



**SIMULACIÓN COMPUTACIONAL DEL BLOQUEO DEL CANAL DE POTASIO
KV1.3 POR TOXINAS DEL VENENO DE ESCORPIÓN.**

NATALIA VELÁSQUEZ GARCÍA

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
QUÍMICAS
CALI
2014**

**SIMULACIÓN COMPUTACIONAL DEL BLOQUEO DEL CANAL DE POTASIO
KV1.3 POR TOXINAS DEL VENENO DE ESCORPIÓN.**

NATALIA VELÁSQUEZ GARCÍA

TRABAJO DE GRADO

TUTORES: CARLOS ARANGO, SANTIAGO CASTAÑO

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
QUÍMICAS
CALI
2014**

Contenido

Resumen del Proyecto.....	6
Abstract.....	7
1. Introducción.....	8
2. Descripción del proyecto.....	10
2.1 Planteamiento del problema de investigación.....	10
2.2 Marco teórico y estado del arte.....	11
2.3 Objetivos.....	19
2.4 Metodología Utilizada.....	20
2.5 Resultados.....	24
2.5.1 Tetrámero de Kv1.3.....	24
2.5.2 Estructura 3D de las toxinas MeuTXK α 1, MeuTXK α 3 y MeuTXK α 4..	26
2.5.3 Estructura de los complejos canal-toxina.....	30
2.5.4 Separación de los complejos canal-toxina por medio de Steered Molecular Dynamics (SMD).....	38
2.6 Discusión.....	43
2.7 Conclusiones.....	48
2.8 Recomendaciones.....	48
3. Referencias.....	49
Anexos.....	51

Tabla de Figuras

Figura 1 Alineación de secuencia de canales de K ⁺ seleccionados. Tomada de Doyle et al., 1998.	13
Figura 2 estructura ribbon de la toxina BeKm-1. Tomada de Zhu et al., 2011.	14
Figura 3 relación corriente-voltaje en un experimento representativo en control y en presencia de MeuKTX a 100Pm. Tomada de Gao et al., 2010.	14
Figura 4 Alineamiento de la región del poro de los canales Kv1.1 - Kv1.6 y Drosophila Shaker. Tomada de (Zhu et al., 2011)	22
Figura 5 Canal Kv1.3, turreta, poro y filtro. Valina 406; esferas azul oscuro, Aspartato; fragmentos purpura.	25
Figura 6 Cadenas A y C del canal Kv1.3. Valina 406; esferas azul oscuro, aspartato; fragmentos purpura.	25
Figura 7 Toxina MeuTXK α 1 obtenida con Chimera (Izquierda). Comparación de la estructura 3D de MeuTXK α 1 antes (rojo) y después de la minimización (azul) (Derecha).....	26
Figura 8 Gráfica de energía en función de timestep del proceso de minimización de MeuTXK α 1	27
Figura 9 Toxina MeuTXK α 3 obtenida con Chimera (Izquierda). Comparación de la estructura 3D de MeuTXK α 3 antes (rojo) y después de la minimización (azul) (Derecha).....	27
Figura 10 Gráfica de energía en función de timestep del proceso de minimización de MeuTXK α 3.....	28
Figura 11 Estructura 3D de MeuTXK α 4 obtenida con Chimera (Izquierda). Comparación de la estructura 3D de MeuTXK α 4 antes (rojo) y después de la minimización (azul) (Derecha).	29
Figura 12 Gráfica de energía en función de timestep del proceso de minimización de MeuTXK α 4.....	30
Figura 13 Complejo 1 antes de ser minimizado en vacío. Cadena A y C de Kv1.3 en azul claro, Valina 406 de Kv1.3; esferas azul oscuro, residuos de aspartato de Kv1.3; fragmentos purpura, toxina MeuTXK α 1; gris, residuos VAL1 y PRO28 de la toxina; esferas naranja, y residuo LYS18; fragmento amarillo.	30
Figura 14 Gráfica Energía en función de timestep del proceso de minimización del complejo 1 en vacío.	31
Figura 15 Complejo 1 minimizado en vacío. Cadena A y C de Kv1.3 en azul claro, VAL ⁴⁰⁶ de Kv1.3; esferas azul oscuro, residuos de aspartato de Kv1.3; fragmentos purpura, toxina MeuTXK α 1; gris, residuos VAL ¹ y PRO ²⁸ de la toxina; esferas naranja, y residuo LYS ¹⁸ ; fragmento amarillo.	31
Figura 16 Comparación pictográfica del complejo 1 antes (rojo) y después (azul) de ser minimizado. Kv1.3 se representa en color gris.	32
Figura 17 Complejo 1 minimizado en solvente (Izquierda). Comparación del complejo 1 minimizado en vacío (azul) y minimizado en solvente (verde) (Derecha). Las cadenas de Kv1.3 se representan en gris.	32
Figura 18 Complejo 2 antes de ser minimizado en vacío. Cadena A y C de Kv1.3 en azul claro, VAL ⁴⁰⁶ de Kv1.3; esferas azul oscuro, residuos de aspartato de	

Kv1.3; fragmentos púrpura, toxina MeuTXK α 3; residuos VAL ¹ y PHE ³⁶ de la toxina; esferas naranja, residuos de LYS ⁹⁻²⁷ ; fragmentos amarillos.	33
Figura 19 Gráfica de energía en función de timestep del proceso de minimización del complejo 2 en vacío.	34
Figura 20 Complejo 2 minimizado en vacío. Cadena A y C de Kv1.3 en azul claro, VAL ⁴⁰⁶ de Kv1.3; esferas azul oscuro, residuos de aspartato de Kv1.3; fragmentos purpura, toxina MeuTXK α 3; gris, residuos de la toxina; esferas naranja, y residuos LYS; fragmentos amarillos.	34
Figura 21 Comparación del complejo 2 antes (rojo) y después de la minimización (azul). Las cadenas de Kv1.3 se muestran en gris.	35
Figura 22 Complejo 3 antes de ser minimizado en vacío. Cadena A y C de Kv1.3 en azul claro, VAL ⁴⁰⁶ de Kv1.3; esferas azul oscuro, residuos de aspartato de Kv1.3; fragmentos purpura, toxina MeuTXK α 4; gris, residuos ILE ⁸⁻²⁶ de la toxina; esferas naranja, y residuo LYS ²³ ; fragmento amarillo.	36
Figura 23 Gráfica de energía en función de timestep del proceso de minimización del complejo 3 en vacío.	36
Figura 24 Complejo 3 minimizado en vacío. Cadena A y C de Kv1.3 en azul claro, VAL ⁴⁰⁶ de Kv1.3; esferas azul oscuro, residuos de aspartato de Kv1.3; fragmentos purpura, toxina MeuTXK α 4; gris, residuos ILE ⁸⁻²⁶ de la toxina; esferas naranja, y residuo LYS ²³ ; fragmento amarillo.	37
Figura 25 Comparación del complejo 3 antes (rojo) y después (azul) de ser minimizado. Kv1.3 se representa en color gris.	37
Figura 26 Gráfica Posición (Å) en función de TimeStep de los 3 complejos.	38
Figura 27 Gráfica Fuerza (pN) en función de Posición (Å) de los tres complejos.	39
Figura 28 Gráfica Fuerza (pN) en función de Posición (Å) para el complejo 1.	41
Figura 29 Gráfica Fuerza (pN) en función de Posición (Å) para el complejo 2.	42
Figura 30 Gráfica Fuerza (pN) en función de Posición (Å) para el complejo 3.	43
Figura 31 Secuencia de aminoácidos de las toxinas del veneno de <i>Mesobuthus eupeus</i> . Tomada de (Zhu et al., 2011).	43

Resumen del Proyecto

Existe una gran variedad de canales de potasio, los cuales se encargan de mediar el transporte de los iones K^+ a través de la membrana celular. Además cumplen múltiples funciones en la producción y generación de potenciales de acción, proliferación celular y apoptosis. Se seleccionó Kv1.3 como objeto de estudio de éste proyecto, debido a que, este canal se encuentra en la membrana plasmática y mitocondrial de los linfocitos T, y están estrechamente relacionados con el sistema inmune.

Se ha visto que al bloquear Kv1.3, disminuye la proliferación de linfocitos T activados. Estudios revelan que las toxinas del veneno del escorpión *Mesobuthus eupeus* tienen la capacidad de bloquear estos canales, por lo que son potentes inmunosupresores y pueden llegar a ser candidatas prometedoras para el uso farmacológico de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoidea y el lupus. Aunque aún se desconocen aspectos dinámicos importantes como la manera en la que se bloquea el canal, la geometría más estable del complejo canal-toxina formado y la fuerza necesaria para desbloquear el canal.

Este proyecto desarrolló una descripción computacional del proceso de bloqueo de los canales Kv1.3 por algunas de las toxinas del veneno de escorpión y de las fuerzas necesarias para desbloquearlo. Primero se modeló la estructura del vestíbulo exterior de Kv1.3. Luego se buscó la secuencia de aminoácidos de MeuTXK α 1, MeuTXK α 3 y MeuTXK α 4, y se modeló la estructura 3D utilizando el editor de estructuras del programa Chimera y una minimización con el código paralelizado de dinámica molecular; NAMD. Teniendo las toxinas y el canal se modelaron los complejos canal-toxina más estables o de menor energía libre en vacío y en solvente. Y por último se utilizó Steered molecular dynamics (SMD) para aplicar la fuerza necesaria para separar las toxinas del canal, obteniendo la magnitud de ésta.

Cuando terminaron las respectivas simulaciones, se obtuvo una estructura del vestíbulo exterior de Kv1.3 con una precisión mayor al 90%, la estructura de mínima energía de 3 toxinas y tres complejos canal-toxina, y la fuerza necesaria para separar cada complejo, donde se pudo observar que la toxina que más fuerza requiere para separarse de Kv1.3 es MeuTXK α 3, por lo que podría decirse que ésta es más afín por el canal que MeuTXK α 1 y MeuTXK α 4.

Palabras Clave: Minimización, vestíbulo exterior, simulación computacional, estructura 3D, NAMD.

Abstract

Potassium channels and their multiple functions on production and generation of action potential, cell proliferation and cell death are known. Kv1.3 channel is present on cellular membrane and mitochondrial membrane of Cell T and play a key role for activation, proliferation and death of them. This is the reason Kv1.3 channel was chosen for this study.

When Kv1.3 gets blocked, the proliferation of activated cells T decreases. Studies reveal that toxins from scorpion venom *Mesobuthus eupeus* are able to block this channel. Therefore they are potent immunosuppressive and they could be promising candidates to the development of a new drug for autoimmune diseases. However, some of the important dynamic aspects of the way these toxins block Kv1.3 are still unknown, such as the most stable geometry for the channel-toxin complex and how much force needed to separate it.

This project developed a computational description of the blocking process of Kv1.3 channel by venom scorpion toxins and the forces needed to unblock it. For the start-up, a model of Kv1.3 outer vestibule structure was made. The 3D structures of amino acid sequence of MeuTXK α 1, MeuTXK α 3 and MeuTXK α 4 were made using “structure editor” tool of Chimera software and a NAMD minimization. Using the toxins and the channel, Kv1.3 – toxin complexes were built by NAMD minimization to find the most stable structure in vacuum and solvent. Finally, Steered Molecular Dynamics were used to apply a force to the system to separate the toxins from the channel and obtained the magnitude of this force.

At the end of experimental work, (1) An outer vestibule of Kv1.3 with accuracy higher than 90%, (2) lowest energy 3D structures of venom scorpion toxins and channel – toxin complexes, and (3) force needed to separate the complexes, were obtained.

Additionally, it was found that the toxin which required the higher force to leave Kv1.3 and to separate the complex is MeuTXK α 3. The reason is that, the MeuTXK α 3 toxin has greater affinity for Kv1.3 than MeuTXK α 1 and MeuTXK α 4.

Key words: Minimization, outer vestibule, computational simulation, 3D structure, NAMD.

1. Introducción

Los canales de potasio Kv1.3 han sido ampliamente estudiados en los últimos años, dada la función que presta en el sistema inmune, más específicamente con los linfocitos T. Esto los hace diana o blancos terapéuticos muy prometedores para modular disfunciones inmunológicas (Rashid et al., 2013). Algunas investigaciones revelan que al bloquear estos canales disminuye significativamente la proliferación de células T activadas (Gulbins, Sassi, Grassme, Zoratti, & Szabo, 2010). Por lo anterior, la búsqueda de moléculas con la capacidad de bloquear estos canales de forma selectiva, podrían ser la base para el desarrollo de un nuevo tratamiento farmacológico para enfermedades como la artritis reumatoide, el lupus, la enfermedad de Adison, entre otras.

En los últimos años se ha estudiado gran variedad de péptidos provenientes del veneno de distintos animales como el escorpión, la serpiente o las arañas, debido a que brindan gran cantidad de péptidos con actividad sobre Kv1.3. Además, son una nueva y mejor alternativa que el desarrollo de moléculas pequeñas, las cuales son muy difíciles de identificar (Edwards et al., 2014). Uno de los estudios muestra como unas toxinas provenientes del veneno del escorpión *Mesobuthus eupeus*, bloquean las corrientes de Kv1.3 a una concentración de tan solo 100pM (Gao, Peigneur, Tytgat, & Zhu, 2010). Adicionalmente, una de éstas toxinas, denominada MeuTXK α 1, presenta mayor afinidad y selectividad por Kv1.3, que su ortóloga BmP01 (Zhu et al., 2011).

A partir de los resultados de estos estudios surgen interrogantes que pueden proponer temas de investigación como: ¿Cómo es el proceso de bloqueo? ¿Cuál es la forma más estable del complejo canal-toxina que se forma cuando se da el bloqueo? y ¿Cuál es la fuerza necesaria para separar la toxina del canal? Es importante conocer todos estos aspectos debido a que, así se podrá realizar una descripción aproximada de cómo se da el bloqueo, predecir qué tan estable es el complejo que se forma y cuál de las toxinas estudiadas podría ser más afín por el canal Kv1.3. Todo esto puede permitir en el futuro diseñar péptidos similares a estas toxinas, que pueden llegar a ser altamente específicos para estos canales y que permitan modular o tratar terapéuticamente algunas patologías autoinmunes.

En este trabajo se estudian algunos aspectos de tres de las toxinas del veneno de *Mesobuthus eupeus* (MeuTXK α 1, MeuTXK α 3 y MeuTXK α 4), como son: 1) la estructura de cada toxina en su configuración de menor energía libre, 2) la interacción de cada una de las toxinas con el vestíbulo exterior de Kv1.3, y 3) se

numeran los diferentes tipos de atracciones intermoleculares o no covalentes que se dan entre las toxinas y el canal.

El propósito principal del proyecto, fue realizar una descripción computacional (In-Silico) de aspectos moleculares del bloqueo de Kv1.3 por tres toxinas de *Mesobuthus eupeus* empleando dinámica molecular y Steered Molecular Dynamics. Para lograr modelar estas interacciones y estimar las fuerzas de interacción entre las toxinas y el canal, primero se modeló el vestíbulo exterior del canal (turreta, poro y filtro), mediante comparative modeling utilizando a rKv1.2 como secuencia plantilla, es decir, su estructura y secuencia de aminoácidos fueron tomadas como base (Patel, 2008). Posteriormente, las estructuras 3D de cada una de las toxinas se modelaron haciendo minimizaciones de la cadena lineal de aminoácidos. Al tener las toxinas y el canal se encontraron los complejos canal-toxinas de mayor estabilidad y menor energía libre. Y por último, se le aplicó una fuerza al sistema mediante Steered Molecular Dynamics, para separar los complejos.

En la discusión de los resultados obtenidos mediante las simulaciones, se abarcan distintos factores que pueden influenciar en la magnitud de la fuerza requerida para separar los complejos; como la cantidad y el tipo de interacciones intermoleculares entre el canal y cada una de las toxinas, y la presencia o ausencia de ciertos residuos en las toxinas que pueden aumentar su afinidad por los canales de potasio.

La ventaja de hacer modelamiento in silico radica en que es una estrategia económica y amigable con el medio ambiente dado que permite estimar las probabilidades de que ocurra un suceso físico previo a la costosa tarea de los ensayos experimentales.

2. Descripción del proyecto

2.1 Planteamiento del problema de investigación

Los canales de potasio Kv1.3 están estrechamente relacionados con la función del sistema inmune y se conoce que al ser bloqueados disminuye la proliferación de linfocitos T citotóxicos activados (Gulbins et al., 2010).

Los estudios a niveles biofísico, bioquímico y biomolecular han mostrado que algunas de las toxinas del veneno del escorpión *Mesobuthus eupeu* tienen la capacidad de bloquear estos canales (Gao et al., 2010; Zhu et al., 2011). Esto las convierte en candidatas para ser utilizadas como moléculas inhibitoras de la proliferación de células T activadas y así modular o tratar enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide y el lupus.

A partir de los resultados de estos estudios surgen interrogantes que pueden proponer temas de investigación como: ¿Cómo es el proceso de bloqueo? ¿Cuál es la forma más estable del complejo canal-toxina que se forma cuando se da el bloqueo? y ¿Cuál es la fuerza necesaria para separar la toxina del canal?

Este proyecto estudió cómo estas toxinas bloquean el canal Kv1.3, modeló el complejo canal-toxina con la menor energía libre y determinó la fuerza necesaria para separarlo mediante una simulación computacional. Todo esto con el objetivo de tener una descripción aproximada de cómo se da el bloqueo, predecir qué tan estable es el complejo que se forma y cuál de las toxinas estudiadas es más afín por canal Kv1.3.

Al describir aspectos dinámicos, a nivel *in silico* (computacional), del bloqueo del canal Kv1.3 por algunas toxinas del escorpión *Mesobuthus eupeus*, el presente proyecto sirvió para tener una predicción aproximada de acerca de cuál de las toxinas estudiadas era la más afín por Kv1.3, además ofrece una forma económica y amigable con el medio ambiente para estudiar el comportamiento de éstos péptidos frente a los canales de potasio.

Los resultados obtenidos presentan un aporte a nivel mundial, respecto a la estructura más probable de las toxinas MeuTXK α 1, MeuTXK α 3 y MeuTXK α 4, la

geometría de menor energía libre del complejo formado por cada una de estas toxinas y Kv1.3, en vacío y en solvente. Y la fuerza necesaria para separar los complejos. También se plantea una nueva toxina como candidata para el desarrollo de un fármaco inmunoregulador; MeuTXK α 3, debido a su gran afinidad por el canal. Adicionalmente, la metodología utilizada puede ser establecida para estudiar los aspectos dinámicos del bloqueo de Kv1.3, o cualquier otro canal que se encuentre reportado en el Protein Data Bank (PDB), por distintos péptidos, incluyendo mutaciones de las toxinas de *Mesobuthus eupeus*, u otros animales. Los Potenciales beneficiarios de estos hallazgos son las industrias o instituciones dedicadas a la investigación de nuevos fármacos

Adicionalmente, el presente proyecto brinda un análisis de las fuerzas no-covalentes presentes en los complejos canal-toxina, donde se explica el por qué MeuTXK α 3 requiere una fuerza mayor para separarse de Kv1.3, en comparación a MeuTXK α 1 y MeuTXK α 4.

A largo plazo, las posibles continuaciones de este proyecto pueden servir para explorar mutantes de las toxinas que también puedan llegar a ser promesas de uso farmacológico. Para esto se requiere de una exploración de las toxinas a nivel bioinformático. También se recomienda realizar más estudios sobre MeuTXK α 3, para establecer si cumple con los demás requisitos; selectividad, seguridad, tiempo de vida media, etc, para ser parte de un nuevo tratamiento médico contra enfermedades autoinmunes.

2.2 Marco teórico y estado del arte

Muchas células producen impulsos eléctricos o potenciales de acción, los cuales se propagan por la superficie de sus membranas y tienen la capacidad de viajar rápidamente a través del organismo. Su llegada a distintas células produce reacciones como liberación de neurotransmisores y contracción muscular. Por esta razón los potenciales de acción son los responsables de que muchos organismos tengan la capacidad de procesar información en el sistema nervioso, moverse, realizar trabajos de fuerza, etcétera (Jiang et al., 2003).

Para que las células puedan producir y propagar los potenciales de acción se necesita que la membrana pueda someterse a cambios transitorios en la permeabilidad de iones de sodio y potasio, y que la permeabilidad de ésta dependa de su voltaje. Éstos dos elementos clave son posibles gracias a la presencia de un grupo de proteínas de membrana llamado canales dependientes de voltaje, en el cual se encuentran los canales de K⁺, Na⁺ y Ca⁺. (Jiang et al.,

2003). Además, algunos de estos canales tienen un papel importante en la proliferación celular y la apoptosis (Gulbins et al., 2010).

Respecto a los canales de potasio dependientes de voltaje; son ellos los encargados de controlar la difusión de iones K^+ a través de la membrana y su apertura y cierre está controlada por el voltaje de ésta (Doyle et al., 1998). Algunos canales de potasio también controlan el paso de calcio a través de la membrana, el pH del citoplasma, el volumen de células en proliferación, la migración celular y la señalización con calcio (Gulbins et al., 2010); (Zhu et al., 2011). Los canales de potasio tienen diversos mecanismos de cierre y apertura, pero la permeabilidad de todos ellos es muy similar. Estos canales se caracterizan por tener una selectividad alta a los iones K^+ y Rb^+ , baja a iones Cs^+ y prácticamente nula por los iones Na^+ . Otra característica común de todos los canales de potasio es que son “canales de poro largo” ya que en el interior del prolongado y estrecho poro varios iones se alinean como si estuvieran haciendo un fila (Doyle et al., 1998).

Existen dos tipos de canales de potasio, aquellos que contienen dos segmentos tras membrana por subunidad, y los que contienen seis, para ambos grupos la estructura funcional es un tetrámero cuyas subunidades son idénticas. Todos los canales de potasio tienen esencialmente el mismo poro y una secuencia de aminoácidos crítica (ver figura 1), la cual es vital para el cumplimiento de sus funciones, y al presentarse cualquier mutación en ella se altera significativamente la capacidad del canal para discriminar iones Na^+ , disminuyendo su selectividad y por ende arruinando la proteína (Doyle et al., 1998).

En la figura 1 se pueden apreciar las secuencias de varios canales de potasio alineadas, donde se resaltan los aminoácidos críticos del filtro de selectividad y del revestimiento de la cavidad y el poro interno en rojo y azul, respectivamente. Los residuos resaltados con color gris son aquellos cuya naturaleza de la cadena lateral se conserva en más del 50% de canales (Doyle et al., 1998).

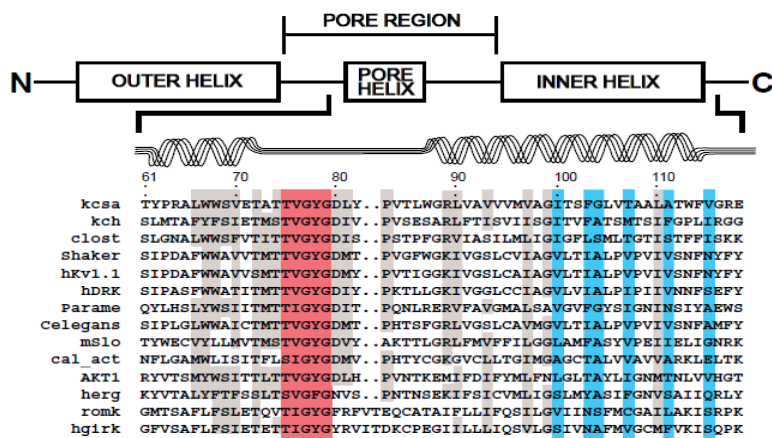


Figura 1 Alineación de secuencia de canales de K⁺ seleccionados. Tomada de Doyle et al., 1998.

Respecto al canal Kv1.3, se conoce que son los canales de potasio dependientes de voltaje que se expresan tanto en la membrana celular de los linfocitos T citotóxicos humanos, como también en la membrana interna de la mitocondria. Su activación es fundamental para la proliferación de estas células. Tanto la inhibición como la ausencia o baja regulación de Kv1.3 producen la muerte celular inducida por múltiples estímulos apoptóticos. Estos estímulos surgen debido a la hiperpolarización de la célula, resultado de la inhibición del flujo de cargas positivas, la cual provoca una reducción de componentes de la cadena respiratoria como los centros Fe/S, los citocromos y la piscina ubiquinona, y un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno. Debido a esto, cualquier sustancia que tenga la capacidad de bloquear selectivamente estos canales, será un potente inmunosupresor (Gulbins et al., 2010).

Actualmente los canales iónicos son blanco de muchas investigaciones para el desarrollo de nuevos fármacos, pero el desarrollo de moléculas pequeñas que puedan inhibirlos ha sido limitado por la gran dificultad de identificarlos. Por lo que el veneno de animales como arañas, escorpiones y serpientes han proveído una nueva alternativa (Edwards et al., 2014). El escorpión ha desarrollado y evolucionado una gran cantidad de toxinas que afectan los canales de potasio, llamadas KTx. Estas toxinas son péptidos que se pueden dividir en cuatro grupos; α , β , γ y κ . A excepción de κ , los grupos comparten un motivo estructural conservado, compuesto de un α -hélice y una lámina β con dos hebras en sentido antiparalelo (ver figura 2) (Zhu et al., 2011); (Gao et al., 2010) (Rodríguez de la Vega, Merino, Becerril, & Possani, 2003) (France, Eauclore, & Bougis, 2012). En el presente proyecto se trabajará con toxinas del grupo α .

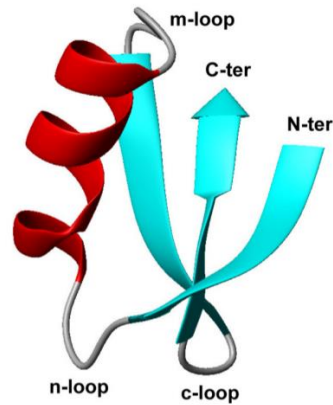


Figura 2 estructura ribbon de la toxina BeKm-1. Tomada de Zhu et al., 2011.

Estudios de la capacidad bloqueadora de algunas de las toxinas del escorpión *Mesobuthus eupeus* mostraron que un coctel de toxinas bloqueadoras de canales de potasio; MeuTXK, a una concentración de 100pM, tiene un efecto inhibitorio sobre la corriente de Kv1.3 cuando el potencial esta entre -25 y 75 mV (ver figura 3), aunque el voltaje medio de activación ($V_{1/2}$) no varía significativamente, lo cual indica que MeuTXK no afecta el mecanismo de apertura y cierre del canal (Gao et al., 2010). Al estudiar las toxinas de forma individual, se encontró que MeuTXK α 1 a una concentración de 3 μ M, inhibe la corriente de iones K^+ de los canales rKv1.1, hKv1.3 y *Shaker* IR en un 35%, 100% y 70%, respectivamente. Al compararla con BmP01, una toxina ortóloga a ella contenida en el veneno del escorpión *Mesobuthus martensii*, se encontró que MeuTXK α 1 tiene un efecto más potente sobre Kv1.3, además es más afín por éste, y más selectiva entre Kv1.3 y Kv1.1. Por esta razón MeuTXK α 1 se considera una candidata prometedora para el desarrollo de un nuevo fármaco para el tratamiento de enfermedades autoinmunes (Zhu et al., 2011).

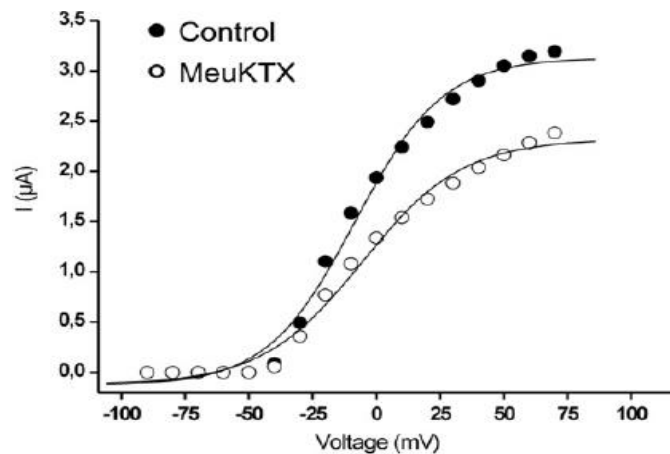


Figura 3 relación corriente-voltaje en un experimento representativo en control y en presencia de MeuKTX a 100Pm. Tomada de Gao et al., 2010.

Cabe recordar que existen tres tipos de atracción intermolecular entre moléculas neutras: fuerzas dipolo – dipolo, dispersión de London y puentes de hidrogeno, las cuales son también llamadas fuerzas de van der Waals. Otro tipo de fuerzas atractivas son debidas a las interacciones ion-dipolo, las cuales se dan entre una molécula cargada, ion, y el extremo parcialmente cargado (dipolo), con una carga opuesta, de una molécula polar. Las fuerzas dipolo-dipolo surgen cuando el extremo positivo de una molécula polar neutra se acerca al extremo negativo de otra, por lo general son más débiles que las fuerzas ion-dipolo. Por otro lado, los átomos y moléculas apolares no pueden tener de este tipo de interacciones porque no poseen un dipolo permanente, no obstante, la perturbación de los electrones más externos de la molécula por otras moléculas cercanas induce un momento dipolar. La magnitud de este dipolo inducido depende de la polarizabilidad de las nubes electrónicas de átomos o moléculas. Los enlaces de hidrógeno son un tipo especial de atracciones intermoleculares, que se dan entre el átomo de hidrogeno de un enlace tipo H-F, H-N ó H-O, y electrones de no enlace de una molécula o átomo. Aunque este tipo de interacciones son mucho más débiles que los enlaces covalentes, son significativamente más fuertes que las tipo dipolo-dipolo o de dispersión de London (Brown, LeMay, & Bursten, 2006).

Respecto a las interacciones no covalentes entre los átomos de biomoléculas como las proteínas, existen interacciones electrostáticas, de van der Waals y no polares. Las interacciones o fuerzas electrostáticas ocurren entre átomos, moléculas o residuos total o parcialmente cargados, pueden ser atractivas o repulsivas y se dividen en; interacciones iónicas; que ocurren entre átomos, moléculas y/o residuos totalmente cargados, y se les conoce también como puentes salinos. Puentes de hidrogeno (explicados en el párrafo anterior), que juegan un papel importante en la estructura de las proteínas, porque determinan su empaquetamiento, y además, participan en la asociación de proteínas con diferentes ligandos, entre otros. La energía de estas interacciones depende de tres factores: la magnitud de las cargas que interactúan, la distancia entre ellas y la constante dieléctrica del medio. Las interacciones electrostáticas son de largo alcance y juegan un papel primordial a nivel de estructura y función de las proteínas. Es importante resaltar que entre mayor sea la constante dieléctrica del medio, las interacciones electrostáticas serán más débiles, por lo que en un medio acuoso, como el citoplasma o el torrente sanguíneo, éstas fuerzas podrían no ser tan intensas como se esperaría. Otros tipos de interacciones electrostáticas se presentan cuando un átomo de azufre, que posee una alta densidad electrónica, interactúa con átomos polares como el oxígeno, nitrógeno e hidrogeno, y cuando se involucran dos anillos aromáticos, debido a la carga parcial que proveen los orbitales π , estos dos tipos de interacciones electrostáticas se caracterizan por ser mucho más débiles que los puentes salinos y los puentes de hidrogeno, pero aun así, son importantes en la unión de las proteínas y sus ligando (Kessel & Ber-Tal, 2011).

Las interacciones tipo van der Waals, aunque son muy débiles en comparación con otras interacciones no covalentes, son significativas en sistemas biológicos, debido a que se dan entre cualquier par de átomos adyacentes. Por último, están las interacciones apolares y el efecto hidrofóbico, las cuales se presentan cuando un soluto apolar se intenta disolver en agua, pero éste forma agregados que reducen el área de contacto entre él y el solvente (Kessel & Ber-Tal, 2011).

El conocimiento y entendimiento de las interacciones no covalentes en las biomoléculas es muy importante, debido a que éstas son fundamentales en el empaquetamiento de las proteínas, su estructura, su flexibilidad y su capacidad de hacer cambios conformacionales.

Aun así, conocer y comprender las interacciones no es suficiente para determinar la estructura y la dinámica de una proteína. Para eso existen diversos métodos experimentales como; la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear (NMR), que a pesar de que han sido muy útiles para determinar la estructura 3D de muchas proteínas, la cantidad de estructuras establecidas es significativamente menor al número de secuencias proteicas conocidas (Patel, 2008).

Las técnicas computacionales permiten emplear varios de los métodos teóricos utilizados para predecir la estructura de las proteínas a partir de su secuencia de aminoácidos. Estos métodos se basan en principios fisicoquímicos, usualmente recurren a encontrar la conformación de mínima energía para la proteína en estudio, y se caracterizan por ser computacionalmente sofisticados. También existen métodos empíricos donde los esquemas predichos son dilucidados a partir del análisis de una proteína cuya estructura ya se conoce (Voet & Voet, 2004). Comparative modeling es una forma de determinar la estructura de una proteína basada en la similitud de las secuencias de una proteína de estructura desconocida (secuencia blanco) y otra cuya estructura ya se ha establecido (secuencia plantilla). Cuando la semejanza entre la secuencia blanco y la secuencia plantilla está entre el 30 y el 40%, la estructura producida tendrá un rango de precisión promedio de 75-90%. Y cuando la semejanza es mayor al 40% se podrá obtener una precisión mayor al 90% (Patel, 2008).

Otro aspecto importante de éste proyecto es la herramienta que se utilizará para llevarlo a cabo, cuya base es la modelación molecular, la cual puede entenderse como las formas para emular el comportamiento de las moléculas y los sistemas moleculares (Leach, 2001), o como la generación, manipulación, cálculo y predicción de estructuras moleculares realistas y asociadas con sus

características fisicoquímicas y bioquímicas. Esta herramienta sirve como puente entre la teoría y la experimentación para extraer resultados de un modelo en particular, comparar los resultados experimentales de un sistema, comparar las predicciones teóricas que se le han hecho a un modelo, entender e interpretar las observaciones realizadas experimentalmente, proveer información no disponible en los experimentos reales, entre otros (Tsai, 2002). En este proyecto, como en la mayoría de modelamientos que se hacen en la actualidad, se hará modelamiento molecular con técnicas computacionales que permiten realizar cálculos y modelos más extensos en menor tiempo y de manera menos compleja (Leach, 2001). Una de las técnicas a emplear es la simulación computacional de dinámica molecular, que es bastante útil para obtener ideas más profundas acerca de sistemas biológicos usando varios niveles de descripción. Por esta razón se han aplicado en muchas áreas generales de la bioquímica como el estudio de proteínas, entendimiento de la permeabilidad y los mecanismos de apertura y cierre de canales iónicos, caracterización de cambios conformacionales de quinasas, entre otros (Jeong et al., 2014).

A pesar de que la dinámica molecular es una técnica muy útil, el análisis de una gran cantidad de datos de trayectorias con muchos átomos aun es un reto, ya que se requiere el entendimiento de varios métodos de análisis y estar familiarizado con el lenguaje de programación, la escritura de los comandos suele consumir mucho tiempo, incluso para usuarios calificados, y se requiere una alta capacidad de cómputo para que los cálculos y el procesamiento de la información no se conviertan en procesos exageradamente largos. En la actualidad se desarrollan múltiples recursos computacionales como programas y paquetes de softwares para facilitar la simulación de dinámica molecular, volviéndola cada vez más popular (Jeong et al., 2014).

Eventos biológicamente importantes que requieren de la transición de un estado de equilibrio a otro, como la unión o separación de un ligando, o el bloqueo y desbloqueo de un canal, son difíciles de reproducir con dinámica molecular. Para estos casos, la aplicación de una fuerza externa puede ser usada para guiar al sistema de un estado de equilibrio al otro a lo largo de una vía de interés. Steered molecular dynamics (SMD) es un complemento *in silico*, en el cual se aplican fuerzas externas a las moléculas en simulación para probar propiedades mecánicas y acelerar procesos. Este método se puede realizar empleando una fuerza constante sobre un átomo o grupo de átomos o mediante una restricción armónica. SMD brinda múltiples facilidades para usar una fuerza externa, incluyendo la aplicación automática de constantes de movimiento y la selección de la dirección de la fuerza mediante su especificación en pocas líneas de un archivo de configuración para NAMD (Phillips et al., 2005). SMD induce la separación de ligando y cambios conformacionales en biomoléculas en escalas de tiempo accesibles para simulaciones de dinámica molecular, aplicando fuerzas

dependientes de tiempo a un sistema y analizando la respuesta de éste. A pesar de ser pionero en éste campo, SMD ya ha brindado información valiosa acerca de rutas de unión a ligandos y propiedades elásticas de proteínas (Isralewitza et al., 2001).

NAMD es un código paralelizado de dinámica molecular diseñado para realizar simulaciones de alto rendimiento en sistemas biomoleculares grandes. Este programa tiene la capacidad de trabajar a escalas de cientos de procesadores de plataforma paralela de alta gama, como en decenas de procesadores unidos en clústeres de bajo costo y aún en un computador personal. NAMD trabaja con funciones potenciales de AMBER y CHARMM, y parámetros y formatos de archivo. Además, se complementa con VMD para ofrecer un ambiente de modelación completo (Phillips et al., 2005).

VMD es un programa de gráficos moleculares diseñado para visualizar y analizar grandes ensamblajes de moléculas como polímeros, proteínas y ácidos nucleicos. VMD tiene la capacidad de mostrar varias estructuras usando una gran variedad de estilos y colores. Una sesión simple de VMD contiene tres componentes esenciales; la pantalla de gráficos, donde las moléculas son reproducidas, rotadas, trasladadas y escaladas de forma interactiva, la interface gráfica del usuario donde se encuentran todas las opciones de reproducción (estilos, colores, selección de átomos) y la consola de VMD (Humphrey, Dalke, & Schulten, 1996).

2.3 Objetivos

- **Objetivo General**

Describir el proceso de bloqueo de Kv1.3 por algunas toxinas del veneno de *Mesobuthus eupeus*, empleando la técnica Steered Molecular Dynamics (SMD).

- **Objetivos específicos**

Modelar la turreta, el poro y el filtro de Kv1.3 a partir de la secuencia de aminoácidos y tomando como base la estructura de un canal de potasio ya cristalizado

Modelar la estructura 3D de las toxinas a partir de la secuencia de nucleótidos o aminoácidos, empleando MEGA 5, Chimera y Dinámica Molecular (MD).

Encontrar las configuraciones de equilibrio de cada uno de los complejos canal – toxina.

Determinar la fuerza necesaria para separar las diferentes toxinas de Kv1.3 utilizando la técnica steered molecular dynamics (SMD).

2.4 Metodología Utilizada

- Matriz de marco lógico

Objetivo General: Describir el proceso de bloqueo de Kv1.3 por algunas toxinas del veneno de <i>Mesobuthus eupeus</i> , empleando la técnica Steered Molecular Dynamics (SMD).			
El supuesto general , que aplica a todos los objetivos específicos es; el computador debe funcionar correctamente, no se deben borrar los archivos ni apagar el computador mientras corren los cálculos.			
Objetivos Específico	Actividad	Indicadores	Supuestos
Modelar la estructura de la turreta, el poro y el filtro de Kv1.3 a partir de la secuencia de aminoácidos y tomando como base la estructura de un canal de potasio ya cristalizado	Descargar la subunidad del PDB.	Archivos .pdb y .psf de la estructura tetramérica de Kv1.3	El archivo de la subunidad de Kv1.3 debe encontrarse en la base de datos.
	Multiplicar y acomodar la subunidad de manera que se forme el poro del canal.		
	Generar los archivos .pdb y .psf		
Modelar la estructura 3D de las toxinas a partir de la secuencia de nucleótidos o aminoácidos, empleando MEGA 5, Chimera y Dinámica	Buscar la secuencia de nucleótidos o aminoácidos de cada toxina	Archivos .pdb de las toxinas.	La secuencia de aminoácidos debe estar registrada en su totalidad.
	Generar la cadena lineal de		

Molecular (MD).	aminoácidos.		
	Encontrar la configuración en 3D más estable para cada toxina.		
	Generar los archivos .pdb de cada toxina		
Encontrar las configuraciones de equilibrio de cada uno de los complejos proteína – toxina.	Unir los archivos .pdb del canal y las toxinas para formar el complejo.	Configuración de mínima energía libre del complejo proteína-toxina.	Las toxinas debe encajar en el poro de Kv1.3, haciendo que se dé el bloqueo y se forme el complejo.
	Minimizar la energía libre del complejo		
Medir la fuerza necesaria para separar las diferentes toxinas de Kv1.3 utilizando la técnica steered molecular dynamics (SMD).	Fijar el canal en el espacio.	Magnitud de la fuerza necesaria para separar cada una de las toxinas del canal.	Se debe dar el bloqueo de poro, y la fuerza para desbloquearlo debe ser de una magnitud que se pueda medir con la técnica empleada.
	Aplicar una fuerza sobre la toxina hasta que se separe del canal.		
	Generar las gráficas Fuerza vs posición, para determinar la magnitud de la fuerza necesaria para separar el complejo		

- Modelamiento de la turreta, el poro y el filtro de Kv1.3; a partir de su secuencia de aminoácidos (ver figura 4) y tomando como base el canal rKv1.2 de ratón, que ya ha sido cristalizado y se encuentra en el Protein Data Bank bajo el código 2A79. Se generan las demás subunidades

Se accedió a la página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> y se buscó cada una de las toxinas. Se guardó el archivo en formato FASTA.

Se abrió el archivo FASTA que contenía la secuencia de aminoácidos con el programa Chimera y se copió la secuencia. Luego se utilizó la herramienta “build structure”, la cual debe estar en la opción “peptide” donde se pegó la secuencia de aminoácidos. En la ventana Add Peptide Sequence se ajustaron los ángulos ϕ y ψ para aquellos fragmentos de los péptidos que son α -hélices y aquellos que son laminas- β , la información necesaria para ajustar estos parámetros se encuentra en las figuras 2a, 3a y 4b de (Zhu et al., 2011). Después se utilizó la herramienta “minimize structure” para modelar la estructura en 3D.

Por último, se realizó otra minimización, pero esta vez utilizando el programa NAMD y los archivos .conf (el cual se genera manualmente siguiendo las instrucciones planteadas en <http://www.ks.uiuc.edu/Training/Tutorials/namd/namd-tutorial-win-html/node27.html>), .pdb de la toxina (generado por chimera en el paso anterior), el .psf que se obtiene con vmd y Automatic PSF builder. Esto con el objetivo de hacer una minimización, cuyos arreglos sean representativos y completos.

- Bloqueo de Kv1.3 por las toxinas y modelación del complejo canal-toxina en vacío y en solvente (agua), por medio de una minimización de la energía del complejo formado. Por último se crearon los archivos pdb y .psf (Basándose en la metodología explicada por (Aksimentiev et al., 2012)).

Para este paso, solo se utilizaron dos de las cuatro subunidades de Kv1.3, una frente a la otra, con el fin de disminuir el tiempo de cálculo y facilitar la ubicación de la toxina. Como las cuatro subunidades son idénticas, la aproximación obtenida utilizando dos subunidades es igualmente válida. Primero se unieron los archivos .pdb del canal y de cada una de las toxinas, utilizando el editor de texto, para tener la toxina y el canal en un mismo archivo. Luego se ubicó la toxina lo más cerca posible a la turreta del canal, utilizando la herramienta del mouse “move → fragment”. Cuando la toxina estaba ubicada, se guardaron estas coordenadas en un archivo .pdb nuevo, el cual contendrá el complejo canal-toxina. A partir de ese archivo .pdb se generó el archivo .psf y se corrió la minimización fijando las dos subunidades del canal, para saber cómo era la estructura de menor energía libre.

Para modelar los complejos canal-toxina en solvente, después de ubicar la toxina y generar los archivos .pdb y .psf, se utilizó el script wat_sphere.tcl (se encuentra en la página <http://www.ks.uiuc.edu/Training/Tutorials/namd/namd-tutorial-files/1-1->

[build/](#)) previamente adaptado al trabajo que se ha realizado. Cuando se obtuvo el complejo solvatado, se corrió la minimización congelando las moléculas de agua y fijando las dos subunidades del canal.

- Separación del complejo canal-toxina utilizando SMD. Análisis de las gráficas de fuerza vs posición y potencial de fuerza media vs posición, para determinación la magnitud de la fuerza necesaria para desbloquear el canal, es decir, separar la toxina de éste. Tomada de (Gumbart, 2011))

Primero se ajustaron los parámetros de constante de fuerza (10 kcal/mol\AA^2), velocidad ($20\text{\AA}/\text{ns}$) y dirección (0,0,1) en el archivo .pdb del complejo canal-toxina generando anteriormente. Es muy importante que estos parámetros sean los mismos para cada complejo, con el fin de que la única variante sea la afinidad de cada toxina por el canal

Luego se hicieron las restricciones necesarias para que la fuerza que se aplicó no afecte al canal, y para que la toxina solo se mueva en la dirección que se desea (eje z).

Se corrió la simulación. Cuando esta concluyó, se crearon las gráficas de fuerza en función de posición utilizando gnuplot y los archivos generados.

2.5 Resultados

2.5.1 Tetrámero de Kv1.3

Kv1.3 es una proteína transmembrana compuesta de cuatro subunidades idénticas, cada una contiene dos helices- α (S5 y S6), una turreta (bucles de la parte superior), un poro conformado por una helice- α más corta las dos anteriores y un filtro (formado por un bucle que va desde la parte inferior del poro a la superior). De este canal, la turreta, el poro y el filtro de selectividad son las partes modeladas para este trabajo y un esquema de este se puede apreciar claramente en la figura 5. En ésta, se resaltan los residuos que se cree que son los encargados de interactuar con las toxinas para que se de el bloqueo ; valina 406 (VAL⁴⁰⁶) ubicada al final del filtro (esferas azul oscuro) (Zhu et al., 2011) y varios residuos de aspartato (ASP) en la turreta el poro y el filtro (fragmentos purpura).

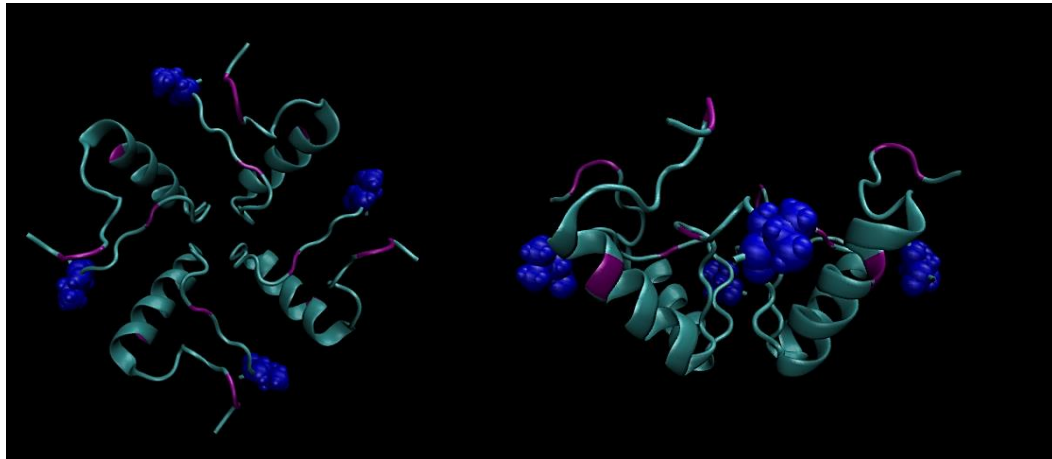


Figura 6 Canal Kv1.3, turreta, poro y filtro. Valina 406; esferas azul oscuro, Aspartato; fragmentos purpura.

Para el modelamiento de los complejos canal-toxina, solo se usaron dos de las cuatro subunidades, como se dijo anteriormente en la sección de metodología. Las subunidades que se utilizaron son la cadena A y C del canal Kv1.3, las cuales se ubican una frente a la otra, y se pueden apreciar, junto con los residuos de valina y aspartato, en la figura 6.

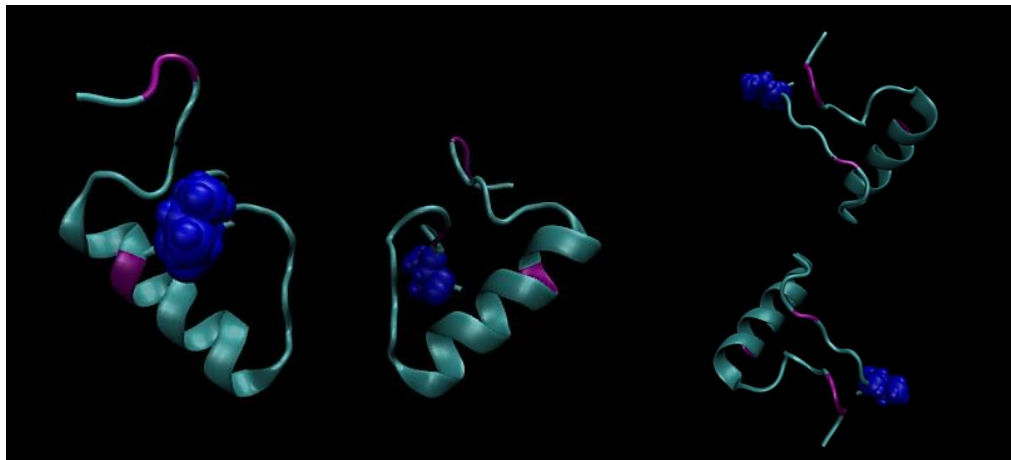


Figura 7 Cadenas A y C del canal Kv1.3. Valina 406; esferas azul oscuro, aspartato; fragmentos purpura.

2.5.2 Estructura 3D de las toxinas MeuTXK α 1, MeuTXK α 3 y MeuTXK α 4

2.5.2.1 Estructura 3D de MeuTXK α 1

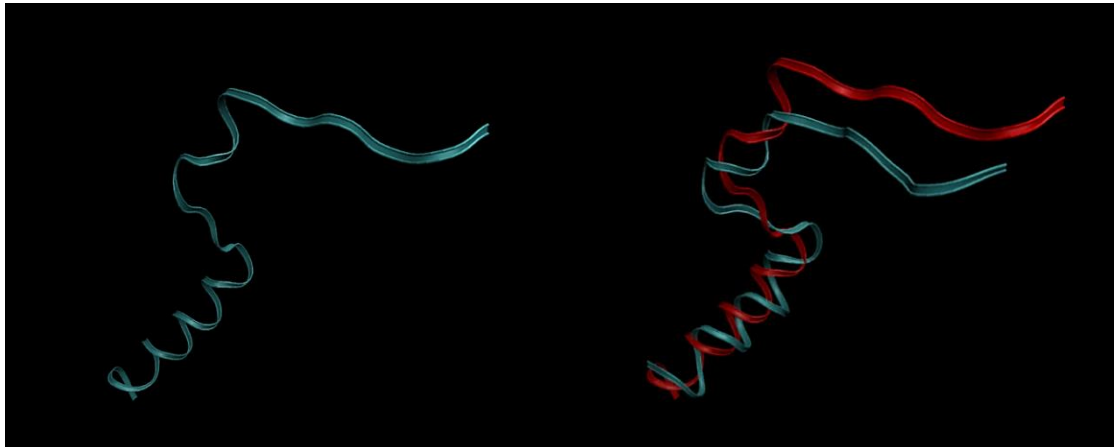


Figura 8 Toxina MeuTXK α 1 obtenida con Chimera (Izquierda). Comparación de la estructura 3D de MeuTXK α 1 antes (rojo) y después de la minimización (azul) (Derecha)

MeuTXK α 1 es un péptido con 28 residuos y 427 átomos, tiene una carga total de -2. Como se puede observar en la figura 7, después de la minimización realizada con el programa Chimera, la estructura 3D de la toxina MeuTXK α 1 es poco compacta y en ella se diferencian claramente un α -hélice (parte inferior) y dos laminas- β (al centro y en la parte superior).

Al terminar la minimización con NAMD, la energía total de la toxina disminuyó de 369kcal/mol a -808kcal/mol, manteniéndose constante en este valor a partir del timestep 10000 aproximadamente, lo que indica que en este momento la minimización terminó (ver figura 8)

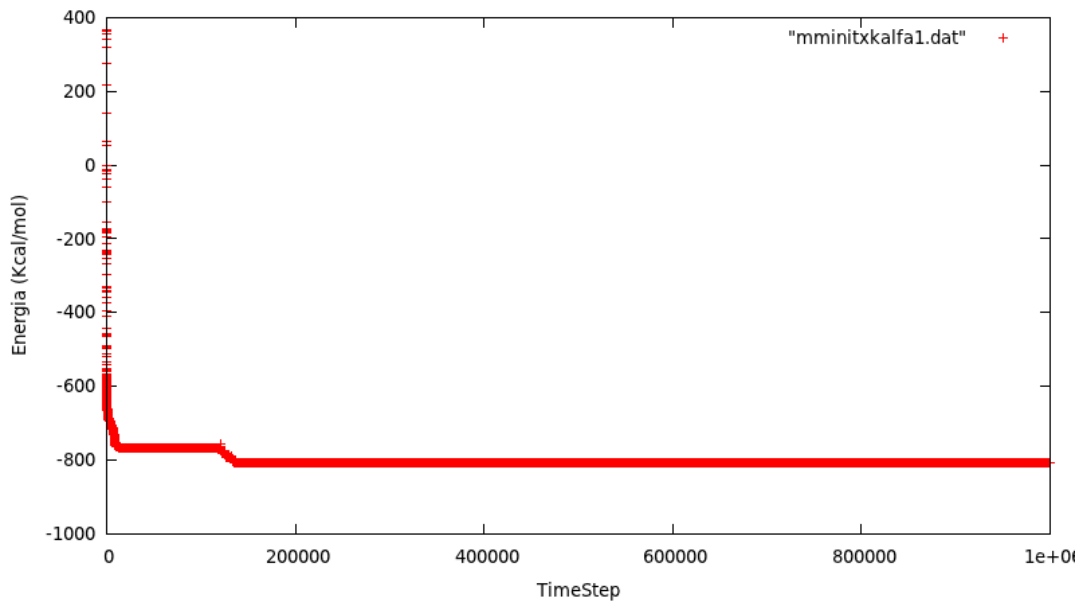


Figura 9 Gráfica de energía en función de timestep del proceso de minimización de MeuTXKα1

Además de una estructura con menor energía libre total, la minimización dio como resultado un péptido más compacto donde se conserva el modelo estructural de una hélice- α y dos láminas- β en sentido antiparalelo. Como se puede observar en la figura 7, la principal diferencia entre la estructura inicial y la estructura minimizada es el nivel de compactación.

2.5.2.2 Estructura 3D de MeuTXKα3

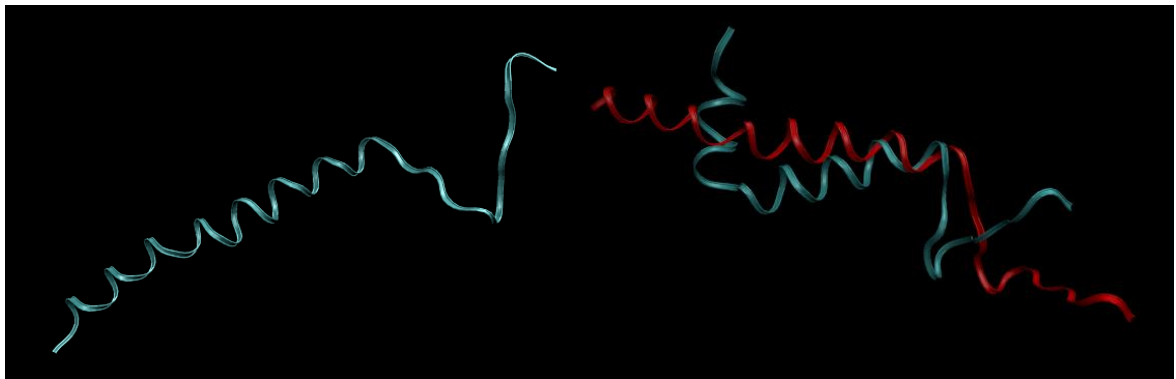


Figura 10 Toxina MeuTXKα3 obtenida con Chimera (Izquierda). Comparación de la estructura 3D de MeuTXKα3 antes (rojo) y después de la minimización (azul) (Derecha)

MeuTXKα3 es un péptido de 614 átomos, contenidos en 37 residuos y tiene una carga de +8. La estructura 3D obtenida con el programa Chimera para esta toxina, es bastante alargada. En ella se observa claramente la hélice- α en el centro, y las dos laminas- β en sentido anti paralelo a la derecha. En el extremo izquierdo, se

puede observar una segunda hélice- α , que se distingue de la hélice central, por la amplitud de los giros.

Al finalizar la minimización con NAMD, se obtuvo una estructura mucho más compacta, cuyo ángulo entre la hélice- α y la lámina- β , es mucho más estrecho, al igual que el ángulo, entre las dos laminas- β . También se ve una gran flexión en los residuos que separaban las dos hélices- α , haciendo que éstas sean más fáciles de distinguir, además de más cercanas entre ellas (ver figura 9).

Por otro lado, la estructura paso de tener una energía libre de 475kcal/mol a tener una de -1165kcal/mol.

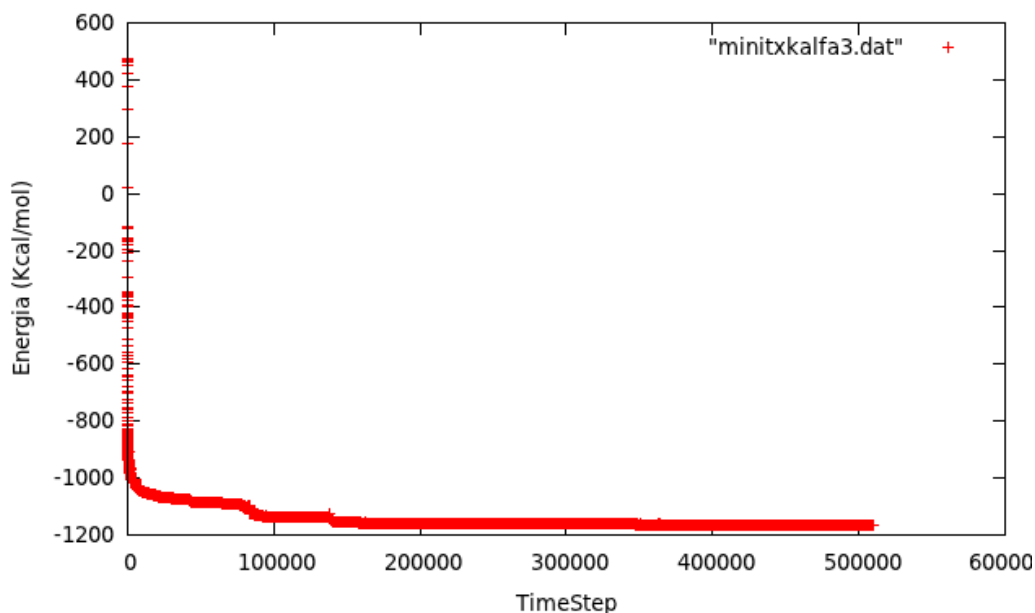


Figura 11 Gráfica de energía en función de timestep del proceso de minimización de MeuTXK α 3

2.5.2.3 Estructura 3D de MeuTXK α 4

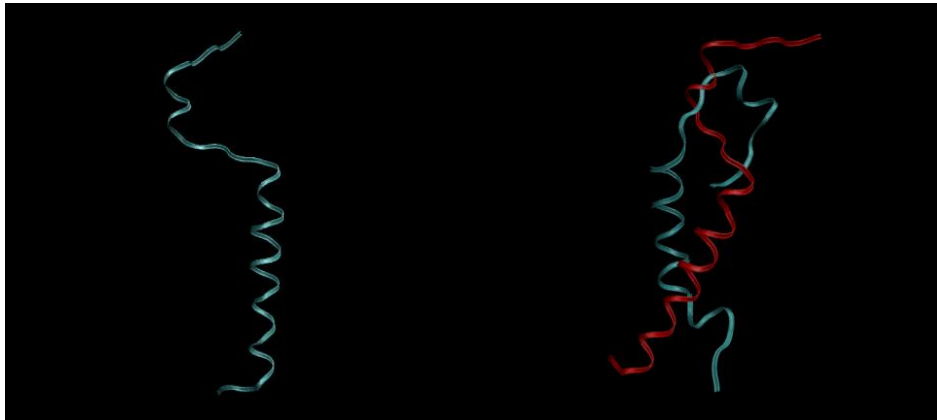


Figura 12 Estructura 3D de MeuTXK α 4 obtenida con Chimera (Izquierda). Comparación de la estructura 3D de MeuTXK α 4 antes (rojo) y después de la minimización (azul) (Derecha).

Esta toxina posee 541 átomos, 35 residuos y una carga de +2, por lo tanto. Posee dos hélices- α , una de giros amplios (en la parte inferior) y otra de giros más estrechos (centro), dos láminas- β en sentido anti paralelo en la parte superior separadas por una hélice- α , y una lámina- β muy corta en la parte inferior (ver figura 11).

Después de la minimización, la estructura pasó de tener una energía total de 724 kcal/mol a tener una de -563 kcal/mol (ver figura 12), además se volvió un poco más compacta. Como se puede ver en la figura 11, la separación entre las dos hélices- α de la parte inferior se flexionó, y las láminas- β anti paralelas, ahora están una en frente de la otra, y el extremo de una de ellas se acercó notablemente a la hélice- α central.

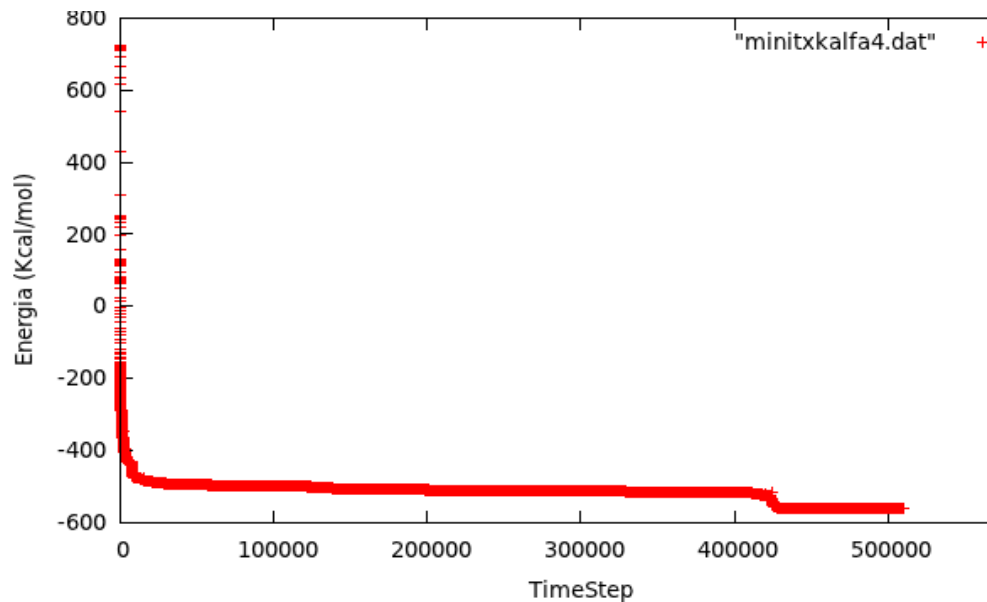


Figura 13 Gráfica de energía en función de timestep del proceso de minimización de MeuTXK α 4

2.5.3 Estructura de los complejos canal-toxina

Para facilitar el entendimiento de estos resultados, al complejo formado entre el canal Kv1.3 y la toxina MeuTXK α 1 se denomina el complejo 1, al formado por Kv1.3 y MeuTXK α 3 se le denomina complejo 2, y al formado por Kv1.3 y MeuTXK α 4 complejo 3.

2.5.3.1 Complejo Kv1.3-MeuTXK α 1 (Complejo 1)

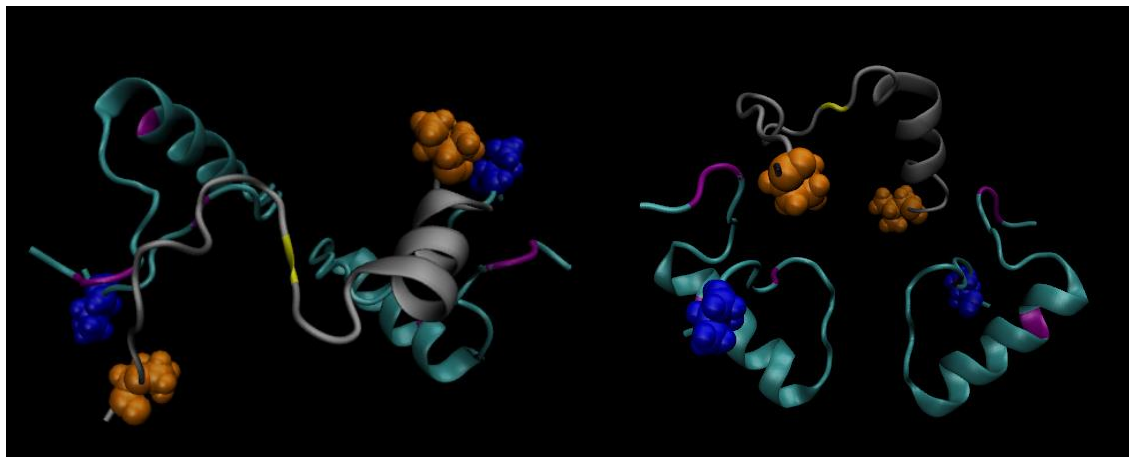


Figura 14 Complejo 1 antes de ser minimizado en vacío. Cadena A y C de Kv1.3 en azul claro, Valina 406 de Kv1.3; esferas azul oscuro, residuos de aspartato de Kv1.3; fragmentos púrpura, toxina MeuTXK α 1; gris, residuos VAL1 y PRO28 de la toxina; esferas naranja, y residuo LYS18; fragmento amarillo.

Al terminar la minimización en vacío del complejo 1, la energía libre total disminuyó de 65944 kcal/mol hasta -893 kcal/mol (ver figura 14). También se pudo observar que los residuos 1 y 28 de la toxina, una valina y una prolina respectivamente, se acercaron a la valina del filtro del canal, además, la lisina 18 de la toxina se aproximó a un residuo de Aspartato del filtro del canal (ver figuras 13 y 15).

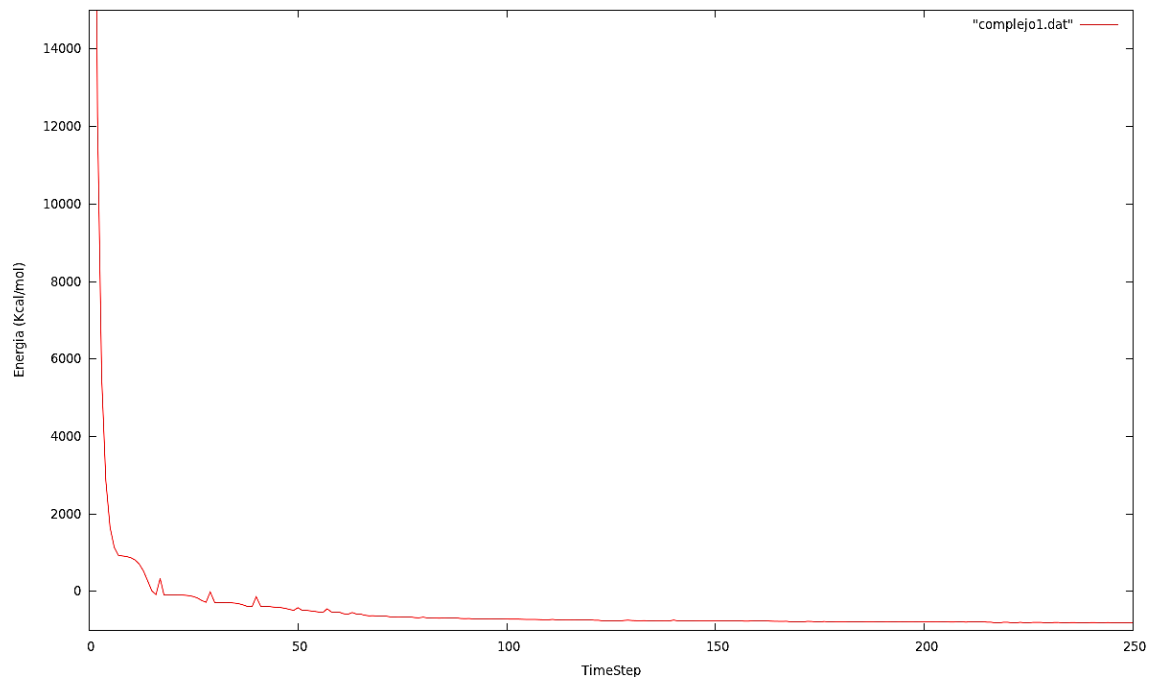


Figura 15 Gráfica Energía en función de timestep del proceso de minimización del complejo 1 en vacío.

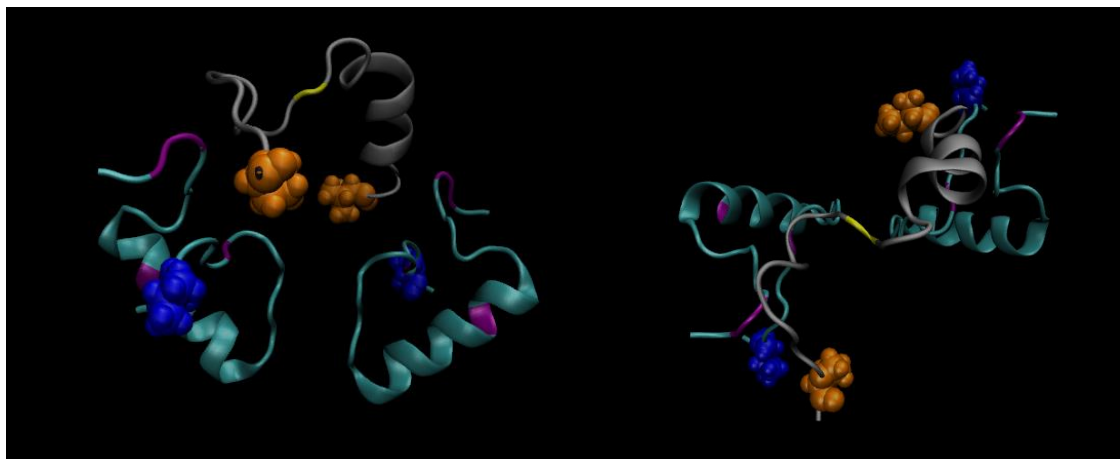


Figura 16 Complejo 1 minimizado en vacío. Cadena A y C de Kv1.3 en azul claro, VAL⁴⁰⁶ de Kv1.3; esferas azul oscuro, residuos de aspartato de Kv1.3; fragmentos púrpura, toxina MeuTXK α 1; gris, residuos VAL¹ y PRO²⁸ de la toxina; esferas naranja, y residuo LYS¹⁸; fragmento amarillo.



Figura 17 Comparación pictográfica del complejo 1 antes (rojo) y después (azul) de ser minimizado. Kv1.3 se representa en color gris.

En la figura 16 se puede observar que las cadenas A y C del canal se mantienen iguales, debido a que éstas fueron fijadas durante la minimización. En cuanto a la toxina, los cambios fueron más de ubicación que de estructura.

En cuanto a la minimización en solvente, la energía pasó de -34532kcal/mol a -158594kcal/mol , pero esta vez los residuos de Valina y Prolina de la toxina se alejaron de los residuos de valina de Kv1.3, mientras que la Lisina de la toxina y Aspartato del canal se acercaron. Esta información se encuentra resumida y detallada en la tabla 1.

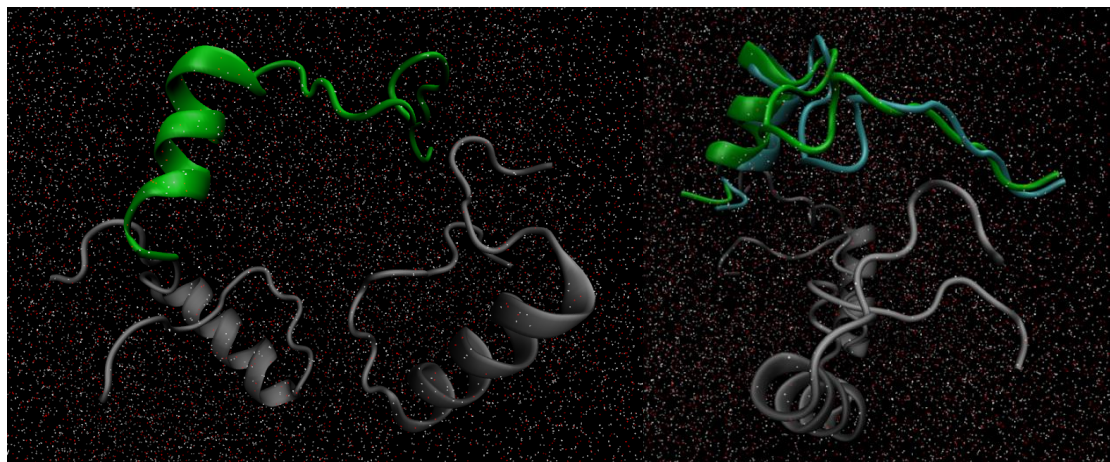


Figura 18 Complejo 1 minimizado en solvente (Izquierda). Comparación del complejo 1 minimizado en vacío (azul) y minimizado en solvente (verde) (Derecha). Las cadenas de Kv1.3 se representan en gris.

Tabla 1 Resultados de la minimización del complejo 1 (Kv1.3-MeuTXK α 1)

	En vacío				En solvente			
	Distancia VAL-VAL (Å)	Distancia VAL-PRO (Å)	Distancia ASP-LYS (Å)	Energía libre total (kcal/mol)	Distancia VAL-VAL (Å)	Distancia VAL-PRO (Å)	Distancia ASP-LYS (Å)	Energía libre total (kcal/mol)
Inicial	13.04	11.88	11.24	65944	11.65	12.33	12.55	-34532
Final	11.74	11.51	6.11	-893	12.19	11.59	11.57	-158594

En la figura 17, se puede observar que la diferencia entre el complejo 1 minimizado en el vacío y minimizado en el solvente se basa en la ubicación de la toxina, aunque también se puede apreciar una pequeña modificación en la estructura de las láminas- β anti paralelas de ésta.

2.5.3.2 Complejo Kv1.3-MeuTXK α 3 (Complejo 2)

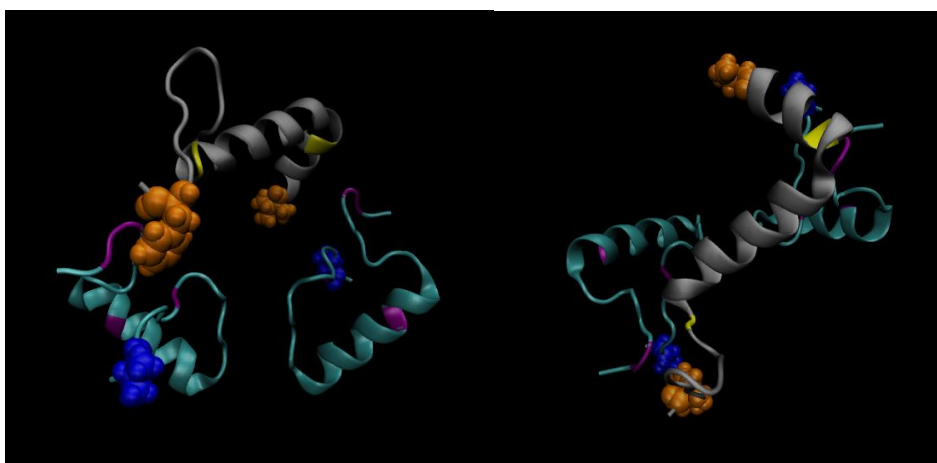


Figura 19 Complejo 2 antes de ser minimizado en vacío. Cadena A y C de Kv1.3 en azul claro, VAL⁴⁰⁶ de Kv1.3; esferas azul oscuro, residuos de aspartato de Kv1.3; fragmentos púrpura, toxina MeuTXK α 3; residuos VAL¹ y PHE³⁶ de la toxina; esferas naranja, residuos de LYS⁹⁻²⁷; fragmentos amarillos.

Al terminar la minimización del complejo 2 en vacío, la energía libre disminuyó de -1158kcal/mol hasta -1466 kcal/mol. También se observó que los residuos de Valina¹ y Lisina⁹ de la toxina se acercaron a los residuos de Valina y Aspartato del canal, respectivamente. Mientras que los residuos de Fenilalanina³⁶ y Lisina²⁷ de la toxina se alejaron de los residuos de valina y aspartato del canal.

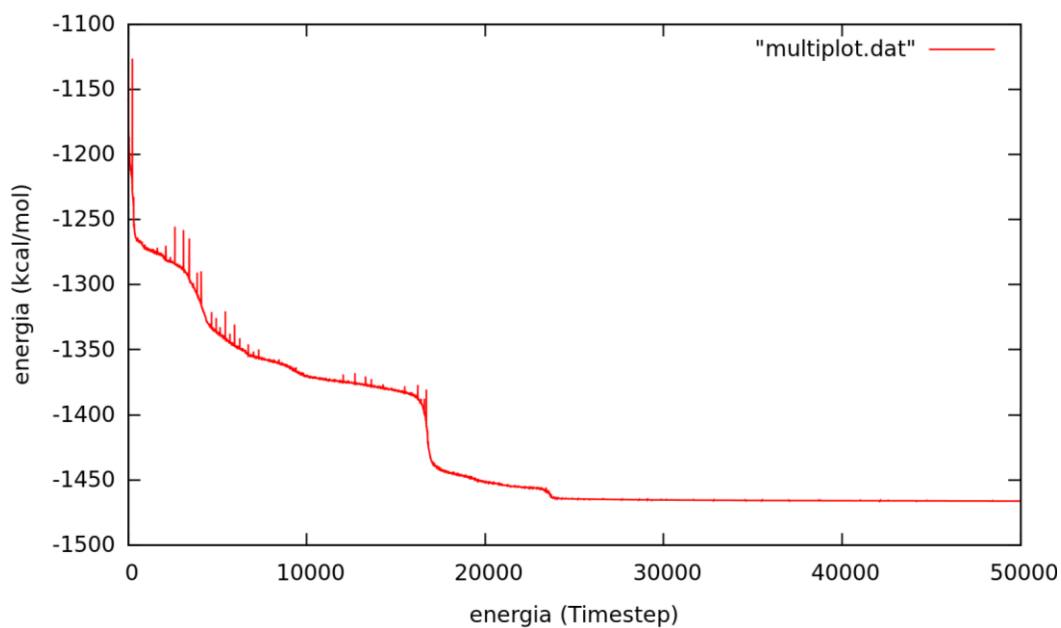


Figura 20 Gráfica de energía en función de timestep del proceso de minimización del complejo 2 en vacío.

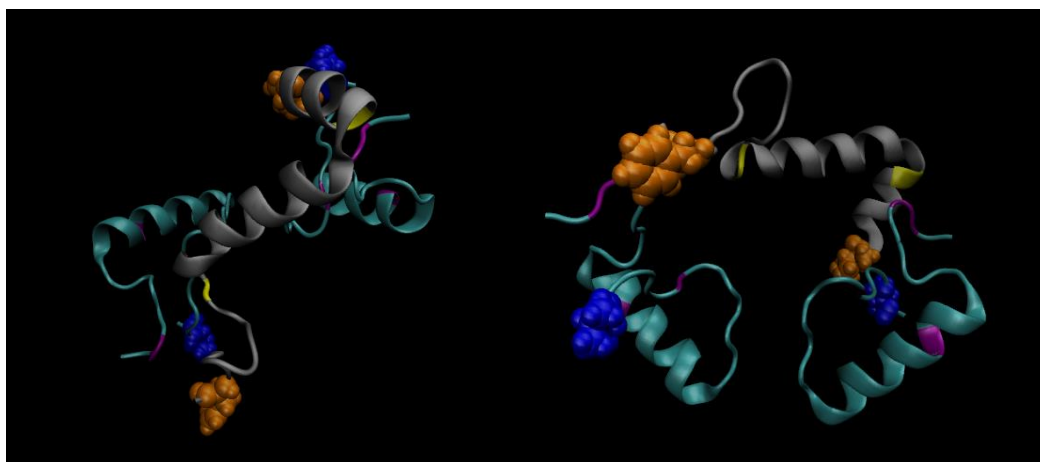


Figura 21 Complejo 2 minimizado en vacío. Cadena A y C de Kv1.3 en azul claro, VAL⁴⁰⁶ de Kv1.3; esferas azul oscuro, residuos de aspartato de Kv1.3; fragmentos purpura, toxina MeuTXK α 3; gris, residuos de la toxina; esferas naranja, y residuos LYS; fragmentos amarillos.

En la figura 21 se puede observar que la diferencia entre el complejo 2 antes de ser minimizado y después, se basa en un cambio de ubicación de la toxina, y no en un cambio estructural.

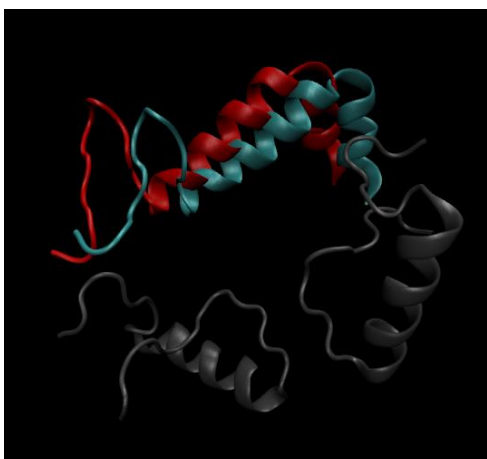


Figura 22 Comparación del complejo 2 antes (rojo) y después de la minimización (azul). Las cadenas de Kv1.3 se muestran en gris.

Por otro lado, al minimizar el complejo 2 en presencia del solvente, la energía disminuyó de -109347 kcal/mol a -170651 kcal/mol, y los residuos de Valina¹ Fenilalanina³⁶ de la toxina se acercaron a los residuos de valina del canal, al igual que los residuos de Lisina⁹⁻²⁷ a los residuos de aspartato.

Tabla 2 de la minimización del complejo 2 (Kv1.3-MeuTXKα3)

	En vacío					En solvente				
	Distanci a VAL- VAL (Å)	Distanci a VAL- PHE (Å)	Distanci a ASP- LYS ⁹ (Å)	Distanci a ASP- LYS ²⁷ (Å)	Energía libre total (kcal/mol)	Distanci a VAL- VAL (Å)	Distanci a VAL- PHE (Å)	Distanci a ASP- LYS ⁹ (Å)	Distanci a ASP- LYS ²⁷ (Å)	Energía libre total (kcal/mol)
Ini.	12.62	14.86	7.43	11.55	-1158	12.87	15.06	5.86	10.81	-109347
Fin	6.04	15.33	6.78	12.49	-1466	11.03	14.29	5.78	10.62	-170651

2.5.3.3 Complejo Kv1.3-MeuTXK α 4 (Complejo 3)

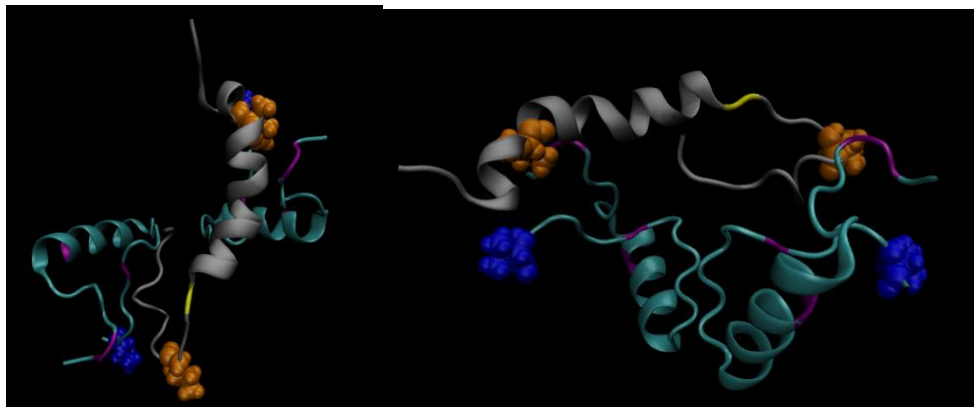


Figura 23 Complejo 3 antes de ser minimizado en vacío. Cadena A y C de Kv1.3 en azul claro, VAL⁴⁰⁶ de Kv1.3; esferas azul oscuro, residuos de aspartato de Kv1.3; fragmentos purpura, toxina MeuTXK α 4; gris, residuos ILE⁸⁻²⁶ de la toxina; esferas naranja, y residuo LYS²³; fragmento amarillo.

El complejo 3, tanto en el vacío como en solvente, antes de ser minimizado tenía una energía libre total muy alta, de 1×10^{10} kcal/mol, al realizar la minimización en vacío, esta disminuye hasta -788kcal/mol. En este caso, los residuos de la toxina que hallaban más cerca de las valinas del filtro del canal fueron dos isoleucinas (residuos 8 y 26), de las cuales, al finalizar la minimización, una se alejó mientras la otra se acercó. Por otro lado, una de las lisinas de la toxina, se acerca al aspartato del filtro del canal (el mismo que en el complejo 1).

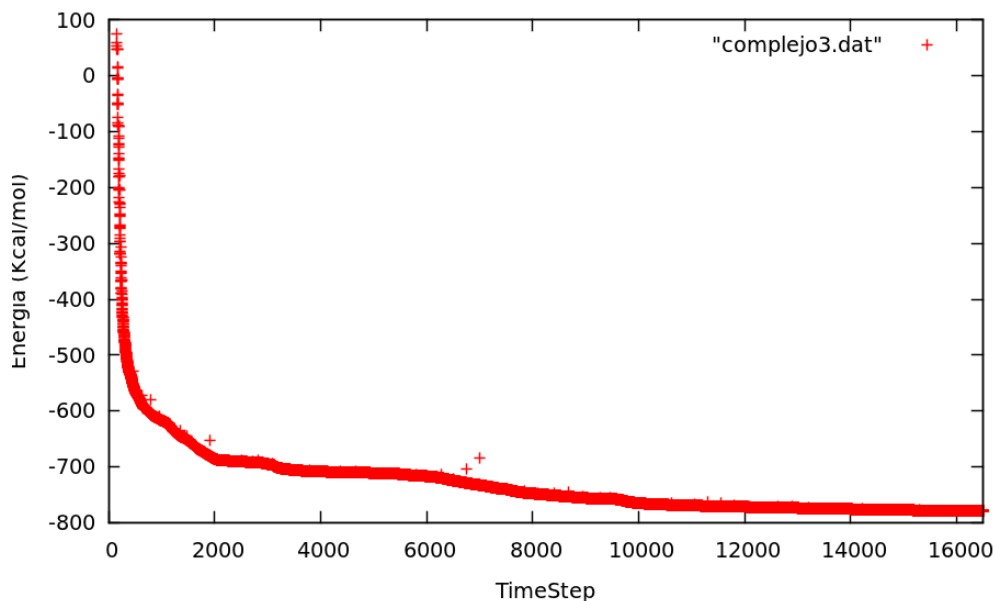


Figura 24 Gráfica de energía en función de timestep del proceso de minimización del complejo 3 en vacío.

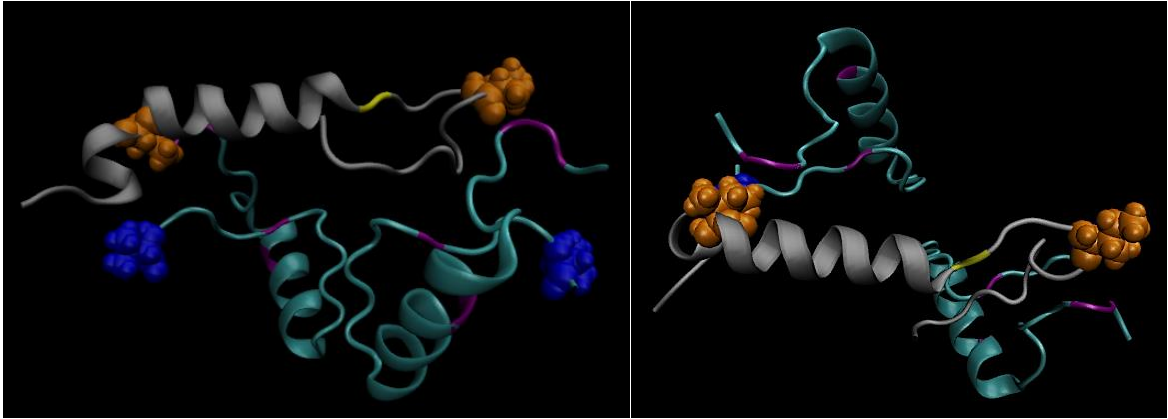


Figura 25 Complejo 3 minimizado en vacío. Cadena A y C de Kv1.3 en azul claro, VAL⁴⁰⁶ de Kv1.3; esferas azul oscuro, residuos de aspartato de Kv1.3; fragmentos purpura, toxina MeuTXK α 4; gris, residuos ILE⁸⁻²⁶ de la toxina; esferas naranja, y residuo LYS²³; fragmento amarillo.



Figura 26 Comparación del complejo 3 antes (rojo) y después (azul) de ser minimizado. Kv1.3 se representa en color gris.

En la figura 25 se puede observar que la diferencia entre el complejo 3 minimizado y antes de minimizar, se da por un cambio en la estructura de la toxina MeuTXK α 4, en la parte superior, donde se encuentran las láminas- β anti paralelas, ya que se observa una inclinación diferente en la primera de ellas, y una disminución bastante notoria en los giros de la helice- α que las separaba.

En cuanto a la minimización en solvente, la energía libre total, al final de ésta es de -165829 kcal/mol, pero en este caso, tanto las dos isoleucinas como la lisina se alejan de las valinas y el aspartato del canal, respectivamente.

Tabla 3 Resultados de la minimización del complejo 3 (Kv1.3-MeuTXK α 4)

	En vacío				En solvente			
	Distancia VAL-ILE ⁸ (Å)	Distancia VAL-ILE ²⁶ (Å)	Distancia ASP-LYS (Å)	Energía libre total (kcal/mol)	Distancia VAL-ILE ⁸ (Å)	Distancia VAL-ILE ²⁶ (Å)	Distancia ASP-LYS (Å)	Energía libre total (kcal/mol)
Inicial	13.77	14.46	11.76	1×10^{10}	16.74	12.07	12.91	1×10^{10}
Final	13.07	17.13	11.34	-788	17.32	12.77	14.68	-165829

2.5.4 Separación de los complejos canal-toxina por medio de Steered Molecular Dynamics (SMD)

A partir de las simulación en SMD, se obtuvieron los siguientes gráficos de Fuerza en función de Posición y Posición en función de Time Step para la separación de cada uno de los complejos.

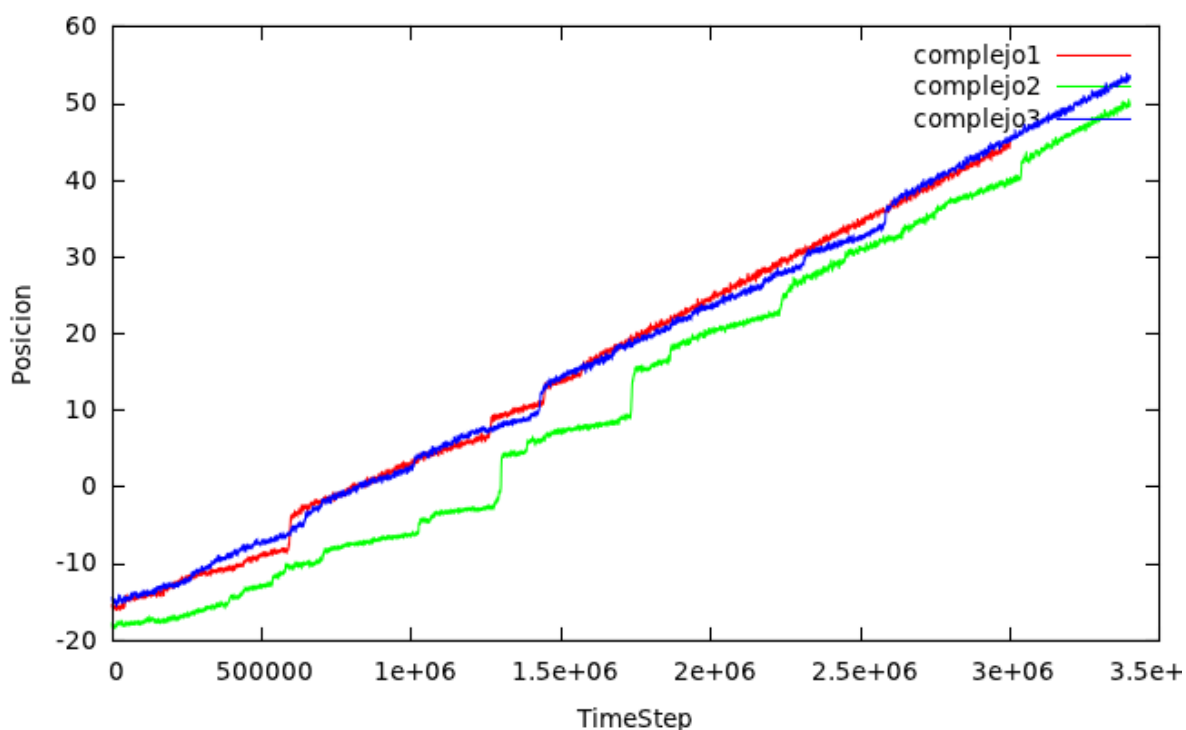


Figura 27 Gráfica Posición (Å) en función de TimeStep de los 3 complejos

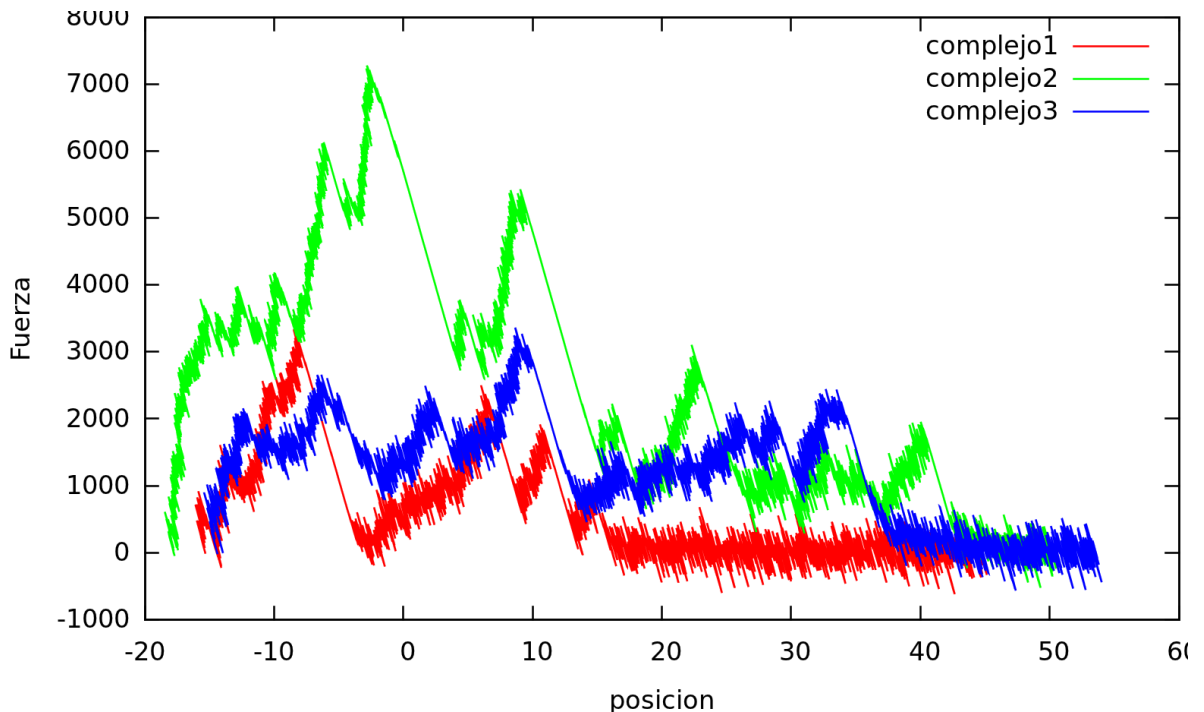


Figura 28 Gráfica Fuerza (pN) en función de Posición (Å) de los tres complejos

Al observar los dos gráficos, se observa que el complejo 2 es el que más tiempo o TimeSteps requiere para llegar a una posición determinada (Ver figura 26) y el que requiere la aplicación de una fuerza por más tiempo para ser separado (ver figura 27). Al comparar los máximos absolutos de la fuerza aplicada a cada complejo, es claro que el del complejo 2 (≈ 7000 pN) es mucho mayor a los de los 1 y 3 (≈ 3400 pN y ≈ 3500 pN respectivamente) Lo cual sugiere que la toxina MeuTXK α 3 es más afín por el canal Kv1.3, que MeuTXK α 1 y MeuTXK α 4.

Durante la simulación de la separación de cada uno de los complejos canal-toxina, se observaron diferentes interacciones entre Kv1.3 y las toxinas. La mayoría de carácter dipolo-dipolo, entre aminoácidos polares, o electrostáticas entre aminoácidos ácidos y básicos. Los residuos de Valina del canal se separaron muy rápida y fácilmente de los residuos de las toxinas con los que se creía que interactuaba, mientras que nuevas interacciones con otros residuos se formaron durante la separación de los canales. Estas interacciones se resumen en la tabla 4.

Tabla 4 Residuos del canal y cada una de las toxinas que interactúan en la separación de cada complejo. ^A residuo perteneciente a la cadena A. ^C residuo perteneciente a la cadena C.

	Residuo de Kv1.3	Residuo de la toxina
Complejo 1	ASP ⁴⁰²	SER ²
	ASP ^{376 A}	CYS ³ – CYS ⁶
	ASP ^{376 C}	CYS ²⁶ – CYS ²⁴
	GLU ³⁷³	GLU ²⁷
Complejo 2	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
Complejo 3	ASP ^{376 A}	CYS ³ – TYR ² – GLN ¹
	THR ³⁷⁸	GLN ¹
	ASP ⁴⁰²	CYS ³¹
	ASP ^{376 C}	ARG ²⁹ – SER ³⁰

Al comparar los gráficos de Fuerza en función de Posición con las trayectorias de la simulación SMD se observa que para el complejo 1 el primer pico o máximo relativo, ubicado en (-15.8, 885.7), representa el momento en que se da un cambio conformacional y los residuos de ASP⁴⁰² y SER² comienzan a interactuar. El pico ubicado en (-10.32, 2534.2) se da cuando se separan ASP^{376 C} y CYS²⁴, generando una interacción de largo alcance. El pico más alto o máximo absoluto representa el momento en que se rompen las interacciones entre CYS³ y CYS⁶ con ASP^{376 A}, y entre ASP⁴⁰² y SER². El siguiente máximo relativo (en (6.3, 2345.0)) se refiere al momento en el que las interacciones de largo alcance entre ASP^{376 C} y CYS²⁴ se rompen, y se separa GLU²⁷ de GLU³⁷³. El siguiente pico, ubicado en (10.7, 1838.3), caracteriza la separación de CYS²⁶ y ASP^{376 C}. Y el último pico, pertenece al rompimiento de las interacciones a largo alcance, momento en el que se separa el complejo Kv1.3 – MeuTXK α 1.

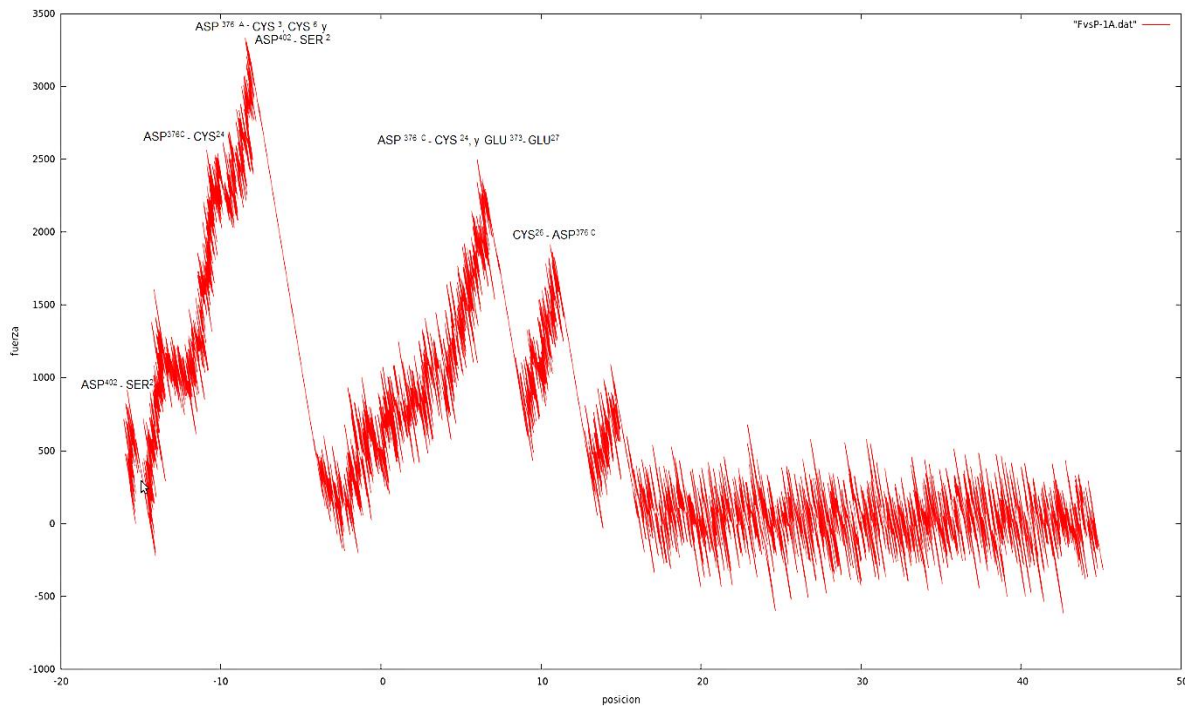


Figura 29 Gráfica Fuerza (pN) en función de Posición (Å) para el complejo1.

Para el complejo 2 el primer máximo relativo (-15.7, 3744.2) representa la separación de TYR⁴⁰⁰ y TYR²⁴, el pico ubicado en (-12.1, 3649.7) constituye la separación de HSD⁸⁴ y ASP². El siguiente, ubicado en (-10.0, 4176.6) caracteriza la separación de ASP³⁷⁵ y ARG¹², sexto pico (-6.2, 613.9) representa la separación de ARG³⁴ y CYS³⁵ de ASP³⁷⁶. El máximo absoluto se da en el momento en que se rompe la interacción de largo alcance entre HSD⁴⁰⁴ y ASP² y se separan ASP³⁷⁵ y CYS¹⁵. El noveno pico, ubicado en (9.1, 5406.3) representa el momento en que se termina la interacción entre ASP³⁷⁵ y ARG¹⁶, el pico en (22.5, 2947.0) se da por la separación de ASP³⁷⁶ y ARG²⁵. Y el último pico caracteriza la separación de ASP³⁷⁶ y ARG³⁴ y el desbloqueo de Kv1.3.

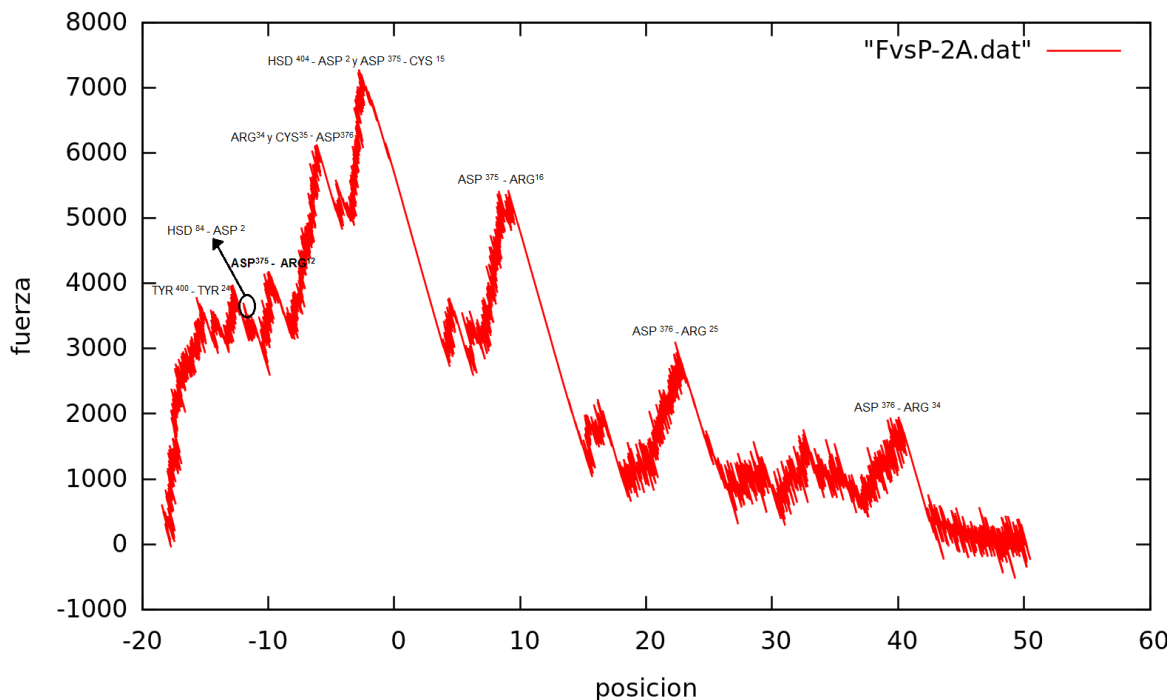


Figura 30 Gráfica Fuerza (pN) en función de Posición (Å) para el complejo 2

Para el último complejo (complejo 3) la relación entre los picos de la gráfica de fuerza versus posición y las interacciones entre los diferentes residuos del canal y la toxina es: el tercer pico, ubicado en (-6.4, 2675.6), representa la separación de ASP^{402} y CYS^{31} , el siguiente pico (1.8, 2444.5) caracteriza el momento en que se aleja CYS^3 de ASP^{376A} y se separan THR^{378} y GLN^1 . El quinto pico, o máximo absoluto, se refiere al momento en que ASP^{376A} y CYS^3 dejan de interactuar por completo, el séptimo pico, ubicado en (18.2, 1396.5), representa la separación de ASP^{376A} y TYR^2 . Y el último pico, se refiere al momento en que se separan ASP^{376A} y GLN^1 , y con esto se da el desbloqueo del canal. Las demás interacciones reportadas en la tabla 4, no se identifican en el gráfico, debido a que su ruptura no se da en una de los máximos relativos, sino que a medida que la fuerza incrementaba o disminuía progresivamente.

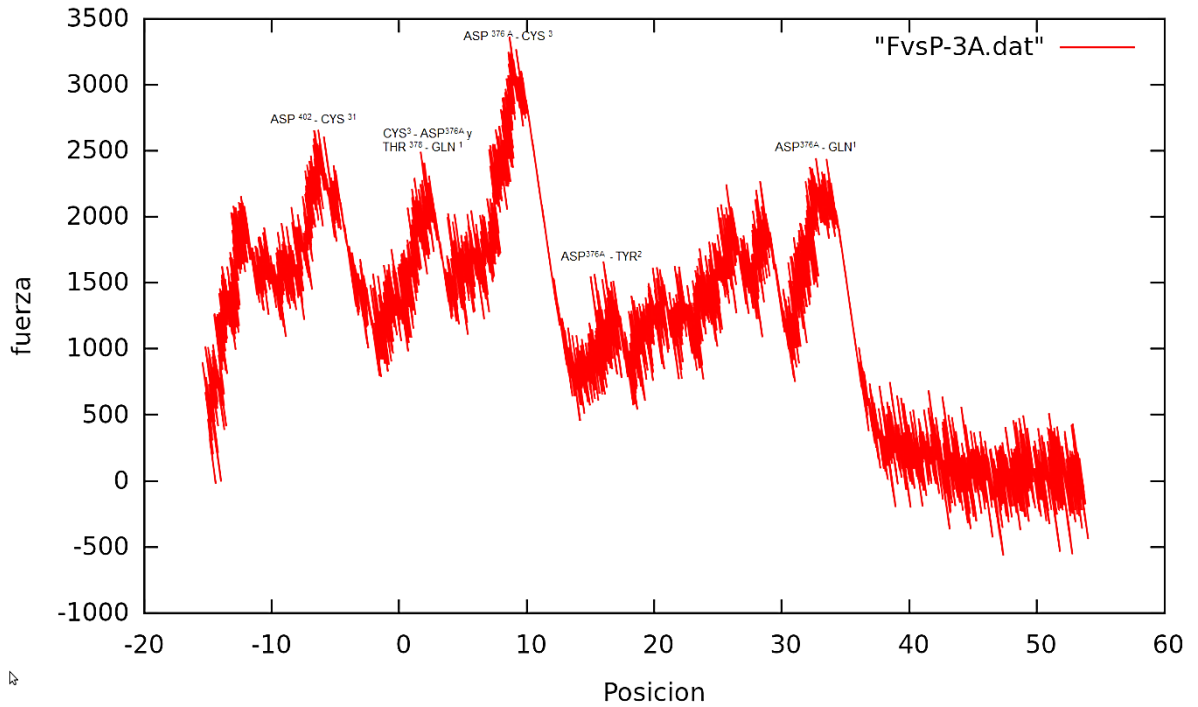


Figura 31 Gráfica Fuerza (pN) en función de Posición (Å) para el complejo 3

2.6 Discusión

Prioritariamente se debe analizar la precisión con la que se modeló el vestíbulo exterior (turreta, poro y filtro) de Kv1.3, debido a que éste es el centro de todo el estudio que se realizó. Para esto se toma como base la precisión de Comparative Modeling explicado anteriormente, donde relaciona el porcentaje de similitud entre las dos secuencias proteicas y la precisión de la estructura determinada (Patel, 2008). En la figura 4 se puede observar que de 35 residuos que contienen las secuencias comparadas 27 coinciden, es decir, que éstas tienen una similitud del 77%, lo que significa que la precisión de la estructura de Kv1.3 modelada tomando como base la estructura y secuencia de aminoácidos del canal rKv1.2, tiene una precisión mayor al 90%, la cual es lo suficientemente alta para que ésta sea adecuada para su uso en el estudio de la interacción entre Kv1.3 y diferentes sustratos como las toxinas del veneno del escorpión *Mesobuthus eupeus*.

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

Figura 32 Secuencia de aminoácidos de las toxinas del veneno de *Mesobuthus eupeus*. Tomada de (Zhu et al., 2011)

En la figura 31 se muestra la secuencia de aminoácidos de cada una de las toxinas estudiadas, MeuTXK α 1, MeuTXK α 3 y MeuTXK α 4. Se puede observar que MeuTXK α 1 contiene cuatro residuos de Lisina (representados por una K azul) de los cuales uno tiene un residuo de Asparagina 8 posiciones más adelante, por lo que podría decirse que no contiene la diada funcional, o ésta se encuentra modificada en una posición. MeuTXK α 4 posee dos residuos de Lisina, y nueve posiciones por encima del primero hay una Fenilalanina, lo que conforma la diada funcional presente en las toxinas bloqueadoras de canales de potasio, aunque no específica para Kv1.3. Por otro lado, MeuTXK α 3 presenta 7 residuos de Lisina, de los cuales uno tiene un residuo de Treonina 9 posiciones más adelante, y otros dos un residuo de Fenilalanina (Corzo et al., 2008). La presencia de tres diadas funcionales, de las cuales una es específica para toxinas bloqueadoras de Kv1.3, hace que esta toxina tenga una mayor probabilidad de ser la más afín por el canal, en comparación a las otras dos.

Respecto a las estructuras 3D de MeuTXK α 1, MeuTXK α 3 y MeuTXK α 4 obtenidas después de la minimización con NAMD, no se cuenta con una herramienta para medir la precisión de éstas, debido a que no se utilizó una secuencia planilla y en el Protein Data Bank no se encuentran reportadas estas toxinas. No obstante, en ellas se observa el modelo estructural de una hélice- α y dos laminas- β en sentido antiparalelo que tienen todas las toxinas bloqueadoras de canales de potasio (Zhu et al., 2011) (Gao et al., 2010) (France et al., 2012) (Rodríguez de la Vega et al., 2003), por lo que se puede afirmar que las estructuras tienen una precisión adecuada.

En cuanto a las interacciones de cada una de las toxinas con Kv1.3, se puede observar que los residuos de VAL⁴⁰⁶ influyen en la formación del complejo, es decir, el momento en que la toxina se ubica en el vestíbulo exterior del canal, pero no en la conservación del complejo cuando se aplica la fuerza. Por lo que se puede decir que estos residuos tiene la función de orientar la ubicación de la toxina en el momento que comienza el bloqueo, además de unirse con el o los residuos hidrófobos de éstas que se encargan de potenciar las demás interacciones canal-toxina (France et al., 2012). Por otro lado, los encargados de mantener el complejo cuando una fuerza trata de separarlo son los residuos reportados en la tabla 4. Esto sucede debido a que las interacciones que unen los residuos de VAL⁴⁰⁶ con los diversos residuos apolares de las toxinas, son dispersiones de London y/o efecto hidrofóbico, las cuales se caracterizan por ser bastante débiles (Kessel & Ber-Tal, 2011).

En las tablas 1, 2 y 3 se puede observar como en la minimización de los tres complejos al menos uno de los residuos hidrófobos de las toxinas se acerca a VAL⁴⁰⁶. Lo cual muestra como la función orientativa de este residuo contribuye a

que el complejo obtenga la geometría o configuración de mayor estabilidad. Al analizar las distancias entre VAL⁴⁰⁶ y los residuos hidrofóbicos de cada toxina después de realizar la minimización, es claro que el que más se acerca es VAL¹ de la toxina MeuTXK α 3 (6.04Å de distancia). Lo cual también pudo contribuir en el hecho de que ésta toxina es la que presenta interacciones más fuertes con Kv1.3, ya que la interacción entre aminoácidos hidrofobos del canal y la toxina es la que potencia las interacciones electrostáticas y de Van der Waals (France et al., 2012).

En la tabla 4 se reportaron los aminoácidos del canal y la toxina que interactúan en cada complejo, y en ella se puede observar que las interacciones que se dan en el complejo 2 son predominantemente de tipo puente salino, entre un aminoácido básico protonado (ARG³⁴, ARG²⁵, ARG¹² y HSD⁴⁰⁴) y un aminoácido ácido desprotonado (ASP³⁷⁶, ASP³⁷⁵ y ASP²), las cuales conforman 5 de las 10 fuerzas de atracción que mantienen el complejo unido. Adicionalmente se presenta atracción electrostática entre anillos aromáticos de TYR⁴⁰⁰ y TYR²⁴, entre el átomo de oxígeno de los residuos de cisteína (CYS) y los átomos de oxígeno o nitrógeno de ASP, e interacciones tipo ion-dipolo y dipolo-dipolo entre aminoácidos cargados total y parcialmente como TYR⁴⁰⁰ y TYR²⁴, ASP³⁷⁶ con CYS³⁵ y TYR²⁴, y ASP³⁷⁵ con CYS¹⁵ y ASP². Por otro lado el complejo 3 solo presenta una interacción tipo puente salino (entre ASP^{376 C} y ARG²⁹), seis interacciones tipo dipolo-dipolo o ion-dipolo y dos entre el azufre y los átomos polares de ASP. Por último, el complejo 1 no presenta fuerzas de atracción tipo puente salino, pero si cuatro interacciones electrostáticas entre el azufre de la cisteína y los residuos de ASP e interacciones tipo dipolo –dipolo y ion-dipolo.

Respecto a los puentes de hidrogeno, éstos son un tipo de interacción que se puede presentar en todos los aminoácidos, péptidos y proteínas. Debido a que estos tienen grupos –OH y –NH₂. No obstante, es importante comparar la cantidad de estos en cada uno de los complejos, ya que existen factores como el impedimentos estérico y la cantidad de grupos –OH y –NH₂ libres (que varían por la presencia de enlaces peptídicos y la estructura química de cada aminoácido) que pueden afectarla, y además los puentes de hidrogeno son fuerzas intermoleculares muy importantes en el empaquetamiento de proteínas.

En el complejo 1 se presentan 4 puentes de hidrogeno;

- 1 entre ASP⁴⁰² y SER²,
- 1 entre ASP^{376 A} y CYS⁶,
- 1 entre ASP^{376 C} y CYS²⁶,
- 1 entre GLU³⁷³ y GLU²⁷

En el complejo 2 se presentan 6 puentes de hidrogeno;

- 1 entre TYR⁴⁰⁰ y TYR²⁴
- 1 entre ASP³⁷⁶ y CYS³⁵
- 2 entre ASP³⁷⁶ y ARG³⁴
- 1 entre ASP³⁷⁶ y TYR²⁴
- 1 entre ASP³⁷⁵ y ARG¹²

Y en el complejo 3 se presentan 4 puentes de hidrogeno;

- 1 entre ASP^{376 C} y ARG²⁹
- 1 entre ASP^{376 A} y CYS³
- 1 entre ASP^{376 A} y TYR²
- 1 entre ASP^{376 A} y GLN¹

Las diferentes fuerzas de atracción que unen a cada una de las toxinas con Kv1.3 para formar los complejos 1, 2 y 3, explican las diferencias entre la fuerza aplicada que se necesita para separarlos. Debido a que el complejo 2 posee mayor número de interacciones, y además, entre ellas predominan los puentes salinos, que son las interacciones electrostáticas más fuertes, es necesario aplicar una fuerza de mayor magnitud para separar este complejo, en comparación a la que se necesita para separar los complejos 1 y 3. Por otro lado, el complejo 1 es el que presenta menor número de interacciones entre el canal y la toxina, y entre ellas no se dan los puentes salinos, lo cual explica porque este complejo necesita una fuerza menor para ser separado.

Los resultados obtenidos sugieren que MeuTXK α 3 tiene una mayor afinidad por Kv1.3 que MeuTXK α 1 y MeuTXK α 4, debido a que el complejo que forma con el canal es más difícil de separar en comparación a los complejos formados por las otras dos toxinas estudiadas. Esto se explica debido a las interacciones que se dan entre los residuos del canal y los de MeuTXK α 3, y por la presencia de 3 diadas funcionales en la secuencia de aminoácidos de MeuTXK α 3. No obstante, en la literatura se reporta que MeuTXK α 1 es una candidata potencial para el desarrollo de un nuevo fármaco inmunoregulador, debido a que presenta mayor afinidad y selectividad por Kv1.3 que su ortóloga BmP01 (Zhu et al., 2011). Se debe tener en cuenta que la afinidad por el canal no es la única característica que debe cumplir la toxina para llegar a ser un nuevo fármaco contra enfermedades autoinmunes. Además de ésta, también debe presentar selectividad, tiempo de vida media, unión a proteínas plasmáticas y depuración adecuadas, pero en el momento no se encuentran estudios acerca de estas características para MeuTXK α 3, por lo que a pesar de tener mayor afinidad por Kv1.3, todavía no se puede determinar si puede llegar a ser una candidata para el desarrollo de un nuevo fármaco.

Respecto a los aminoácidos presentes en el vestíbulo exterior de Kv1.3 que interaccionan con las toxinas, se pudo observar que éstos varían de toxina a toxina, y el único que interactúa con las tres toxinas es ASP³⁷⁶. Teniendo en cuenta que éste residuo no se encuentra en los otros canales de potasio sensibles a estas toxinas (ver figura 4) (Zhu et al., 2011), se puede trabajar en mutaciones que fortalezcan la interacción de los residuos de MeuTXK α 3 con este aminoácido, para así mejorar su afinidad por Kv1.3 sin afectar su selectividad.

También es importante estudiar la interacción MeuTXK α 3 con otros canales de potasio como Kv1.1, Kv1.2, Kv1.4, Kv1.5, hKv3.1, Kv4.3, y hERG (Gao et al., 2010), para así poder hacer una aproximación de su selectividad y poder predecir si ésta es adecuada para postular esta toxina como una nueva candidata para el desarrollo de un fármaco inmunoregulador.

Volviendo a la formación de los complejos canal-toxina, ésta se realizó mediante minimizaciones en vacío y en solvente. La principal diferencia que se observó, para todos los complejos, entre las estructuras obtenidas fue la ubicación de la toxina. En el caso de los complejos 1 y 3, la toxina se encontraba más cerca del canal cuando se hizo la simulación en vacío. Mientras que en el complejo 2, la estructura en solvente presentaba a la toxina más cercana al canal. Este fenómeno se debe a la influencia de un solvente con una constante dieléctrica alta en las interacciones no-covalentes electrostáticas, ya que al debilitar las fuerzas atractivas tipo puente salino y puentes de hidrogeno la toxina no interactúa tan fuertemente con el canal (Kessel & Ber-Tal, 2011).

Debido a la influencia del solvente sobre la interacción entre proteínas y péptidos, se sugiere realizar una nueva simulación SMD para separar los complejos canal-toxina, esta vez en presencia de solvente, para estudiar más detalladamente la influencia de éste sobre las interacciones electrostáticas, y corroborar que el complejo formado por MeuTXK α 3 y Kv1.3 es el que requiere de más fuerza para ser separado.

Para complementar este proyecto, sería útil un análisis bioinformático que permita conocer los antecesores evolutivos de MeuTXK α 3. Conocer la variabilidad en las posiciones de residuos en las secuencias de estas toxinas y estimar cuáles de estas se verían favorecidas hacia una mayor afinidad sobre el canal objeto de estudio (correlacionable con una mayor toxicidad). Al usar la metodología establecida en este trabajo, podría proponerse una estrategia para tamizar

posibles toxinas que bloqueen Kv1.3 de forma más selectiva, y consecuentemente sea un mejor candidato para el desarrollo de un nuevo fármaco inmunoregulador.

2.7 Conclusiones

- Se logró modelar el vestíbulo exterior de Kv1.3, a partir de Comparative Modeling, obteniéndose una estructura con precisión mayor al 90%.
- Las estructuras 3D de las toxinas MeuTXK α 1, MeuTXK α 3 y MeuTXK α 4 se modelaron, y se obtuvo geometrías muy probables, debido a su baja energía libre y la presencia del modelo estructural reportado en la literatura.
- Se modelaron y compararon las geometrías de menor energía libre de los complejos canal-toxina en vacío y en solvente. En ellas se pudo observar que la principal diferencia es la distancia entre el canal y las toxinas.
- Las fuerzas no-covalentes que mantienen unidos a cada uno de los complejos canal-toxina fueron identificadas y analizadas.
- Se halló que la toxina que requiere mayor fuerza para ser separada del canal Kv1.3 es MeuTXK α 3. Lo cual es producto de una mayor cantidad de interacciones intermolecular tipo puente salino, puente de hidrógeno y dipolo-dipolo.
- Los resultados obtenidos indican que MeuTXK α 3 es más afín por Kv1,3 que MeuTXK α 1 y MeuTXK α 4

2.8 Recomendaciones

Para continuar con esta línea de investigación se deben realizar más estudios acerca de la capacidad inmunosupresora de MeuTXK α 3 como; su interacción con otros canales de potasio, para así tener una aproximación acerca de su selectividad. Realizar la separación de los tres complejos canal-toxina estudiado, pero en solvente, para poder corroborar que MeuTXK α 3 es la que requiere una mayor fuerza para separarse de Kv1.3. Plantear mutaciones en la secuencia de aminoácidos que fortalezcan su interacción con los residuos de Kv1.3 y debiliten las posibles interacciones con otros canales de potasio, con el objetivo de mejorar su afinidad y selectividad.

También se sugiere obtener más información acerca de otros péptidos provenientes del veneno de *Mesobuthus eupeus*. Para lo cual se recomienda hacer un análisis bioinformático que revele los antecesores evolutivos de estas toxinas, y utilizar el conocimiento y las herramientas brindadas por este proyecto para encontrar la que tenga mejor perfil, en cuanto a selectividad y afinidad por Kv1.3.

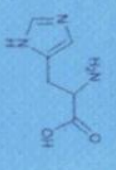
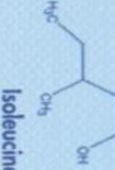
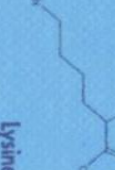
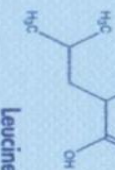
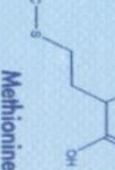


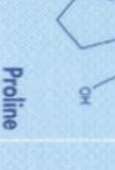
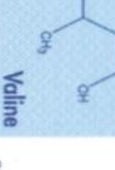
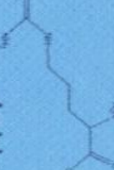
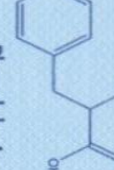
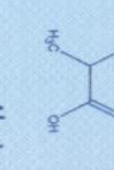
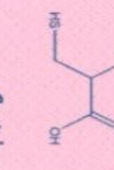
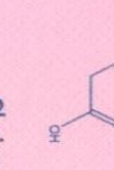
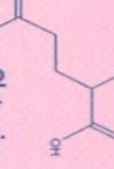

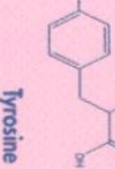
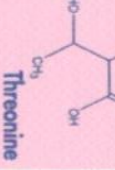
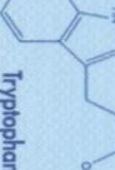
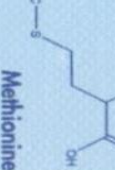


3. Referencias

- Aiyar, J., Withka, J. M., Rizzi, J. P., Singleton, D. H., Andrews, G. C., Lin, W., . . . George Chandy, K. (1995). Topology of the pore-region of a K⁺ channel revealed by the NMR-derived structures of scorpion toxins. *Neuron*, 15(5), 1169-1181. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90104-3](http://dx.doi.org/10.1016/0896-6273(95)90104-3)
- Aksimentiev, A., Sotomayor, M., & Wells, D. (2012). Membrane Proteins Tutorial. <http://www.ks.uiuc.edu/Training/Tutorials/spectop-index.html>: Theoretical and computational biophysics group.
- Brown, T., LeMay, E. H., & Bursten, B. E. (2006). *Chemistry The central Science* (Pearson Ed. Tenth ed.).
- Corzo, G., Papp, F., Varga, Z., Barraza, O., Espino-Solis, P. G., Rodriguez de la Vega, R. C., . . . Possani, L. D. (2008). A selective blocker of Kv1.2 and Kv1.3 potassium channels from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*. *Biochem Pharmacol*, 76(9), 1142-1154. doi: 10.1016/j.bcp.2008.08.018
- Doyle, D. A., Cabral, J. M., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., . . . MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. (Cover story). *Science*, 280(5360), 69-77.
- Edwards, W., Fung-Leung, W. P., Huang, C., Chi, E., Wu, N., Liu, Y., . . . Wickenden, A. D. (2014). Targeting the ion channel Kv1.3 with scorpion venom peptides engineered for potency, selectivity, and half-life. *J Biol Chem*, 289(33), 22704-22714. doi: 10.1074/jbc.M114.568642
- France, M., Eauciaire, M., & Bougis, P. E. (2012). Potassium Channels Blockers from the Venom of *Androctonus mauretanicus mauretanicus*. *Journal of Toxicology*, 2012, 9. doi: 10.1155/2012/103608
- Gao, B., Peigneur, S., Tytgat, J., & Zhu, S. (2010). A potent potassium channel blocker from *Mesobuthus eupeus* scorpion venom. *Biochimie*, 92(12), 1847-1853. doi: 10.1016/j.biochi.2010.08.003
- Gulbins, E., Sassi, N., Grassme, H., Zoratti, M., & Szabo, I. (2010). Role of Kv1.3 mitochondrial potassium channel in apoptotic signalling in lymphocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1797(6-7), 1251-1259. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.01.018
- Gumbart, J. (2011). Forcing substrates through channels <http://www.ks.uiuc.edu/Training/Tutorials/freenergy-index.html>: Theoretical and computational biophysics group.
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph*, 14(1), 33-38, 27-38.
- Jeong, J. C., Jo, S., Wu, E. L., Qi, Y., Monje-Galvan, V., Yeom, M. S., . . . Im, W. (2014). ST-analyzer: A web-based user interface for simulation trajectory analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 35(12), 957-963.

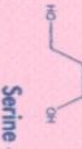
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B. T., & MacKinnon, R. (2003). X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*, 423(6935), 33.
- Kessel, A., & Ber-Tal, N. (2011). *Introduction to proteins Structure, function, and motion*: CRC Press, Taylor & Francis Group Chaoman & Halla
- Leach, A. R. (2001). *Molecular Modelling PRINCIPLES AND APPLICATIONS* (P. e. limited Ed. second ed.): prentice hall.
- Patel, S. (2008). *Understanding Protein Folding using Molecular Dynamics Simulation*: LAP LAMBERT Academic Publishing.
- Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., . . . Schulten, K. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem*, 26(16), 1781-1802. doi: 10.1002/jcc.20289
- Rashid, M. H., Heinzelmann, G., Huq, R., Tajhya, R. B., Chang, S. C., Chhabra, S., . . . Kuyucak, S. (2013). A Potent and Selective Peptide Blocker of the Kv1.3 Channel: Prediction from Free-Energy Simulations and Experimental Confirmation. *PLoS ONE*, 8(11), e78712. doi: doi:10.1371/journal.pone.0078712
- Rodríguez de la Vega, R. C., Merino, E., Becerril, B., & Possani, L. D. (2003). Novel interactions between K⁺ channels and scorpion toxins. *Trends in Pharmacological Sciences*, 24(5), 222-227. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-6147\(03\)00080-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-6147(03)00080-4)
- Tsai, C. S. (2002). *An introduction to computational biochemistry* (WILEY-LISS Ed.). New York.
- Voet, D., & Voet, J. G. (2004). *Biochemistry* (WILEY Ed. Fourth ed.).
- 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. *Mol Cell Proteomics*, 10(2), M110.002832. doi: 10.1074/mcp.M110.002832

Anexos

Anexo 1. Tabla de aminoácidos.

H		I		K		L		M		N		P		R		S		T		V		W		Y		Z																	
His 155.16 137.14 $C_6H_9N_3O_2$ 		Ile 131.18 113.16 $C_6H_{13}NO_2$ 		Lys 146.19 128.17 $C_8H_{14}N_2O_2$ 		Leu 131.17 113.16 $C_6H_{13}NO_2$ 		Met 149.21 131.20 $C_5H_{11}NO_2S$ 		Asn 132.12 114.10 $C_4H_8N_2O_3$ 		Asp 133.10 115.09 $C_4H_7NO_4$ 		Pro 115.13 97.12 $C_5H_9NO_2$ 		Val 117.15 99.13 $C_6H_{11}NO_2$ 		Arg 174.20 156.19 $C_8H_{14}N_4O_2$ 		Phe 165.19 147.18 $C_9H_9NO_2$ 		Ala 89.09 71.08 $C_3H_7NO_2$ 		Cys 121.16 103.14 $C_3H_7NO_2S$ 		Gly 75.07 57.05 $C_2H_5NO_2$ 		Gln 146.15 128.13 $C_5H_9N_2O_3$ 		Glu 147.13 129.11 $C_5H_9NO_4$ 		Tyr 181.19 163.17 $C_9H_9NO_3$ 		Thr 119.12 101.10 $C_4H_9NO_3$ 		Trp 204.23 186.21 $C_{11}H_{12}N_2O_2$ 		Met 149.21 131.20 $C_5H_{11}NO_2S$ 		Asn 132.12 114.10 $C_4H_8N_2O_3$ 		Asp 133.10 115.09 $C_4H_7NO_4$ 	

■ Basic
■ Acidic
■ Nonpolar (hydrophobic)
■ Polar, uncharged

Ser (Serine) — 3-letter Amino Acid Code: Ser, Molecular Weight: 87.08, $C_3H_7NO_3$, $MM(H_2O)$
Ser (Serine) — Chemical Structure:  — Chemical Name: Serine

© Copyright 2003 by Beckman AG, Switzerland. Reproduction forbidden without permission.