal, sino entre la

toxina y las moléculas de agua, y el canal con las moléculas de agua. Por otro lado, en el desprendimiento de la toxina y el canal, en SMD en vacío en todos los casos había un cambio en la conformación de la toxina la cual se iba volviendo lineal a medida que se desprendía del canal. En contraste, lo que sucedió en agua fue que la toxina se empezó a alejar del canal junto con moléculas de agua y su conformación no varió tanto como en SMD en vacío. También se realizaron gráficas de Fuerza (pN) vs *TimeStep* (ns), sin embargo, de ellas solo se puede inferir que se forman y rompen enlaces de hidrógeno constantemente entre el la toxina y el canal con moléculas de agua.

Lo anterior demuestra que a pesar de que la metodología empleada es útil para dar un estimado de las interacciones entre la toxina y el canal, el comportamiento real es diferente debido a que los sistemas biológicos son más complejos por la presencia de agua como solvente y muchas moléculas como iones, proteínas, entre otras.

Este proyecto presenta toxinas candidatas como un potente inmunosupresor para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, sin embargo, sería necesario realizar los estudios experimentales para comprobar su afinidad y selectividad por Kv1.3.

2.7. CONCLUSIONES

- 2.7.1. Se encontraron modificaciones en la estructura primaria de MeuTXK α 1 que resultaron en una estructura 3-dimensional más estable que la toxina *wild-type*.
- 2.7.2. Se lograron obtener, empleando la técnica *Steered Molecular Dynamics* mutantes de las toxinas MeuTXK α 1 y MeuTXK α 3 que alteraron el bloqueo al canal de potasio Kv1.3.
- 2.7.3. Se encontró que la modificación de Val¹ y Lys¹⁸ de MeuTXK α 1 por una lisina y una arginina, respectivamente, favorecieron la interacción toxina-canal por medio de la formación de enlaces de hidrógeno y puentes salinos, de manera que los complejos con dichas mutaciones requirieron más energía para que la toxina se desprendiera del canal.
- 2.7.4. Se identificaron las toxinas mutadas de MeuTXK α 3 que resultaron en un complejo toxina-canal más estable y al analizarlas por medio de SMD se observó que el cambio de la Val¹ y Phe³⁶ por lisina y arginina, respectivamente, fue importante para la formación de interacciones más estables con el canal.
- 2.7.5. Se realizó SMD en agua, aunque resultados fueron más difíciles de analizar y es necesario realizar cálculos más detallados para obtener resultados más concluyentes.

2.8. RECOMENDACIONES

- 2.8.1.** Realizar cálculos de SMD en agua más detallados para estudiar la interacción de las toxinas con el canal en solvente y tener una aproximación más cercana a lo real.
- 2.8.2.** Analizar el número de puentes de hidrógeno intermoleculares que se forman entre la toxina y el agua, empleando VMD, lo cual podría brindar información útil de su comportamiento en agua.
- 2.8.3.** Considerar los iones K^+ y Na^+ en las simulaciones, ya que estos podrían tener efectos (fuerza iónica) interesantes de analizar. De igual manera, estudiar el efecto del pH que puede afectar a la toxina y al canal a través de la protonación o desprotonación de los residuos ácidos y básicos.
- 2.8.4.** Considerar las 4 subunidades del canal en estudios posteriores contando con más tiempo de cómputo y así obtener una descripción más detallada de las interacciones de la toxina con el canal.
- 2.8.5.** Con una mayor capacidad de cómputo y una teoría más sofisticada se podría se podría modelar el canal completamente, haciendo más realistas los resultados de los cálculos.
- 2.8.6.** Se pueden considerar otros mutantes, además de los ya descritos en este proyecto que podrían llevar a cambios en la estructura de la toxina que serían interesantes de estudiar por SMD.

3. BIBLIOGRAFÍA

- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2009). *Bioquímica* (Sexta edic). Bacerlona: Editorial Reverté, S.A.
- Cheung, L. S.-L., Shea, D. J., Nicholes, N., Date, A., Ostermeier, M., & Konstantopoulos, K. (2015). Characterization of Monobody Scaffold Interactions with Ligand via Force Spectroscopy and Steered Molecular Dynamics. *Scientific Reports*, 5, 8247. <http://doi.org/10.1038/srep08247>
- Copeland, R. A. (2000). *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis* (Second Edi). Wiley-VCH, Inc.
- Dauplais, M., Lecoq, A., Song, J., Cotton, J., Jamin, N., Gilquin, B., ... Ménez, A. (1997). On the Convergent Evolution of Animal Toxins. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(7), 4302–4309. <http://doi.org/10.1074/jbc.272.7.4302>
- Dynamics, M. (2005). Steered (SMD) and Interactive (IMD) Molecular Dynamics Steered Molecular Dynamics (SMD) Steps in a typical SMD project Force Application in SMD. *Physics*, (Imd).
- Gao, B., Peigneur, S., Tytgat, J., & Zhu, S. (2010). A potent potassium channel blocker from *Mesobuthus eupeus* scorpion venom. *Biochimie*, 92(12), 1847–1853. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.08.003>
- Guan, S., Han, W., Zhang, H., Wang, S., & Shan, Y. (2015). Insight into the interactive residues between two domains of human somatic Angiotensin-converting enzyme and Angiotensin II by MM-PBSA calculation and steered molecular dynamics simulation. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, (March), 1–14. <http://doi.org/10.1080/07391102.2015.1007167>
- Gulbins, E., Sassi, N., Grassmè, H., Zoratti, M., & Szabò, I. (2010). Role of Kv1.3 mitochondrial potassium channel in apoptotic signalling in lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1797(6-7), 1251–1259. <http://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.01.018>
- Gumbart, J. (2011). Forcing substrates through channels, (January).
- Hille, B. (2001). Ion Channel Excitable Membranes. *Sunderland Massachusetts USA*. http://doi.org/10.1007/3-540-29623-9_5640

- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, *14*(1), 33–38. [http://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](http://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
- Isgro, T., Phillips, J., Sotomayor, M., & Villa, E. (2010). NAMD tutorial. *Structure*, (December), 113.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B. T., & MacKinnon, R. (2003). X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*, *423*, 33–41. <http://doi.org/10.1038/nature01580>
- Kaats, A. J., Nadeau, J. L., & Dang'ana, M. K. (2009). ChannelTools: A VMD Plugin For Manipulating, Visualizing and Measuring Ion Channel Properties. *Biophysical Journal*, *96*(3), 672a. <http://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.12.3549>
- Karplus, M., & McCammon, J. a. (2002). Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature Structural Biology*, *9*(9), 646–652. <http://doi.org/10.1038/nsb0902-646>
- Martin-Eauclaire, M. F., & Bougis, P. E. (2012). Potassium channels blockers from the venom of *Androctonus mauretanicus mauretanicus*. *Journal of Toxicology*, *2012*, 103608. <http://doi.org/10.1155/2012/103608>
- O'Connor, C., & Adams, J. U. (2010). Essentials of Cell Biology, 1–100. Retrieved from <http://discovery.ucl.ac.uk/177672/>
- Pennington, M., Chang, S., Chauhan, S., Huq, R., Tajhya, R., Chhabra, S., ... Beeton, C. (2015). Development of Highly Selective Kv1.3-Blocking Peptides Based on the Sea Anemone Peptide ShK. *Marine Drugs*, *13*(1), 529–542. <http://doi.org/10.3390/md13010529>
- Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., ... Schulten, K. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, *26*(16), 1781–1802. <http://doi.org/10.1002/jcc.20289>
- Physics, C. B. (2005). Introduction to MD simulations Hands - on : NAMD Tutorial (1) Organization of NAMD Tutorial Files Ubiquitin. *Analysis*, (1), 1–20.
- Possani, L. D., Becerril, B., Delepierre, M., & Tytgat, J. (1999). Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *European Journal of Biochemistry*, *264*(2), 287–300. <http://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00625.x>
- Rudy, B., Maffie, J., Amarillo, Y., Clark, B., Goldberg, E. M., Jeong, H. Y., ... Zagha, E. (2010). Voltage Gated Potassium Channels: Structure and Function

of Kv1 to Kv9 Subfamilies. *Encyclopedia of Neuroscience*, 10, 397–425.
<http://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.01630-2>

Sallusto, F., Geginat, J., & Lanzavecchia, A. (2004). Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets : Function, Generation, and Maintenance. *Annual Review of Immunology*, 22(1), 745–763.
<http://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702>

Velásquez, N. (2014). *Simulación computacional del bloqueo del canal de potasio Kv1.3 por toxinas del veneno de escorpión (tesis de pregrado)*. Universidad Icesi, Cali, Colombia.

Wulff, H., Calabresi, P. a, Allie, R., Yun, S., Pennington, M., Beeton, C., & Chandy, K. G. (2003). The voltage-gated Kv1 . 3 K + channel in effector memory T cells as new target for MS, 111(11), 1703–1713.
<http://doi.org/10.1172/JCI200316921>.Introduction

Zhu, S., Peigneur, S., Gao, B., Luo, L., Jin, D., Zhao, Y., & Tytgat, J. (2011). Molecular Diversity and Functional Evolution of Scorpion Potassium Channel Toxins. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(2), M110.002832–M110.002832.
<http://doi.org/10.1074/mcp.M110.002832>