



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Instituto de Biotecnología

**Estudio de la Interacción de la Toxina “Discrepina” con sus
Canales de Potasio Blanco**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

EDGAR OMAR PIÑA BARRAZA

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Gerardo A. Corzo Burguete

Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Nina Pastor

Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Dr. Ignacio López González

Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Lourival D. Possani Postay

Instituto de Biotecnología, UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 Importancia del estudio de las interacciones proteína-proteína.....	9
1.2 Métodos experimentales para el estudio de interacciones proteína-proteína.....	10
1.3 Métodos Computacionales	10
1.4 Canales iónicos y toxinas.....	11
1.4.1 Canales de Potasio (K ⁺) Dependientes de Voltaje.	12
1.4.2 Toxinas de Alacrán.....	14
1.5 Estado del arte: Interacción α -KTx-Kv	14
2. ANTECEDENTES.....	17
2.1 Discrepina	17
2.2. Estudios de Interacción con la Discrepina.....	18
3. JUSTIFICACIÓN.....	20
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVO GENERAL.....	21
5.1 Objetivos particulares	21
6. MÉTODOS.....	22
6.1 Búsqueda del canal blanco	22
6.2 Modelado por homología.....	23
6.3 Docking Molecular	24
6.4 Clasificación de los modelos.....	24
6.5 Refinamiento de complejos	25
6.6 Simulaciones con PELE.....	26
6.7 Mutantes y Diseño	26
6.8 Purificación y plegamiento de variantes.....	27
7. RESULTADOS	28

7.1 Búsqueda del receptor blanco	28
7.2 Actividad de Discrepina y variantes en el canal Shab	29
7.3 Modelado por homología de canales Shab, Kv4.3 y de variantes de Discrepina.	31
7.4 “Docking” de la interacción Shab y la variante V6K-D20K	32
7.4.1 Estrategia ZRANK	32
7.4.2 Estrategia FireDock	32
7.4.3 Estrategia FoldX.....	33
7.4.4 Análisis de los 3 modelos	34
7.5 Análisis de residuos en los modelos con Shab.....	34
7.5.1 Escaneo de posiciones con FoldX.....	34
7.6 Mutantes In Silico	38
7.7 Análisis estructural de las mutaciones	40
7.8 Simulación con PELE y Barrido de Alaninas	42
7.9 Diseño de variantes.....	43
7.10 Purificación y plegamiento de nuevas variantes	45
7.11 Actividad de Discrepina y variantes en el Kv4.3	47
7.12 “Docking” de la interacción Kv4.3 y la variante V6KD20K	48
7.12.1 Estrategia ZDOCK-ZRANK.....	48
7.12.2 Estrategia CLUSPRO 2.0.....	49
7.11.3 Estrategia RosettaDock.....	49
7.11.4 Elección del modelo Kv4.3-DM.....	50
7.12 Escaneo de posiciones en los modelos Kv4.3	51
7.13 Simulación con PELE y barrido de alaninas de Kv4.3-DM (M2).....	53
7.13 Resultados de nuevas variantes en el canal Shab y Kv4.3.....	54
7.13.1 En Shab.....	54
7.13.2 En Kv4.3	55
7.14 Discusión y análisis de las nuevas variantes en el canal Shab.....	56
7.15 Discusión y análisis de las nuevas variantes en el canal Kv4.3.....	59

7.16 Diseño 2	60
8. CONCLUSIONES	66
9. PERSPECTIVAS	69
10. REFERENCIAS.....	70

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura general de la unidad transmembranal de los Kv	13
Figura 2. Modos de interacción.....	15
Figura 3. Inhibición del canal Shab por la variante [V6K-D20K].....	29
Figura 4. Constantes de disociación.	30
Figura 5. Alineamiento de Shab, Kv4.3 y Kv1.2, y de la Discrepina con la variante V6KD20K.....	31
Figura 6. Superposición de los 3 modelos finales.....	34
Figura 7. Permisividad de residuos de Discrepina en el modelo Shab.....	35
Figura 8. Diagrama de cajas con la distribución de todas las mutaciones que fueron benéficas en cada posición.	36
Figura 9. Diagrama de dispersión de mutaciones independientes.	37
Figura 10. Promedio de cambios aceptados en los 3 modelos.....	38
Figura 11. Regresiones lineales de los $\Delta\Delta G$ experimentales en función del $\Delta\Delta G$ calculado con FoldX en los 3 Modelos.....	39
Figura 12. Interacción de los residuos V6K, I19R y D20K.....	40
Figura 13. Vista superior de superficie electrostática de Shab en unión con Discrepina (izq) y DM (der).....	41
Figura 14. Simulación con PELE de M1 y M3.....	42
Figura 15. $\Delta\Delta G$ de interacción en barrido de alaninas de M1 con M3.....	43
Figura 16. Mutaciones T35L y T35I en M1.	44
Figura 17. Mutaciones en FoldX de nuevas variantes.....	45
Figura 18. Cromatogramas de purificación y plegamiento de las variantes de Discrepina R25A y TMD.	46
Figura 19. Dicroísmo Circular de Discrepina y variantes..	46
Figura 20. Curva de IC_{50} para Kv4.3 con Discrepina y DM.	47
Figura 21. Modelo ZDOCK-ZRANK.....	48
Figura 22. Conformación más representativa encontrada en ClusPro2.0.	49
Figura 23. Superposición de los modelos Rosetta02 (M2) en cyan y Rosetta07 (M1) en naranja.	50
Figura 24. Simulación con PELE (Kv4.3-DM).....	51
Figura 25. Permisividad de los modelos de Kv4.3 con DM.....	52
Figura 26. Vista superior de superficie electrostática de Shab (izq) y Kv4.3 (der).....	52
Figura 27. Simulación con PELE de la estructura 66 (Kv4.3-DM) de la primer corrida (M2).....	53
Figura 28. Barrido de alaninas de estructuras de la 2da corrida de Kv4.3-DM (Fig. 27).	54
Figura 29. Ensayos electrofisiológicos de las nuevas variantes TMD y R25A	54
Figura 30. Dosis-respuesta de nuevas mutantes de Discepina.....	55
Figura 31. Energías in silico de estabilidad e interacción en Shab de M1 y M3.	57
Figura 32. Regresión lineal de nuevas variantes y DM respecto a datos experimentales.....	58

Figura 33. RMSD de estructuras PELE, cálculos de Interface y ΔG de hidrofobicidad de las estructuras con mejor energía de interacción en la simulación (flechas en gráfica).....	60
Figura 34. Simulación 1 del M1-Shab para el Diseño 2.....	61
Figura 35. Simulación 2 del M1-Shab Estructura 3.....	62
Figura 36. Energía de interacción del barrido de alaninas en la estructura 41 de la simulación 2.....	63
Figura 37. Energía de interacción del escaneo de posiciones para la posición 12 con el comando “BuildModel”.....	65

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Toxinas de la subfamilia alfa-KTx15.	17
Tabla 2. Experimentos electrofisiológicos de las variantes de Discrepina, variantes y homólogos ...	19
Tabla 3. Ensayos de electrofisiología.....	28
Tabla 4. Constantes de afinidad de Discrepina y variantes con el Shab.....	30
Tabla 5. Top 10 de ZRANK.....	32
Tabla 6. Top 10 FireDock.....	33
Tabla 7. Top 10 FoldX.....	33
Tabla 8. Energías de estabilidad de interacción de las variantes de Discrepina con el canal Shab.....	38
Tabla 9. Resultados de PISA para T35L y T35I.....	44
Tabla 10. Energías de interacción de los modelos de RosettaDock con FoldX.....	50
Tabla 11. Energías de interacción de tres modelos de “docking” (Kv4.3-DM).....	51
Tabla 12. Energías experimentales e <i>in silico</i> de mutantes en Kv4.3.....	56
Tabla 13. Energías APBS de Shab con variantes.....	57
Tabla 14. Escaneo de posiciones de la estructura 41 de la simulación 2 a partir de 1 Kcal/mol.....	63
Tabla 15. Comparación con PISA de S12 y W12 en la estructura 41 de la simulación 2.....	65

Abreviaturas

Kv	:	Canal de potasio dependiente de voltaje
S5-P-S6:		Región del dominio del poro
KTx	:	Toxina de alacrán bloqueadora de canales de potasio voltaje dependientes
RMN	:	Resonancia Magnética Nuclear
PDB	:	Base de datos de proteínas o código utilizado en dicha base de datos
Da	:	Unidad de masa atómica (Dalton)
DM	:	Doble Mutante (V6K-D20)
TMD	:	Triple Mutante (S12L-D20K-T35L)
PELE:		Algoritmo para búsqueda de mínimos energéticos (Protein Exploration Landscape Energy)
TFA	:	Acido trifluoroacético
mM	:	Milimolar
μM	:	Micromolar
nM	:	Nanomolar
IC50:		Concentración en la que la inhibición es del 50%
RMSD:		Desviación de la media cuadrática (Root Mean Square Deviation)
Kcal/mol:		Kilo calorías por mol
IC	:	Intervalo de confianza

SOFTWARE UTILIZADO

ClustalX	http://www.clustal.org/
Modeller	http://www.salilab.org/modeller/
ZDOCK	http://zdock.umassmed.edu/software/
ZRANK	http://zdock.umassmed.edu/software/
FireDock	http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/FireDock/
FoldX	foldx.crg.es/
ClusPro2.0	cluspro.bu.edu/
RosettaDock	rosettadock.graylab.jhu.edu/
PLOP	http://www.jacobsonlab.org/plop_manual/plop_license.htm
PELE	http://spin.wustl.edu/pele/
PISA	http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html
PYMOL	www.pymol.org/
APBS	http://www.poissonboltzmann.org/apbs

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia del estudio de las interacciones proteína-proteína

Las proteínas son las macromoléculas biológicas más abundantes, encontrándose en todas las células y representando más de la mitad del peso seco de las mismas. Participan en prácticamente todos los procesos celulares¹ y en la mayoría de los casos no actúan solas y si con otras proteínas para formar complejos y así poder llevar a cabo su función². Esta capacidad de interacción está mediada principalmente por su estructura terciaria y por las propiedades fisicoquímicas de sus aminoácidos. Es decir, la capacidad de unirse entre ellas depende primordialmente de dos factores: la complementariedad en la zona de interacción (interface) y la afinidad entre los aminoácidos involucrados en dicha interacción.

Las interacciones proteína-proteína son esenciales en la mayoría de los procesos celulares y están involucrados en prácticamente todos ellos, desde la comunicación celular, la traducción de señales, la formación de estructuras de soporte en las células, hasta incluso en fenómenos de intoxicación. Cualquier desregulación en las redes proteicas de interacción, o defecto en proteínas estructurales puede conducir al desarrollo de diversas enfermedades^{3,4}. Novedosas técnicas experimentales como la de “Dos Híbridos” (Y2H) están ahora disponibles para investigar las redes de interacción en los sistemas celulares y han permitido obtener un panorama más amplio sobre las mismas⁵. La importancia de estas redes queda en evidencia en un estudio donde se revela que de ~2,000 proteínas de levadura al menos el 80% de ellas interacciona con otra proteína⁶. Sin embargo, para una comprensión completa del fenómeno de interacción, información estructural de los complejos resulta esencial. Esta información, además de permitirnos entender los mecanismos de afinidad y especificidad, proporciona herramientas indispensables para el desarrollo y diseño racional de proteínas con fines biomédicos.

1.2 Métodos experimentales para el estudio estructural de interacciones proteína-proteína

Los métodos experimentales más utilizados para resolver y estudiar estructuras de proteína son la cristalografía de rayos X y la Resonancia Magnética Nuclear (RMN). La cristalografía de rayos X consiste en el bombardeo de rayos X a un cristal de proteína que va a producir un patrón de difracción determinado. Esta difracción se da porque los rayos X tienen una longitud de onda del tamaño del radio atómico, y son los ángulos y las intensidades de los puntos difractados los que ayudan a generar la densidad electrónica de la molécula. Esta densidad electrónica, a su vez, se utiliza para determinar la posición de los átomos.

En la RMN se aprovecha el momento magnético de los átomos que poseen un número impar de protones o neutrones. Estos átomos, al introducirse en un campo magnético externo se orientan a favor dicho campo, y al relajar el sentido de la orientación el sistema entra en resonancia. Esto produce, con una radiofrecuencia adecuada, una irradiación del sistema la cual se detecta con una señal de absorción que será utilizada para calcular las posiciones y vecindades de dichos átomos.

Estos métodos, aunque son los más precisos, tienen algunas desventajas: Ambos requieren una cantidad significativa de proteína, además, la complejidad para resolver su estructura aumenta cuando se trabaja con complejos conformados por 2 o más cadenas polipeptídicas dentro del sistema, lo que se ve reflejado en la base de datos del “Protein Data Bank” (PDB), donde solo el 1.5% de las estructuras depositadas pertenecen a este grupo⁷. En este sentido, uno de los objetivos de la bioquímica actual es desarrollar herramientas que nos permitan abordar la interacción proteína-proteína mediante técnicas y metodologías alternativas.

1.3 Métodos Computacionales

En los años recientes, las técnicas de modelado molecular han tenido grandes avances, lo que se refleja en el surgimiento de revistas especializadas como “PloS Computational Biology” y “The Journal of Molecular Modeling”, entre otras. Las principales razones de esta son el gran aumento de datos estructurales de proteínas disponibles en las bases de datos, las cuales sirven de modelo para generar estructuras *in silico*, así como también a los avances en las ciencias computacionales, con equipos cada vez más poderosos que permiten abordar

problemas cada vez más complejos. Estos dos sucesos van de la mano debido a que los algoritmos desarrollados para la predicción de estructuras están basados en la información que arrojan los datos experimentales, por lo que una mejor calidad y un mayor número de estructuras repercuten en algoritmos más robustos y a su vez en mejores modelos⁸.

Las principales y más utilizadas técnicas para el modelamiento molecular son el Modelado por Homología y el “Docking Molecular”, el primero enfocado a predecir el plegamiento de una determinada proteína basándose en un homólogo con estructura resuelta, y el segundo en predecir la interacción entre proteínas.

El modelado por homología se basa en 3 principios fundamentales: 1) Que durante su evolución biológica las proteínas tienden a preservar su estructura⁹; 2) Diferentes proteínas, incluso cuando no se puede detectar ninguna relación evolutiva a partir de secuencias homólogas, pueden tener una estructura similar^{10,11}; y 3) Las proteínas están compuestas generalmente por sub-estructuras locales similares¹².

Por otro lado, el “Docking Molecular” (literalmente “acoplamiento molecular”) tiene como propósito principal predecir la orientación preferente de una molécula respecto a otra mediante funciones matemáticas que evalúan la fuerza de interacción. Estas fuerzas se calculan con base en el número de interacciones intermoleculares favorables, tales como enlaces de hidrógeno, interacciones van der Waals y electrostáticas o Coulombianas, entre otras¹³.

Estas dos técnicas cobran mayor relevancia con proteínas que son difíciles de abordar de manera *in vitro*, como las proteínas de membrana. En un artículo del 2010 se predijo que alrededor del 26% de los genes codificadores de proteínas de humano pertenecen a proteínas de membrana, por lo que se calcula que al menos deben de existir 5539 genes de estas proteínas¹⁴. A pesar de este número, actualmente solo se tienen resueltas 533 estructuras únicas, lo que representa menos del 1% del total depositado en el Protein Data Bank (PDB)¹⁵.

1.4 Canales iónicos y toxinas

Entre las proteínas de membrana se encuentran las que conforman los canales iónicos. Éstos forman poros en la membrana que permiten el paso selectivo de iones inorgánicos, y están principalmente involucrados en la excitabilidad de células nerviosas y de corazón, aunque también están presentes en células no excitables e incluso en bacterias, levaduras y plantas¹⁶.

Estos canales iónicos son de gran importancia médica, debido a que defectos o mutaciones en ellos conduce a diversos desórdenes fisiológicos, tales como renales, cardíacos, neurológicos, entre otros. Por ello, conocer la estructura y el funcionamiento de estos canales es esencial para un posterior desarrollo de fármacos que actúen sobre ellos.

Uno de los fenómenos en los que se encuentran relacionados los canales iónicos, y que es el que nos compete en este trabajo, es el de intoxicación por moléculas peptídicas. El veneno de algunos animales, generalmente, contiene una gran variedad de proteínas llamadas toxinas que actúan modulando o bloqueando las corrientes de diferentes canales iónicos. En particular, el veneno de los alacranes tiene una gran diversidad de péptidos específicos para canales de potasio (K^+) dependientes de voltaje, por lo que han servido como herramientas para el estudio y caracterización de los mismos^{17,18}.

En este trabajo, se está interesado en el estudio de una toxina de alacrán que actúa como bloqueadora de varios canales de potasio dependientes de voltaje (Kv). Una mejor comprensión del proceso de reconocimiento ayudará al desarrollo de péptidos con mayor afinidad y especificidad, los que a su vez podrán ser utilizados para tener una mejor comprensión del funcionamiento de los canales iónicos y como potenciales fármacos de patologías relacionadas a sus canales blanco.

1.4.1 Canales de Potasio Dependientes de Voltaje (Kv).

Los Kv conforman la familia más grande dentro del grupo de los canales de potasio, el cual también incluye los activados por Ca^{2+} (KCa), los rectificadores de entrada rápida (Kir) y los de dos poros (K2P)¹⁹. Son altamente selectivos y desempeñan un papel vital en la regulación de la excitabilidad celular en neuronas y músculo durante los potenciales de acción, encargándose principalmente de regresar a la célula al estado de reposo²⁰. El típico Kv es una estructura de 4 subunidades proteicas idénticas rodeando a un poro central. Cada subunidad tiene 6 hélices transmembranales (S1-S6), con el C- y N- terminal en el lado intracelular y cada subunidad se divide en dos dominios: El dominio sensor de voltaje (S1-S4), donde la hélice S4 posee múltiples cargas positivas, tentativamente responsables de detectar los cambios de voltaje; y el dominio del poro, que comprende las hélices S5-P-S6, donde el filtro de selectividad se forma con el asa que une ambas hélices (**Fig. 1**).

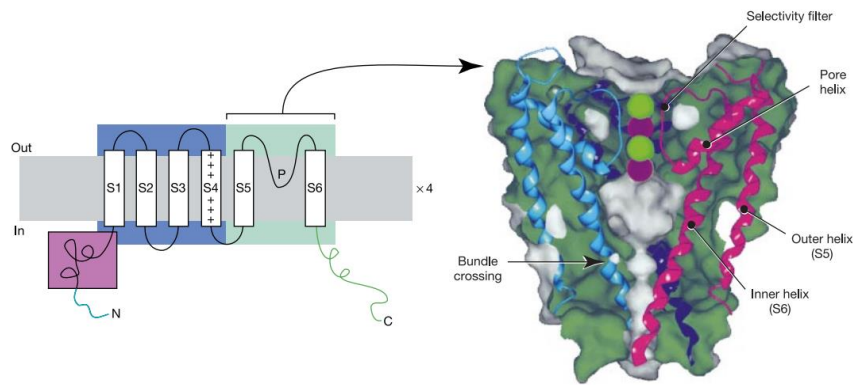


Figura 1. Estructura general de la unidad transmembranal de los Kv (tomada de Yellen, 2002)²⁰. El esquema de la izquierda muestra la topología general de una subunidad. Los rectángulos S1 a S6 representan a las hélices transmembranales, dividiéndose en azul el dominio sensor de voltaje y en verde el dominio del poro. La parte de arriba de ese esquema es la zona extracelular, ya la de abajo, donde se encuentran el amino- y carboxilo terminal, la intracelular. A lado del esquema se muestra una estructura tridimensional del Kv en representación de caricatura.

La primera estructura de un canal de potasio fue resuelta en 1998 por el grupo de MacKinnon²¹. A pesar de ser un canal de bacteria y no ser voltaje dependiente, posteriores estructuras del Kv1.2 de mamífero confirmaron el alto grado de conservación estructural entre estos canales^{22,23}.

Los Kv están divididos en familias según su similitud en secuencia, pero también pueden ser clasificados según la cinética de la corriente registrada. Mediante el tipo de corriente los canales Kv se dividen principalmente en 4 tipos:

- Rectificadores tardíos (De inactivación lenta o nunca inactivados)
- Corrientes tipo-A (De inactivación Rápida)
- Rectificadores de Salida
- Rectificadores de Entrada

Estos canales tienen algunas características que les añaden diversidad y complejidad como son: 1) La Heterooligomerización de las cuatro cadenas polipeptídicas son necesarias para un canal funcional. Estas subunidades pueden combinarse dentro de la misma familia, y les confiere características únicas a los mismos; 2) Interaccionan con subunidades modificadores, por ejemplo, las familias Kv5, Kv6, Kv8 y Kv9 las cuales codifican subunidades que no producen canales funcionales por sí mismas, sino que forman heterotetrámeros con la familia Kv2, incrementando la diversidad funcional de la familia; 3) Interacción con proteínas accesorias, por ejemplo, una variedad de otros péptidos han mostrado asociación con los Kv modificando sus propiedades. Entre estas proteínas accesorias se puede mencionar el

KCHIP2 (Kv4), calmodulina (Kv10) y MinK (Kv11), entre otras. 4) “Splicing” alternativo de ARNm en donde algunas familias (Kv2, Kv3, Kv6, Kv7, Kv10 y Kv11) tienen regiones codificantes formadas por varios exones que son empalmados alternativamente, proveyendo de otra fuente de diversidad; y 5) Modificaciones post-traduccionales, en donde algunos canales son modificados por fosforilación, ubiquitinación y palmitoilación, que modifican la función del canal iónico^{19,24}.

1.4.2 Toxinas de Alacrán

Por su afinidad, diversas toxinas de alacrán han sido utilizadas para estudiar la estructura y función de los canales iónicos. Entre las mejor caracterizadas del veneno de estos animales se encuentran las toxinas específicas para canales de Sodio (NaTx) y aquellas específicas para canales potasio (KTx).

Las KTx se dividen en 3 familias: α , β y γ ²⁵. Las toxinas β y γ son el grupo minoritario. Las γ se diferencian de las otras dos porque son específicas para los Kv denominados ether-go-go (Kv11.x) y las toxinas β por ser más grandes, llegando hasta 64 aminoácidos de longitud²⁶.

Las toxinas α (α -KTx) representan el grupo más numeroso, con péptidos de 23 a 43 aminoácidos de longitud, entre los cuales se cruzan 3 o 4 enlaces disulfuro²⁷. En la base de datos “Animal Toxin Database” se tienen registradas 20 subfamilias de este tipo de péptidos. Las α -KTx han probado ser una herramienta poderosa para estudiar las características farmacológicas, biofísicas y estructurales de los canales de K⁺. La localización del sitio de unión de las α -KTx con la parte externa del poro del canal fue crítica para la identificación de los aminoácidos que forman el poro y para el mapeo en la superficie de interacción²⁸.

1.5 Estado del arte: Interacción de las Toxinas de Alacrán con los Kv

En una revisión de Rodríguez de la Vega et al., (2003)²⁷, se describieron 3 tipos de interacción para estos péptidos. El primero y mejor documentado (“modo clásico”), consiste en la hoja beta de la toxina bloqueando el poro del canal mientras una “K” se introduce en el filtro de selectividad (**Fig. 2**, izquierda); el segundo, reportado en toxinas específicas a canales KCa, consiste en la hélice de la toxina bloqueando el poro del canal (**Fig. 2**, centro); el tercer tipo,

presente en toxinas γ específicas a canales Herg, consiste en una interacción donde la toxina está posicionada con la hélice de modo vertical sobre el poro (**Fig. 2**, derecha).

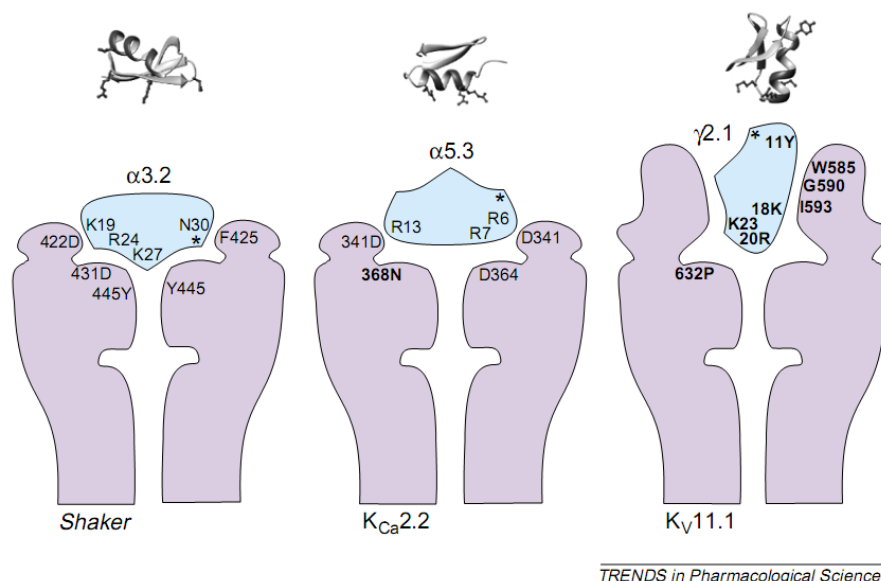


Figura 2. Modos de interacción (Rodríguez de la Vega et al., 2003)

La interacción de estas moléculas ha sido estudiada mediante diversas metodologías, pero la información más detallada ha sido obtenida mediante estudios computacionales^{29,30}, ciclos de dobles mutantes¹⁸ y estudios de RMN^{31,32}. En estos trabajos se ha obtenido información valiosa sobre los residuos responsables en la afinidad por los canales. Dos residuos que se conservan en la mayoría de las KTxs de alacrán han sido reportados como importantes en toxinas bloqueadoras de K_v. Estos residuos son una “K” y un aminoácido aromático, comúnmente una “Y”, y a los cuales se les ha llamado como “diada funcional”. Se ha visto que mutaciones en cualquiera de estos 2 residuos repercute drásticamente en la afinidad. Los residuos “K” y “Y” también se encuentran conservados en toxinas de otros animales³³. Otros resultados importantes que han arrojado estudios de estructura en estos complejos es el de la Kaliotoxina con el K_v1.3. En un estudio por RMN en estado sólido se demuestra que el cambio conformacional del K_v1.3 más significativo, al interaccionar con la toxina, se da en el filtro de selectividad³¹ y, de manera sorprendente, no se observan cambios drásticos en las señales de RMN en lo que resta de las subunidades, lo cual no es fácilmente explicable dada la naturaleza asimétrica de la toxina. Posteriormente, en un estudio más detallado de dinámica molecular en conjunto con estudios de RMN y electrofisiología se demostró, que, en efecto, hay cambios en esa región, los que a su vez tienen una explicación electrofisiológica. Todo esto viene a relación por un estudio previo, donde al mutarse un residuo “D” por “A”, el canal ya no logra entrar al estado inactivado³⁴, lo cual se explica por la ruptura de la

interacción del par “E-D” del canal. En el estudio de dinámica molecular se pudo observar cómo, al acercarse la toxina, el “D” se voltea con dirección al exterior para interactuar con ella. A su vez, se demostró que la toxina tiene mayor afinidad en el estado activado del canal, lo que indicaría que la interacción de este par de residuos ácidos es una de las principales determinantes para mantener al canal en estado inactivado³⁰.

La única estructura de un complejo toxina-canal resuelta hasta el momento es el de la KcsA con la charibdotoxina (PDB: 2A9H)³², la cual fue utilizada como punto de partida para una evaluación del programa FoldX, que a su vez se utilizó para generar las mutaciones *In Silico* de este trabajo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Discrepina

La Discrepina (α -KTx15.6) es un péptido que proviene del veneno del alacrán *Tityus discrepans*. Tiene 38 aminoácidos de longitud, con un grupo piroglutámico en la región N-terminal y una masa molecular de 4,177.7 Da³⁵. Posee el motivo estructural alfa/beta estabilizado por cisteínas (α/β -EC), característico de las toxinas de alacrán, que consiste en una hélice alfa empaquetada por medio de enlaces disulfuros con una hoja beta. Su estructura se encuentra resuelta experimentalmente por medio de RMN y depositada en la base de datos “Protein Data Bank” con el código 2AXK³⁶. Al igual que las demás toxinas de la subfamilia α -KTx15, bloquea corrientes Tipo-A de canales de potasio dependientes de voltaje. Se han reportado 6 miembros de esta subfamilia de toxinas capaces de bloquear estos canales (Tipo-A). Sin embargo, solo se encuentra resuelta la estructura de la Discrepina, y existe poca información de los residuos involucrados en el reconocimiento hacia su receptor³⁷.

La Discrepina tiene algunas características en su estructura primaria que la destacan de otras toxinas de animales dentro de la subfamilia α -KTx15; su secuencia de aminoácidos tiene entre 48 y 51% de identidad con respecto a las demás, mientras que el resto son relativamente más conservadas entre ellas, con más de 89% de identidad. Otra característica única de Discrepina es que posee la inserción de una “K” extra (K13) en la región del N-terminal. También es de destacar la alta variabilidad en la zona entre “C” 3 y 4, respecto a las otras secuencias (**Tabla 1**).

Tabla 1. Toxinas de la subfamilia alfa-KTx15.

Péptido	Secuencia de Aminoácidos	Identidad (%)
Discrepin	ZIDTNVKCSGSSKCVKICIDRYNTRGAKCINGRCTCYP	100
Aa1	ZNETNKKCQGGSCASVCRRVIGVAAGKCINGRCVCYP	48
BmTx3	ZVETNVKCQGGSCASVCRKAIGVAAGKCINGRCVCYP	51
AmmTx3	ZIETNKKCQGGSCASVCRKIVIGVAAGKCINGRCVCYP	51
AaTx1	ZIETNKKCQGGSCASVCRRVIGVAAGKCINGRCVCYP	51
AaTx2	ZVETNKKCQGGSCASVCRRVIVVAAGKCINGRCVCYP	48
	* : ** * * . * * * . . : * . . . ***** . ***	

Z = Grupo piroglutámico. El asterisco (*) indica que se conserva el residuo en esa posición, los dos puntos (:) que hay un residuo con propiedades estructurales o fisicoquímicas similares, el punto (.) que hay residuos ligeramente parecidos y el espacio que son residuos con diferentes.

Se ha demostrado, en ensayos de electrofisiología con células granulares de cerebelo de rata, que la Discrepina bloquea de manera irreversible la corriente Tipo-A. Esto se observó mediante un ensayo donde no se aprecia una recuperación de la corriente después del lavado, característica que solo había mostrado anteriormente la toxina BmTx3³⁵.

A su vez se ha reportado que las corrientes Tipo-A son producidas por miembros de tres familias de canales Kv: Kv1.4, Kv3.4 y la Kv4.x. En células granulares de cerebelo se considera que esta corriente es generada principalmente por los canales Kv4 ya que existen reportes donde se ha observado una gran abundancia de los mismos^{24,38,39}. Los canales de Potasio, responsables de las corrientes Tipo-A, son de particular interés porque regulan la frecuencia de disparo, la fase ascendente y la forma del potencial de acción en las células excitables y pueden contribuir a funciones especializadas como el aprendizaje, la memoria o el comportamiento. Por esto los canales iónicos que producen corrientes tipo A representan un blanco interesante para controlar desordenes relacionados al SNC, como la epilepsia, demencia, ansiedad, el dolor y la depresión²⁴.

2.2. Estudios de Interacción con la Discrepina

Diversos esfuerzos se han realizado con el objetivo de entender y encontrar los residuos importantes en el efecto de bloqueo de la Discrepina en las corriente tipo A de células granulares de cerebelo. Anteriormente, se produjeron 8 variantes de la Discrepina, las cuales fueron sintetizadas químicamente (V6K, I19R, D20K, T35V, I19R-D20K, I19R-D20K-R21V, V6K-D20K y una delección de K13), plegadas y analizadas electrofisiológicamente⁴⁰. En la Tabla 2 se muestra que la sustitución de los residuos V6 y D20 por un aminoácido cargado básicamente (K) incrementó la actividad bloqueadora de la Discrepina, específicamente las mutaciones V6K y D20K en el segmento N-Terminal de la toxina. No obstante, se obtuvo información de los residuos importantes para el bloqueo, pero el efecto de la irreversibilidad no pudo ser explicado, por lo que son necesarios más estudios de estructura y función con el péptido y su receptor. Otras variantes han sido ensayadas demostrando la importancia en la interacción, como K13, residuo que al ser eliminado de la secuencia reduce el bloqueo hasta un orden de magnitud.

Tabla 2. Experimentos electrofisiológicos de la Discrepina, sus variantes y 3 homólogos.

Péptido	Corriente tipo A* (IC ₅₀ , nM)
WT Discrepina	190 ± 30
[V6K, D20K]	22 ± 2.0
[K13delección]	>2000
V6K	51 ± 4.7
I19R	335 ± 45
D20K	96 ± 21
[I19R, D20K]	235 ± 87
[I19R, D20K, R21V]	764 ± 238
T35V	261 ± 25
Aa1	150 ± 12
BmTx3	54
AmmTx3	131

*Corriente tipo-A en células granulares del cerebelo

En este trabajo se propuso buscar blancos de la Discrepina que permitan estudiar su interacción mediante el uso de herramientas computacionales aprovechando las mutantes que ya se tienen, y nuevas a proponer, para hacer estudios de correlación entre la simulación molecular y los datos experimentales.

3. JUSTIFICACIÓN

Las herramientas de Modelado Molecular surgen como una alternativa en el estudio estructural de los canales de potasio y sus ligandos, dada la dificultad que representa resolver experimentalmente sus estructuras y, además, su conservación estructural nos permite modelarlos con buen grado de confiabilidad.

Una mejor comprensión de los detalles de la interacción de las toxinas con los Kv nos permitirá conocer las determinantes moleculares de la especificidad y, con esto, se tendrán herramientas para desarrollar ligandos con mejor afinidad.

4. HIPÓTESIS

La correlación de la afinidad obtenidos de forma *in vitro* con la determinación de propiedades obtenidas a través de simulación molecular permitirá resolver detalles moleculares de la interacción de Discrepina con sus receptores y se podrá predecir las modificaciones para diseñar variantes que mejoren la afinidad y especificidad de la toxina.

5. OBJETIVO GENERAL

Identificar los sitios de interacción entre la Discrepina y sus receptores mediante la comparación de datos experimentales con datos *in silico*.

5.1 Objetivos particulares

1. Identificar canales blanco de la Discrepina mediante ensayos electrofisiológicos con los canales Shaker, Shab, de *Drosophila melanogaster*, y los de humano Kv1.4 y Kv4.3.
2. Construir modelos de los Kv identificados como blanco y de las variantes de la Discrepina mediante modelado por homología.
4. Generar modelos de los complejos de la Discrepina y sus variantes con los Kv blanco mediante técnicas de “Docking Molecular”.
5. Diseñar variantes mediante herramientas computacionales para el diseño de proteínas con la finalidad de predecir los cambios de afinidad con su receptor.

6. MÉTODOS

6.1 Búsqueda del canal blanco

Los ensayos de electrofisiología se llevaron a cabo en colaboración con 3 laboratorios. En el laboratorio del Dr. Froylan Gómez Lagunas, de la Facultad de Medicina de la UNAM, se ensayaron, en primera instancia, la Discrepina y su variante V6K-D20K (DM). El primer canal probado, dada su naturaleza de corriente tipo-A fue el Shaker. También se ensayó el canal Shab, ambos del insecto *Drosophila melanogaster*. El protocolo para el experimento fue el siguiente:

Se ensayó la Discrepina y su variante DM en los canales antes mencionados expresados de manera heteróloga en la línea celular de insecto Sf9. Se infectó con una multiplicidad de infección de 10 con un baculovirus recombinante conteniendo el cDNA de Shab11. Los registros electrofisiológicos se realizaron 48 h después de la infección. Posteriormente, en la electrofisiología, se registraron corrientes macroscópicas bajo fijación de voltaje utilizando la configuración de “whole-cell” de patch-clamp, empleando un amplificador Axopatch 1D (Axon) y una interface Digidata 1322A (Axon). Los canales se activaron con pulsos despolarizantes de 30 ms de -50 a +50 mV aplicados en incrementos de 10 mV desde el potencial de mantenimiento de -80 mV, aplicándose cada 3 segundos.

En colaboración con la Dra. Rita Restano-Cassulini de nuestro laboratorio se ensayó el canal Kv4.1 de rata, expresado de manera heteróloga en células CHO de humano.

Los ensayos de los canales Kv4.3 se realizaron en el Instituto de Biofísica de Genova (Italia) por la Dra. Cristiana Piccoy del Kv4.3 en el laboratorio de neurobiología estructural de la universidad de Leuven, Bélgica, a cargo del Dr. Jan Tytgat.

De estos canales ensayados se encontró bloqueo con el canal Shab, Kv4.2 y el Kv4.3. Detalles en la sección de resultados.

6.2 Modelado por homología

Se realizaron modelos por homología de los canales Shab y Kv4.3 con el programa Modeller9v8⁴¹. El procedimiento que se siguió es el siguiente:

Shab y Kv4.3

- 1) *Elección de plantilla.* La plantilla a escoger debe de ser el de mejor resolución y con mayor similitud de secuencia respecto al de interés. En este caso, la estructura con mejor resolución es la de la quimera Kv2.1-1.2 (PDB:2R9R). En particular, se realizó una inspección detallada de la densidad electrónica en la zona del poro, donde 2R9R mostraba mayor coherencia entre la densidad electrónica calculada y la estructura reportada de esta región.
- 2) *Alineamiento.* El alineamiento se realizó solamente en la región S5-P-S6, por ser donde se encuentra la zona de interface del canal con las α -KTx. Todos los alineamientos fueron generados con el programa ClustalX⁴².
- 3) *Modelamiento.* Se utilizaron restricciones de simetría -como es recomendado por los desarrolladores del software para proteínas con múltiples cadenas polipeptídicas- con la finalidad de tener conformaciones similares en cada monómero. También recomiendan generar un mayor número de modelos en lugar de crear uno con un nivel alto de parametrización, por lo que se generaron 100 modelos y se escogió el de menor energía. Posteriormente se realizó una minimización energética del modelo mediante el método de descenso rápido con las condiciones predeterminadas del programa Chimera para eliminar posibles inconsistencias estéricas.

V6K-D20K:

- 1) *Elección de plantilla.* Se omite una búsqueda de plantilla al ya encontrarse resuelta la estructura de la Discrepina.
- 2) *Alineamiento de las dos secuencias.*
- 3) *Modelamiento.* Para una mayor diversidad de conformaciones se decidió usar las 10 estructuras del archivo del PDB: 2AXK para modelar la variante V6K-D20K (DM). Se generaron 100 modelos por cada estructura de la Discrepina y se escogieron los 5 de menor energía de cada una.

Las estructuras se relajaron mediante una minimización energética con el método descensos rápidos para eliminar repulsiones estéricas.

6.3 Docking Molecular

Dada su mejor afinidad, DM se utilizó para el “Docking” con los canales. Esto se realizó, pensando que los dos residuos cambiados se encontrarían haciendo alguna interacción, lo que podría servir en la selección de los modelos del complejo.

Shab-DM

El “Docking” para el complejo Shab-DM se realizó con el programa ZDOCK3.0⁴³. En el primer caso se dejó rotar libremente a los modelos de DM en el poro del Shab. Para esto, lo primero que se hizo fue restringir el “Docking” a la región del poro, bloqueando la búsqueda en las regiones transmembranales, y la parte intracelular del canal. Se utilizó la opción de 6° en la rotación del ligando y se calcularon 54,000 complejos en cada corrida de “Docking” (54,000x9 = 486,000*) ordenados de menor a mayor energía de acuerdo a la función de energía de ZDOCK. Se eliminan átomos de hidrógeno antes de cada corrida.

Kv4.3-DM

El Docking de estas proteínas se realizó con ZDOCK de la misma manera en la que se describió para Shab-DM. También se enviaron a los Servidores ClusPro2.0 y RosettaDock. Para los últimos dos se sometieron 5 corridas con 5 modelos de DM distintos.

6.4 Clasificación de los modelos

Los 54,000 complejos de cada corrida se sometieron a un re-cálculo de la energía de interacción con ZRANK, el cual ha mostrado mejorar significativamente el éxito en las predicciones iniciales de ZDOCK⁴⁴. Antes de usar ZRANK se tienen que agregar los hidrógenos polares en las proteínas.

6.5 Refinamiento de complejos

Los programas para refinar y elegir los complejos fueron: PLOP⁴⁵, FireDock⁴⁶ y FoldX⁴⁷. El programa PLOP se usó exclusivamente para minimizaciones energéticas, mientras que FireDock para refinar mediante librerías de rotámeros y FoldX para elegir otro modelo con base a una función de energía distinta. Se decidió seguir 3 estrategias, en donde se escogería el mejor modelo en cada una, donde el criterio final para elegir sería la energía de enlace calculada por ZRANK, FireDock y FoldX, respectivamente. Las estrategias fueron las siguientes:

Estrategia ZRANK (Modelo 1)

En esta estrategia se escogió el mejor modelo según la función de energía de ZRANK. Primero se hicieron minimizaciones energéticas con PLOP a los 10 mejor posicionados en la lista de ZRANK. Una vez minimizados, se volvió a calcular la energía de enlace con ZRANK y se seleccionó el de menor energía.

Estrategia FireDock (Modelo 2)

Los mejores mil de la lista de ZRANK se recalcularon con FireDock mediante 2 pasos:

- 1) Los mil modelos fueron recalculados con FireDock permitiendo flexibilidad – mediante una librería de rotámeros restringida en las regiones con repulsiones estéricas– entre las moléculas y 25 ciclos de optimización de cuerpos rígidos (RBO por sus siglas en inglés).
- 2) Los 25 con mejor energía del paso anterior se sometieron a un refinamiento completo. Este consiste en darle flexibilidad a todas las cadenas laterales presentes en la

interface mediante una librería de rotámeros ampliada y 25 ciclos de RBO. En este paso fueron eliminados falsos positivos de manera manual, considerándose falsos positivos aquellos que no taparan en su totalidad el filtro de selectividad.

Los diez con la mejor energía -después de la refinación completa- se minimizaron con PLOP y posteriormente se calculó la fuerza de enlace -utilizando la función de FireDock- para elegir el de menor energía.

Estrategia FoldX (Modelo 3)

Las energías de interacción de los 10 minimizados con PLOP en la estrategia del modelo 1 se calcularon con la función de energía de FoldX, eligiéndose el de menor energía.

6.6 Simulaciones con PELE

Los 3 modelos en el refinamiento de complejos y el obtenido en RosettaDock para el complejo Kv4.3-DM se sometieron a simulaciones con PELE⁴⁴ para explorar el paisaje energético de las moléculas en interacción y buscar complejos más estables que nos puedan ayudar en un análisis más robusto de las energías de los residuos.

Se hicieron corridas para cada uno de los modelos con el programa PELE. Los parámetros que se le dieron al programa fueron perturbaciones ligeras a la toxina en conjunto con optimizaciones de cadenas laterales y ciclos de minimización en 500 pasos. PELE (Protein Energy Landscape Exploration), combina algoritmos de predicción de estructura con el método de Metrópolis Monte Carlo⁴⁸, y utiliza un campo de fuerza de todos los átomos. La técnica consiste principalmente en la perturbación del ligando seguido de muestreos de cadenas laterales y minimizaciones energéticas de las moléculas.

6.7 Mutantes y Diseño

Para estudiar la estabilidad de los residuos de la toxina en el complejo se utilizó el programa FoldX. En busca de una variante que incremente la afinidad por el canal se mutó cada uno

de los residuos de la toxina (con excepción de Z y C's) por los 18 aminoácidos restantes en los 4 modelos.

Se seleccionaron aquellos cambios que coincidieran en los 3 modelos con energías de estabilización favorables, o que pudieran ayudarnos a discernir entre los múltiples modelos obtenidos en los procesos de “Docking Molecular”.

6.8 Purificación y plegamiento de variantes

Se sintetizaron las mutantes seleccionadas en la sección de “Mutantes y Diseño” con la empresa GenScript. El péptido crudo se purificó mediante cromatografía líquida de alta presión en fase reversa (HPLC), utilizando como disolvente de elución TFA al 0.12% en agua (A) y TFA al 0.1% en acetonitrilo (B), en una columna C₁₈. Las fracciones con los pesos moleculares esperados se aislaron para su análisis.

Posteriormente se hicieron ensayos de plegamiento de la toxina. El proceso de oxidación de las cisteínas de las variantes de Discrepina se realizaron en una solución acuosa de Tris-base 0.2 M, con 1mM/0.1mM de glutatión reducido y oxidado, respectivamente. Todo esto se realizó a un pH de 8, dejándose a temperatura ambiente durante 12 h.

7. RESULTADOS

Basados en la descripción de los antecedentes se conoce de antemano que Discrepina afecta los receptores que generan las corrientes de potasio tipo A, por lo tanto, se seleccionaron aquellos canales de potasio dependientes de voltaje (Kv) disponibles en nuestro laboratorio y en laboratorios de colaboradores que investigan sobre la electrofisiología de los Kv. De esta manera, el Dr. Froylan Lagunas de la Facultad de Medicina de la UNAM realizó ensayos en los Kv Shaker y Shab de *Drosophila melanogaster*. La Dra. Rita Restano del Instituto de Biotecnología realizó ensayos en hKv1.4. Finalmente, el Dr. Jan Tytgat del Laboratorio de Toxicología de Leuven (Bélgica) y la Dra. Cristiana Picco del Instituto de Biofísica de Genova (Italia) realizaron ensayos en el rKv4.2 y rK4.3, respectivamente.

7.1 Búsqueda del receptor blanco

La búsqueda del receptor blanco más adecuado al desarrollo de este proyecto se realizó mediante el uso de la Discrepina y una variante de ella, la Discrepina [V6K-D20K] o DM, la cual tiene una alta actividad inhibitoria de las corrientes tipo A en células granulares de cerebelo de rata. Los resultados de inhibición de estos péptidos sobre los Kv indican que ambos péptidos fueron capaces de bloquear el canal Shab de *Drosophila melanogaster*, el Kv4.2 y el Kv4.3 (Tabla 3).

Tabla 3. Ensayos de electrofisiología

Péptido	IC ₅₀ (μ M)*				
	fShaker	fShab	hKv1.4	rKv4.2	rKv4.3
Discrepina	nd	0.160 (b)	>2 (nb)	2 (b)	0.270 (b)
V6K-D20K	>2(nb)	0.115(b)	>2 (nb)	3 (b)	0.144 (b)

*IC₅₀determinada.; nd= No ensayado; n/b = no bloquea; b = bloquea.
f = *Drosophila melanogaster*; h = Humano; hKv1.4, r = rata; rKv4.x

La Discrepina y la DM fueron capaces de inhibir las corrientes de los canales Shab y Kv4.3. Aunque también pudieron bloquear el canal Kv4.2, solo se seleccionó un canal para los ensayos electrofisiológicos, siendo éste el Kv4.3 ya que solo hay un cambio en la región S5-P-S6 (Ser por Ala) entre Kv4.2 y Kv4.3, encontrándose en una región de la hélice del poro que no forma parte de la interface.

7.2 Actividad de Discrepina y variantes en el canal Shab

El canal Shab es un canal de tipo “rectificador tardío” (**Fig. 3A**) y hasta el momento no se tenía reporte de ningún bloqueador de origen peptídico sobre este receptor ni de sus homólogos en mamífero⁴⁹ por lo que la Discrepina es el primero de este tipo. También es necesario señalar que en este canal es posible la recuperación de la corriente, a diferencia de los ensayos en las células granulares de cerebelo, donde el bloqueo es irreversible. La Fig. 3B muestra que el bloqueo es independiente de voltaje, cómo es común en esta familia de toxinas. La afinidad calculada (IC_{50}) para la Discrepina con el Shab fue de 160 nM (**Tabla 3**) y para la variante [V6K-D20K] fue de 115 nM (**Tabla 3; Fig. 3C**).

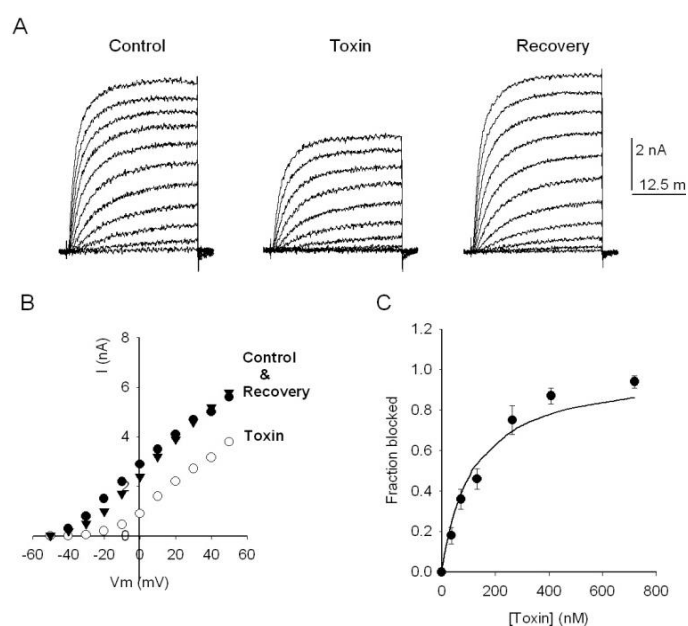


Figura 3. Inhibición del canal Shab por la variante [V6K-D20K]. A) Corrientes control (izquierda), en presencia de toxina (centro) y después de lavar durante 1 min (derecha); B) curva I-V de los trazos en A; C) curva dosis-respuesta ($IC_{50}=115\text{nM}$).

Una vez conocido que el canal Shab era susceptible a Discrepina, se ensayaron también otras variantes de este péptido (V6K, D20K e I19R, **Fig. 4**) con el propósito de obtener mayor y mejor información para evaluar los modelos que se generarán en el “Docking Molecular”. En la Fig. 4 se muestran las curvas dosis-respuesta de Discrepina y de las variantes V6K, D20K, V6KD20K y I19R

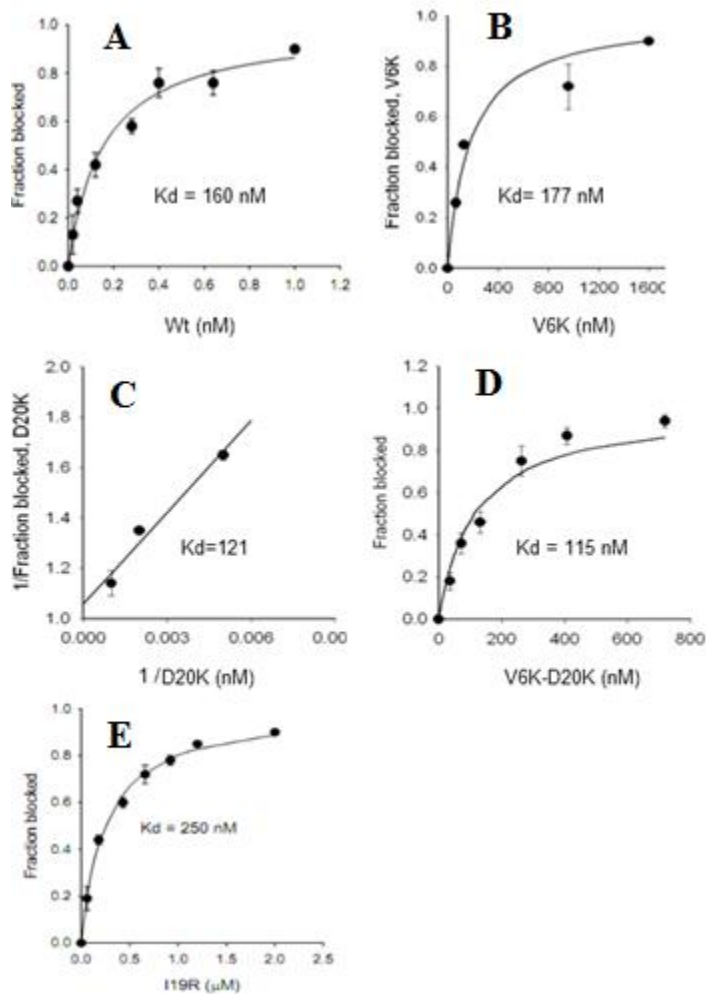


Figura 4. Constantes de disociación. A) Wildtype; B) V6K; C) D20K; D) V6K-D20K; E) I19R

En la Tabla 4 se resumen las constantes de afinidad obtenidas con su respectivo error estándar, en las cuales las variantes D20K y V6KD20K tuvieron la mejor afinidad sobre el canal Shab.

Tabla 4. Constantes de afinidad de Discrepina y variantes con el Shab

Péptido	Kd (nM)
Discrepina	160 ± 0.4
V6K	177±0.07
D20K	121±0.07
DM (V6K-D20K)	115±15.6
I19R	250±nd

nd- no determinada

7.3 Modelado por homología de los canales Shab y Kv4.3, y de variantes de Discrepina.

Los alineamientos de hKv1.2 con Shab y Kv4.3 realizados con ClustalX muestran que no hay inserciones o deleciones en dicha secuencia (**Fig. 5**). Así pues, se puede deducir que la topología general de las estructuras se encuentra altamente conservada. En los alineamientos Shab-Kv1.2 y Kv4.3-Kv1.2 hay una identidad del 58.5 y 55.8%, respectivamente. Las regiones alineadas se muestran en las secuencias siguientes: 1-40 (Segmento 5), 41-74 (poro), 75-111(Segmento 6).

```

Shab-hKv1.2
      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      10          20          30          40          50
Shab      STGLQSLGFT LRNSYKELGL LMLFLAMGVL IFSSLAYFAE KDEKDTKFVS
hKv1.2     SKGLQILGQT LKASMRELGL LIPFLFIGVI LFSSAVYFAE ADERESQFPS
Consenso  *.*** ** * *: * :***** *::** :** : :*** .***** **:::*** *
      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      60          70          80          90          100
Shab      IPEAFWWAGI TMTTVGYGDI CPTTALGKVI GTVCCICGVL VVALPIPIIV
hKv1.2     IPDAFWWAVV SMTTVGYGDM VPTTIGGKIV GSLCAIAGVL TIALPVPVIV
Consenso  **:*****: :*****: *** **: :*:*.*.*** .:*****:***
      ....|.....| .
      110
Shab      NNFAEFYKNQ M
hKv1.2     SNFNIFYHRE T
Consenso  .** **:::

hKv4.3-hKv1.2
      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      10          20          30          40          50
hKv4.3     SQGLRILGYT LKSCASELGF LLFSLTMAII IFATVMFYAE KGSSASKFTS
hKv1.2     SKGLQILGQT LKASMRELGL LIPFLFIGVI LFSSAVYFAE ADERDSQFPS
Consenso  *.**.* ** * :*** *:* * ::* :* ::::*** .. *.* *
      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      60          70          80          90          100
hKv4.3     IPASFYWTIV TMTTLGYGDM VPKTIAGKIF GSICSLSGVL VIALPVPVIV
hKv1.2     IPDAFWWAVV SMTTVGYGDM VPTTIGGKIV GSLCAIAGVL TIALPVPVIV
Consenso  ** **: :* :***** **,** ** ***: * : *** *****
      ....|.....| .
      110
hKv4.3     SNFSRIYHQN Q
hKv1.2     SNFNIFYHRE T
Consenso  ***: :**.. :

Discrepina-V6K-D20K (DM)
      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|...
      10          20          30
Discrepina  ZIDTNVKCSG SSKCVKICID RYNTRGAKCI NGRCTCYP
V6K-D20K   ZIDTNKKCSG SSKCVKICIK RYNTRGAKCI NGRCTCYP
Consenso   ***** ***** ***** ***** *****
  
```

Figura 5. Alineamiento de Shab y Kv4.3 con el Kv1.2 y de la Discrepina con la variante V6KD20K. En el alineamiento de Discrepina-DM se señala con la letra en negrita donde están los cambios. El asterisco (*) indica que se conserva el residuo en esa posición, los dos puntos (:) que hay un residuo con propiedades estructurales o fisicoquímicas similares, el punto (.) que hay residuos ligeramente parecidos y el espacio que son residuos con diferentes.

Una vez hechos los alineamientos y generados los modelos (100 en cada caso), se elige el de menor energía. Para la variante DM se modelaron 9 versiones, una con cada modelo de los

contenidos en la estructura 2AXK. Esto es para tener un mayor muestreo conformacional de la toxina al realizar el “Docking” con los canales. Las estructuras elegidas se sometieron a una minimización energética antes del “Docking”.

7.4 “Docking” de la interacción Shab y la variante V6K-D20K de la Discrepina

7.4.1 Estrategia ZRANK

Se calcularon las energías de interacción de los 10 mejores modelos de ZRANK después de ser minimizados. En la Tabla 5 se muestran las energías antes y después de minimizarse.

Tabla 5. Top 10 de ZRANK



Top 10*	ZRANK	ZRANKm
1.DM2	-107.241	-145.205
2.DM2	-104.797	-146.519
3.DM6	-104.069	-110.893
4.DM2	-103.467	-139.432
5.DM2	-102.914	-166.034
6.DM2	-102.902	-170.194
7.DM4	-102.636	-131.278
8.DM8	-101.12	-158.342
9.DM6	-100.538	-130.387
10.DM4	-100.116	-128.865

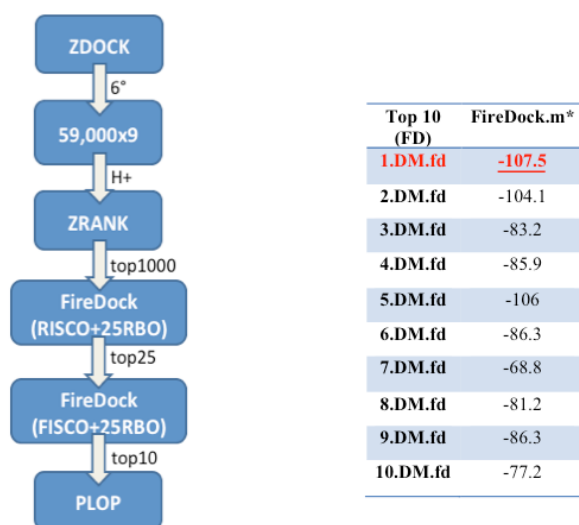
*El número al inicio es el lugar en el ranking de ZRANK y el número al final se refiere a la estructura plantilla que se utilizó.

El complejo que se encontraba en el sexto lugar del ranking pasó a ser el primero después de la minimización con PLOP (en rojo). A este complejo se le llamó **Modelo 1 o (Shab-M1)**.

7.4.2 Estrategia FireDock

Después del refinamiento completo de los 25 mejores provenientes del refinamiento restringido se tomaron los 10 con menor energía. Estos 10 complejos se minimizaron con PLOP y se recalcularon las energías de interacción (Tabla 6), donde el mejor modelo siguió siendo el predicho después del refinamiento completo (letras rojas en Tabla 7). Al modelo 1.DM.fd se le llamó **Modelo 2 (o Shab-M2)**.

Tabla6. Top 10 FireDock

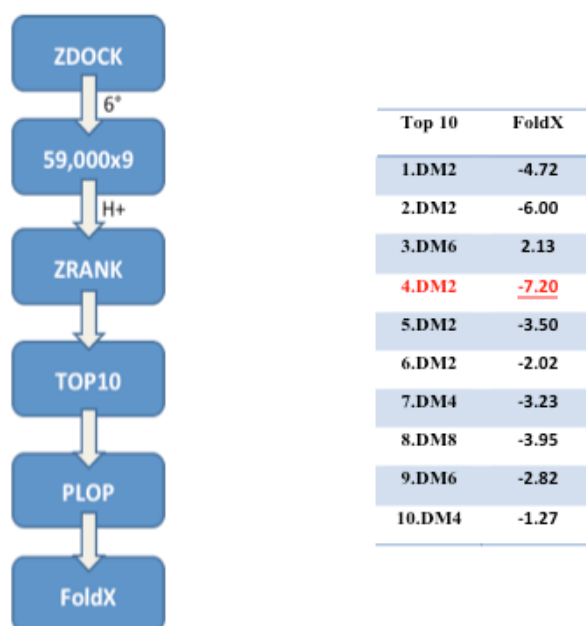


*Energías de interacción después de la minimización energética.

7.4.3 Estrategia FoldX

Se calculó la energía de interacción con FoldX del Top10 minimizado de ZRANK y se obtuvo al modelo 4.DM2 como el complejo con la energía de enlace más favorable (**Tabla 8**). Al modelo 4.DM2 se le llamó **Modelo 3 (o Shab-M3)**.

Tabla 7. Top 10 FoldX



7.4.4 Análisis de los 3 modelos

Desde el top 10 de ZRANK ya se apreciaba una tendencia por el modo de interacción de la hoja beta del péptido bloqueando el poro del canal (**Fig. 6**), donde 8 complejos se encontraban interaccionando de esta manera, con la **K28** en el filtro de selectividad. De los 3 modelos finales seleccionados con las 3 funciones de energía distintas también se conserva la tendencia. El “rmsd” de todos los átomos de los 3 péptidos es menor a 2 Angstroms (**Fig. 6**). Estos tres modelos se utilizaron para los estudios estructurales.

En la Figura 6 también podemos observar que la diada funcional, conformada por K28 y Y37 “K” está en la zona de la interface, y que K6, un residuo reportado como importante en el bloqueo de la corriente en células granulares de cerebelo de rata, se encuentra fuera de la interface.

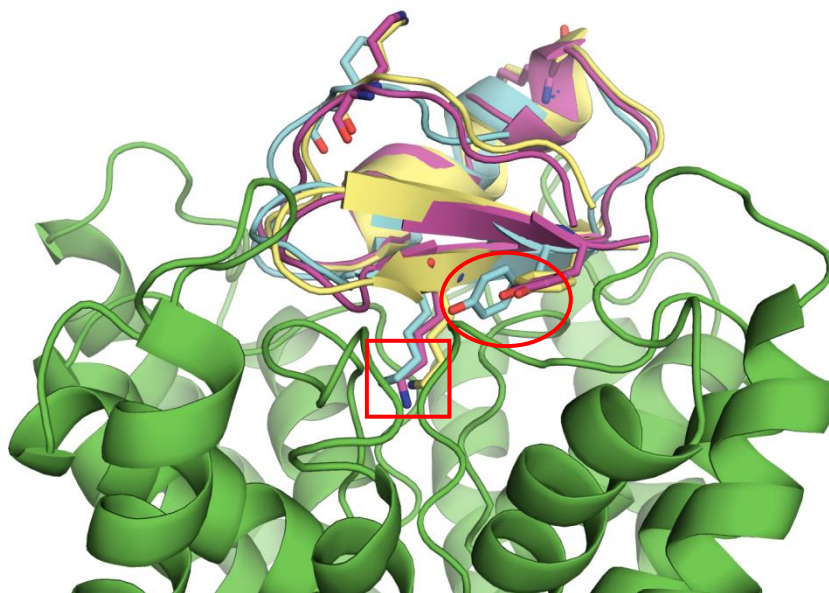


Figura 6. Superposición de los 3 modelos finales. En verde el canal, en color amarillo, cian y magenta la Discrepina V6KD20K de los tres modelos.

7.5 Análisis de residuos en los modelos con Shab

7.5.1 Escaneo de posiciones con FoldX.

Se realizaron mutaciones en cada posición de la secuencia de Discrepina para ver que posiciones eran las más susceptibles a aceptar o no cambios. Se observó que las posiciones que más aceptaban cambios eran la 12 y la 35, permitiendo 30 y 21 cambios, respectivamente.

Un dato a destacar, como se puede apreciar en la Figura 12, es que en los 3 modelos había permisividad para mutaciones en esas 2 posiciones (**Fig. 7**). Otras posiciones que sobresalen por su permisividad son la 3, 5, 6, 21, 24, 25 y la 33.

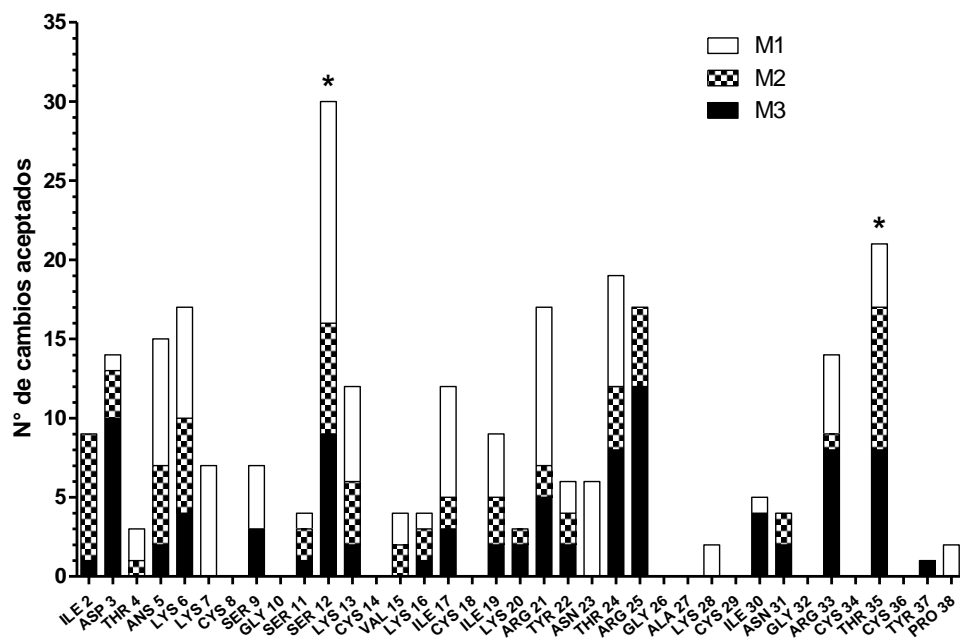


Figura 7. Permisividad de residuos de Discrepina en el modelo Shab. La figura representa el número de veces en que un cambio resultaba energéticamente favorable en cada uno de los modelos de Shab. Se destacan con asterisco las posiciones que aceptaron más cambios.

Al analizarse la energía ganada en dichos cambios, se logra rescatar que, además de Ser 12 y 35 las posiciones con mayor permisividad, también son estos cambios mejores en términos energéticos (**Fig. 8**). Se puede destacar que las posiciones 24 y 25, las cuales también tenían un alto número de permisividad, tienen cambios con ganancias significativas, **por cual lo cual son** posiciones interesantes a analizar.

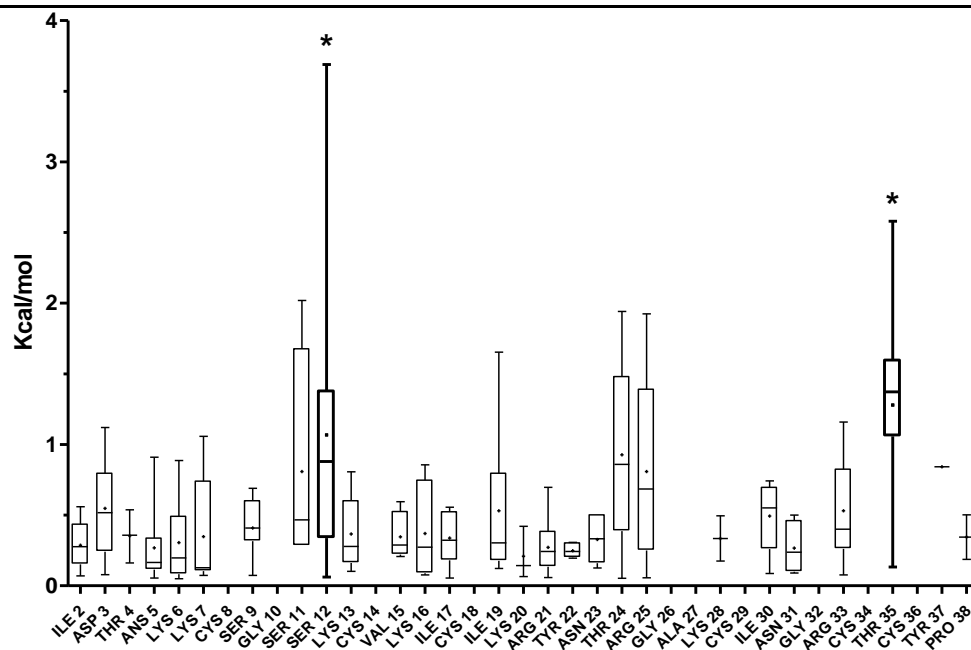


Figura 8. Diagrama de cajas con la distribución de todas las mutaciones que fueron benéficas en cada posición. La caja contiene el 50% de los datos más cercanos a la mediana que, a su vez, se representa por la línea que cruza la caja. Los bigotes son máximos y mínimos, y el punto es la media. Las cajas con asterisco son las que tienen cambios con una mejor ganancia de energía.

Para analizar las mutaciones independientes se realizó un diagrama de dispersión, con los datos de los 3 modelos (**Fig. 9**). En esta figura se muestran los datos con ganancia energética a partir de 1 Kcal/mol. En la posición 12, destacan 4 residuos que se encuentran por encima de las 1.5 Kcal/mol: Leu, Gln, Met y Tyr. En la 35 los que se encuentran por encima de las 1.5 Kcal/mol son: Phe, Lys, Ile, Leu, ‘Y, Val y Met. En ambos casos la mayoría de los cambios son por residuos hidrofóbicos.

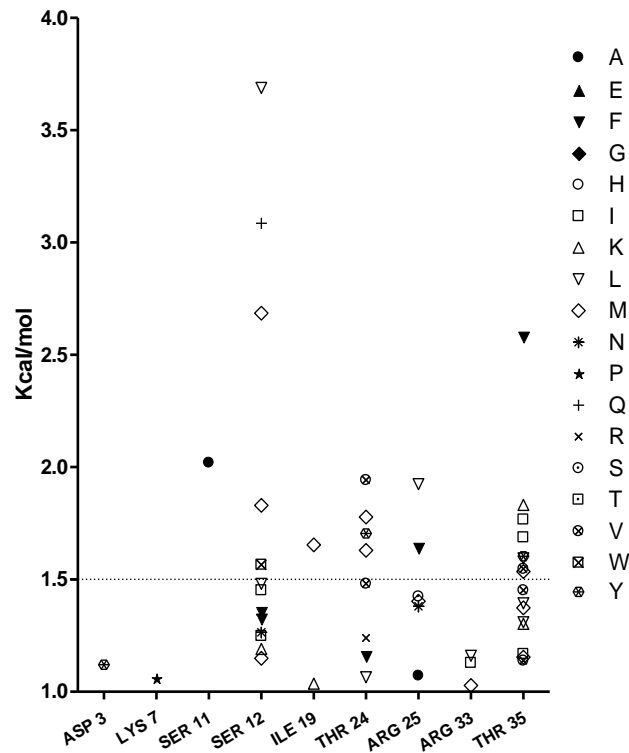


Figura 9. Diagrama de dispersión de mutaciones independientes. Mutaciones independientes de cada modelo.

En otro análisis de los mismos datos, se muestra el promedio de aquellos cambios aceptados en los 3 modelos. Los datos que se presentan en la Figura 15 son aquellos que tienen una ganancia promedio de más de 0.5 Kcal/mol. Se destacan aquellos que sobrepasan 1 Kcal/mol, y entre ellos podemos señalar para la posición 12 la Leu y la Met. Para la posición 35, con menos Kcal/mol promedio con respecto a la posición 12 pero con más residuos por encima de las 1 Kcal/mol se aprecian la Ile, Leu, Val y una Met. Otra vez es importante señalar que los promedios de los mejores cambios pertenecen a residuos hidrofóbicos (Fig. 10).

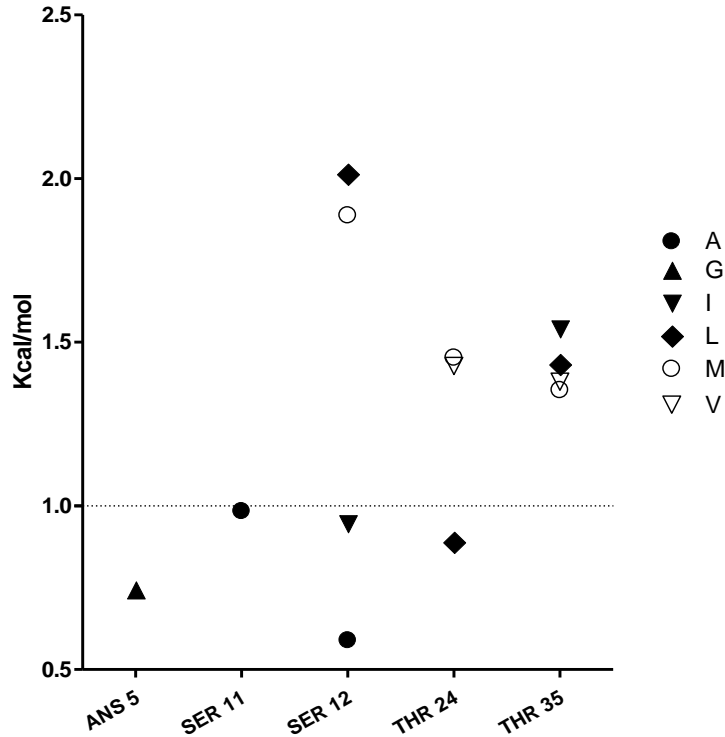


Figura 10. Promedio de cambios aceptados en los 3 modelos. Cada símbolo representa la media de los cambios aceptados en los 3 modelos a partir de 0.5 Kcal/mol.

Con base en estos resultados se eligieron las posiciones 12 y 35 para ser exploradas.

7.6 Mutantes In Silico

Se generaron mutaciones “*in silico*” de las variantes ensayadas en electrofisiología para hacer una comparación entre ambas y los resultados se resumen en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Cambios de las energías libres de estabilización e interacción de las variantes de Discrepina con el canal Shab

Variantes	Experimental		Modelo 1		Modelo 2		Modelo 3*	
	IC ₅₀ (nM)	$\Delta\Delta G$	$\Delta\Delta G_s$	$\Delta\Delta G_B$	$\Delta\Delta G_s$	$\Delta\Delta G_B$	$\Delta\Delta G_s$	$\Delta\Delta G_B$
Discrepina	160	-	-	-	-	-	-	-
V6K	177	0.06	-0.82	-0.25	-0.94	0.2	0.16	-0.04
D20K	121	-0.17	-0.66	-0.38	-1.03	-0.72	-0.22	-0.4
V6K-D20K	115	-0.2	-1.38	-0.76	-1.76	-0.51	-0.27	-0.54
I19R	250	0.26	0.68	0.25	-0.25	-1.24	0.67	0.4

$\Delta\Delta G = RT \ln(IC_{50_{mut}}/IC_{50_{wt}})$; $\Delta\Delta G_s$ = Cambios de la energía libre de estabilización; $\Delta\Delta G_B$ = Cambios de la energía libre de interacción. Datos en Kcal/mol. Los datos se generaron con el campo de fuerza FoldX.

Cada mutación se repitió 5 veces con la finalidad de ver si la energía convergía y obtener una media del cálculo. Se realizaron regresiones lineales de los datos calculados para cada modelo contra los datos experimentales (**Fig. 11**), y se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (r) y r^2 , para determinar cuál modelo ajustaba mejor con los datos experimentales. Los datos muestran que M1 y M3 se ajustan mejor con $\Delta\Delta G_{\text{exp}}$ con un r^2 de 0.87 y 0.99, respectivamente (**Fig. 11**, tabla inferior derecha). Estos resultados indican que existe una correlación adecuada. Sin embargo, en M2 se obtienen resultados que indican que no existe correlación ($r^2 = 0.1$), además de mostrar discrepancias entre la energía de estabilización (E) y de interacción (I), (cómo se calculan). Analizando la Tabla 8 se puede constatar que el cambio que está generando el ruido es I19R, por lo que un análisis más detallado del residuo resulta esencial.

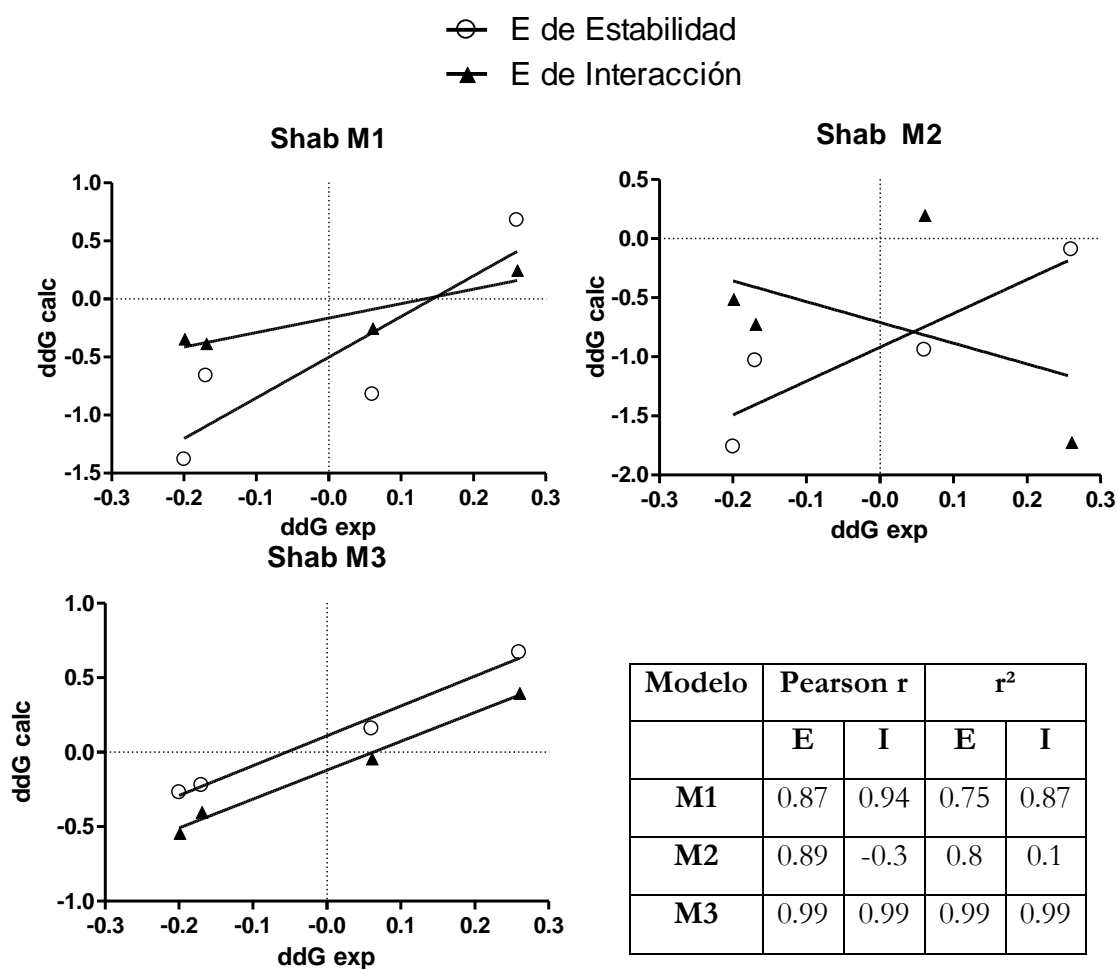


Figura 11. Regresiones lineales de los $\Delta\Delta G$ experimentales en función del $\Delta\Delta G$ calculado con FoldX en los 3 Modelos. Tabla con el coeficiente r y r^2 . E = Estabilidad; I = Interacción.

7.7 Análisis estructural de las mutaciones

Para el análisis estructural se utilizó M1ⁱ, el cual tenía un buen coeficiente de correlación en ambas energías, pero principalmente en la de interacción ($r = 0.94$; $r^2 = 0.87$). En la Fig. 12 se muestran los 3 residuos en cuestión. Discrepina se muestra en rosado, mientras que los cambios de DM (V6K-D20K) se muestran en naranja. Mediante esta figura se puede explicar el motivo de la diferencia de afinidad. Se puede observar como la posición 6 se encuentra fuera de la interface, por lo que la sustitución no resulta relevante en el cambio de afinidad. La posición 20K, en cambio, logra formar un puente salino con un “D” de la torreta del canal. Por qué no se observa un cambio drástico en la afinidad cuando se cambian residuos con cargas distintas, puede explicarse por los residuos básicos que también circundan la torreta del canal. Al encontrarse el D20 en la toxina, bien puede existir atracción electrostática con la “K” que se muestra en la figura. Al mutarse D20K, esa lisina cambia de posición por la repulsión electrostática.

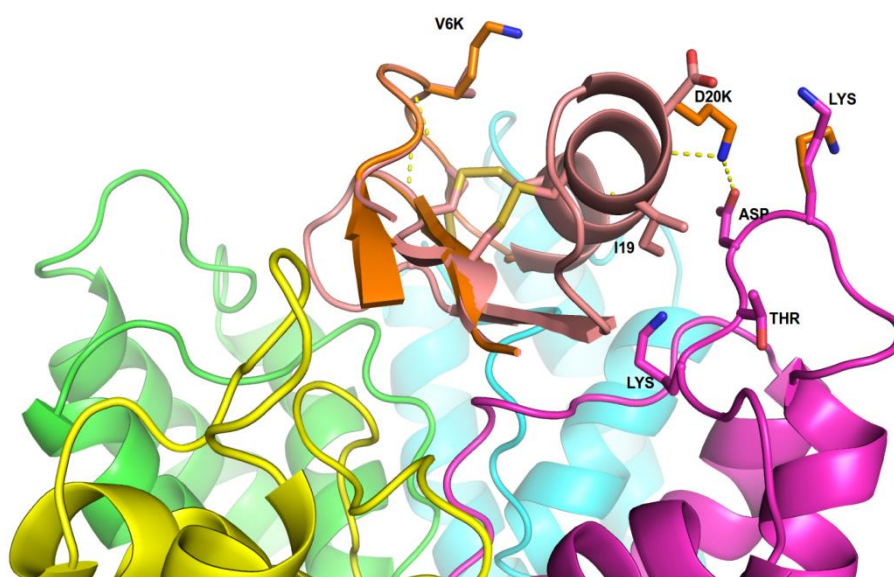


Figura 12. Interacción de los residuos V6K, I19R y D20K. Los residuos V6K, I19R y D20K se muestran como bastones. Los residuos del canal que están a 4 Å de distancia de los residuos de la toxina mencionados también se muestran en bastones, pero con el código de 3 letras. Discrepina está representada de color rosado y la variante DM se muestra en naranja. Los colores magenta, amarillo, verde y cian pertenecen al canal y cada uno representa una subunidad.

En un análisis con APBS se puede observar cómo cambia la superficie electrostática en el canal al unirse la toxina, específicamente en la zona en que se encuentra D20K (**Fig. 13**, flecha azul). Las cargas negativas del canal en esa posición son desplazadas cuando se tiene el cambio K20 (lado derecho, flecha azul). Con flecha roja vemos la superficie electrostática en la posición 6

ⁱ Se utilizó M1 porque que aún no se tenían los resultados con M3

donde se aprecia la influencia del cambio V6K coloreándose de azul la parte superior de la toxina e influyendo en la distribución de cargas en las dos torretas de la parte superior de la imagen. Haciendo un cálculo de energía libre electrostática también se puede observar cuantitativamente la mejoría en la interacción (ver más adelante **Tabla 13**).

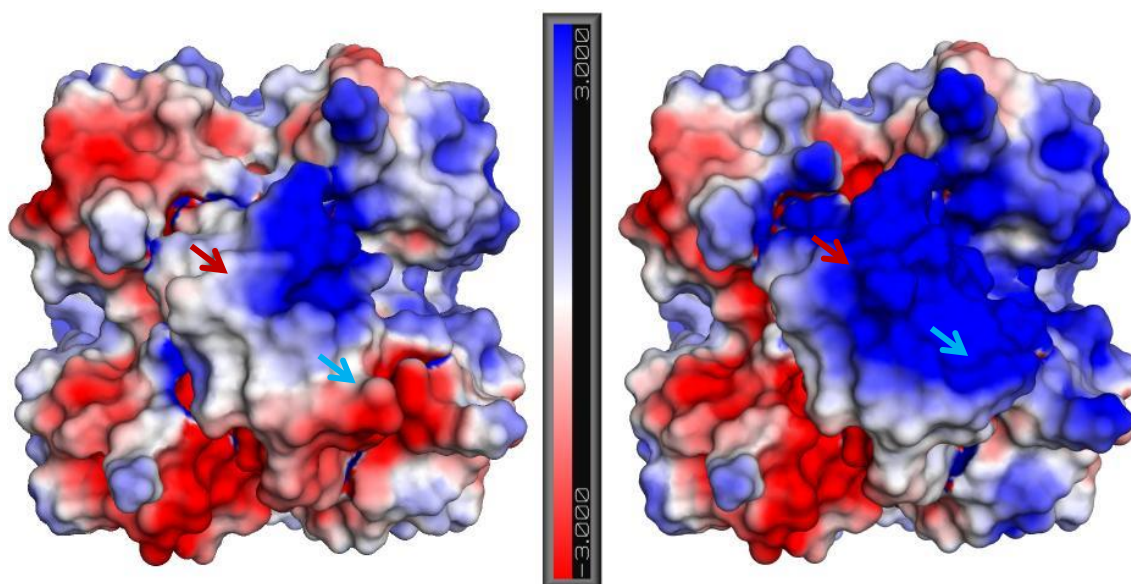


Figura 13. Vista superior de superficie electrostática de Shab en interacción con Discipina (izq) y DM (der). La escala va de negativo (rojo) a positivo (azúl), siendo las regiones blancas las menos cargadas. La flecha roja indica la posición 6 en la toxina y la azul la posición 20.

Respecto a I19, se puede observar que se encuentra en una zona con ciertas restricciones espaciales, por lo que el cambio por un residuo grande como Arginina desestabiliza la estructura. Esto se puede sustentar si se compara la energía de interacción de I19 respecto a R19. En la tabla 8 de las mutantes puede observar que I19R pierde 0.68 Kcal/mol en la estabilidad del complejo y 0.25 Kcal/mol en la energía de interacción. Si analizamos con más detalle que está sucediendo, encontramos que el costo energético, según FoldX, está vinculado al aumento de entropía en la cadena lateral cuando se sustituye la Ile por la Arg. El $\Delta\Delta G$ de entropía en la cadena lateral del cambio I19R es de 1.03 ± 0.09 Kcal/mol en M1.

La coherencia de los datos computacionales respecto a los experimentales y el análisis estructural sugieren que el modelo 1 obtenido con ZDOCK es adecuado para predecir la afinidad de este modelo de estudio, por lo tanto, se puede suponer que a partir de él se puede proponer, con relativa confianza, las modificaciones que busquen mejorar la afinidad del péptido por el canal.

7.8 Simulación con PELE y Barrido de Alaninas

Se realizaron 500 pasos de simulación en los modelos M1 y M3 con muestreo de cadenas laterales y perturbando la toxina 0.1 angstroms de translación, 0.01 de rotación. De esta simulación se obtuvieron 33 estructuras para M1 y 29 para M3 (**Fig. 14**). De las estructuras obtenidas se utilizaron para el barrido de alaninas las últimas diez y la inicial.

El barrido de alaninas se muestra en gráfico de barras el promedio de energía por posición de los residuos interactuando con el canal (**Fig. 15**). En esta gráfica se puede constatar que las posiciones K28 y Y37 están entre las posiciones más afectadas en la energía de interacción al hacer el cambio por alanina, sobrepasando las 1.5 Kcal/mol. Esto concuerda con los antecedentes que se tienen acerca de la importancia de estos dos residuos en la interacción de las toxinas con los canales iónicos de potasio, residuos denominados como la “diada funcional”.

También destaca con más de 1.5 Kcal/mol la posición R25 y para el caso específico de M1 el residuo R33.

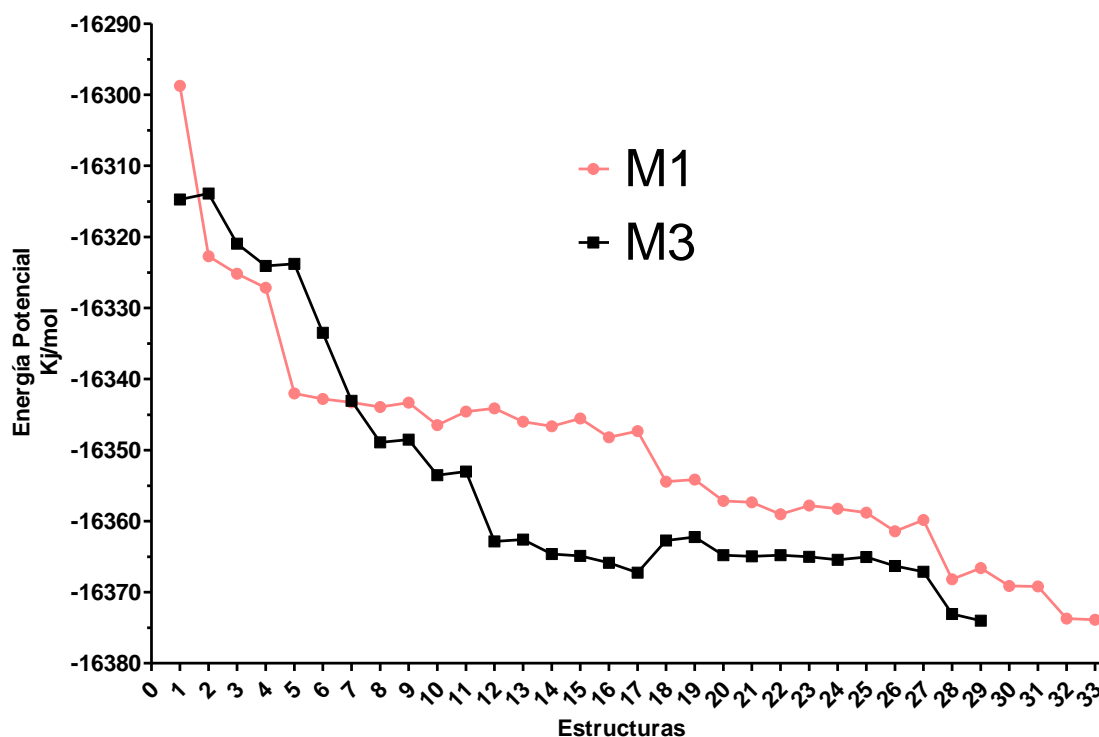


Figura 14. Simulación con PELE de M1 y M3. Cada punto representa una estructura.

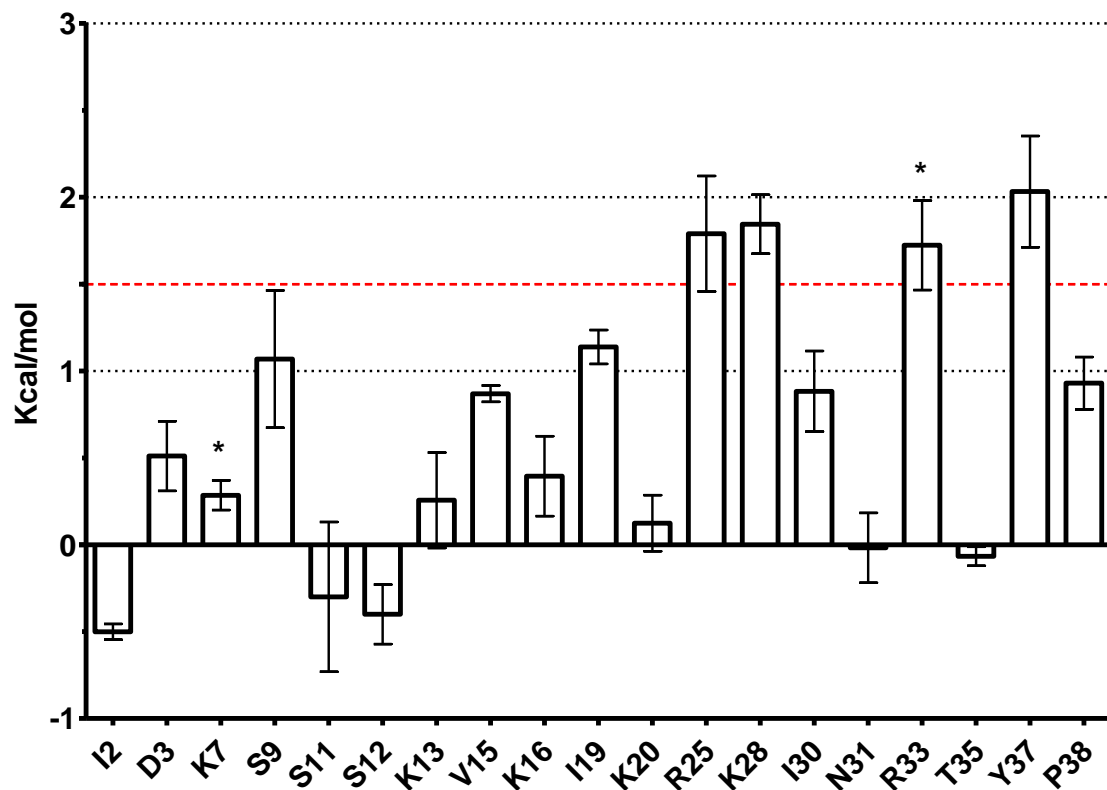


Figura 15. $\Delta\Delta G$ de interacción en barrido de alaninas de M1 con M3. Los asteriscos representan residuos encontrados solo en la interface de M1. La barra de error representa un IC del 95%. Se utilizaron 11 estructuras de cada modelo.

7.9 Diseño de variantes

Se partió de M1 y de los resultados del “escaneo” de posiciones de los 3 modelos. En dicho “escaneo” se encuentran las posiciones 12 y 35 como las más idóneas para ser exploradas y en el barrido de alaninas sugiere que los residuos de esas posiciones no son relevantes en la interacción. La Ser12, según dicho escaneo, se beneficia, principalmente, de los cambios Leu y Met en los 3 modelos. Se eligió Leu, dado que Met tiene mayor proclividad a oxidarse en el átomo de azufre, oxidación que ha sido observada en otras toxinas en nuestro laboratorio y que podría traer problemas posteriores.

En cuanto a la posición 35, se tiene a la Ile y la Leu, como los cambios más favorables. Se realizaron repeticiones de mutaciones puntuales con cada uno de esos residuos con el comando “BuildModel” en FoldX para ver cuál era más adecuado. Como se puede apreciar en la gráfica, no habían diferencias significativas entre ambos residuos con los cálculos de

FoldX (**Fig. 16**), por lo que se recurrió al servidor PISA ⁵⁰ para elegir el residuo según el área de interface y el ΔG de hidrofobicidad, siendo Leu el de mejor energía (**Tabla 9**). Una observación pertinente aquí es que los datos de estabilidad e interacción son distintos, mientras que en las mutaciones de la **Tabla 8** siempre correlacionaron en los modelos M1 y M3.

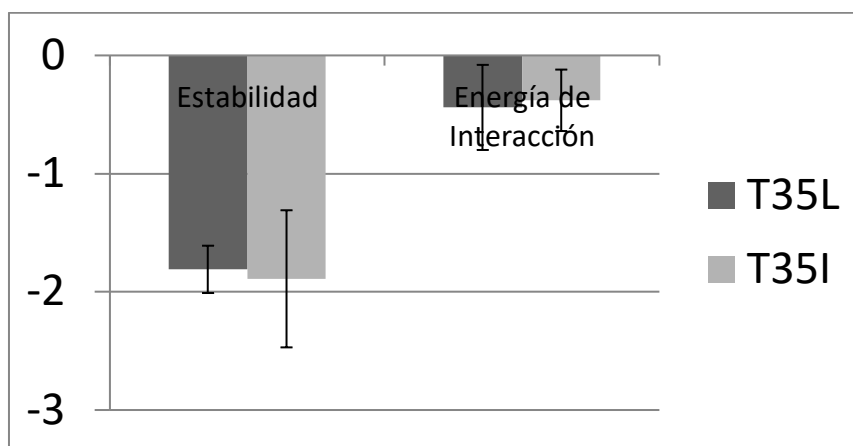


Figura 16. Mutaciones T35L y T35I en M1.

Tabla 9. Resultados de PISA para T35L y T35I

Mutante	Área de Interface (Å ²)	ΔG (Kcal/mol)
T35L	<u>1171.8</u>	<u>-6.3</u>
T35I	1165.5	-4.8

Una vez que ya se tenían estas dos propuestas, se propuso anexar D20K ya que se sabía que era un residuo que mejoraba un poco la afinidad, y se intuye que con los otros 2 cambios podríamos obtener una variante con mejor afinidad. A esta variante se le llamo TMD (S12L-D20K-T35L).

Otro cambio por el que se optó fue R25A. Los motivos de la elección son varios. El motivo principal es que está al mismo nivel de importancia que los residuos **de la diada funcional** en la gráfica del barrido de alaninas que se hizo con múltiples estructuras (**Fig. 15**). Otro dato interesante es que es un residuo que en la gráfica de permisividad tiene un comportamiento distinto entre los modelos, por lo cual podría ser útil para descartar entre ellos. Y por último porque es un residuo que parece importante en el modelo Kv4.3-DM generado por ClusPro (ver Resultados 7.12), debido a que se encuentra inmiscuido en el filtro de selectividad, mientras que en los modelos de Rosetta se encuentra en otra zona de la interface menos

comprometida. Entonces, este cambio nos podría ayudar a deducir distintas cosas tanto en Shab-Discrepina como en Kv4.3-Discrepina.

Generando la triple mutante S12L-D20K-T35L (TMD) y R25A, *in silico*, en los modelos M1 y M3, se puede observar que la energía de interacción mejora para el caso de TMD y empeoran para R25A, mientras que en la energía de estabilidad el comportamiento es ligeramente distinto entre los modelos (**Fig. 17**).

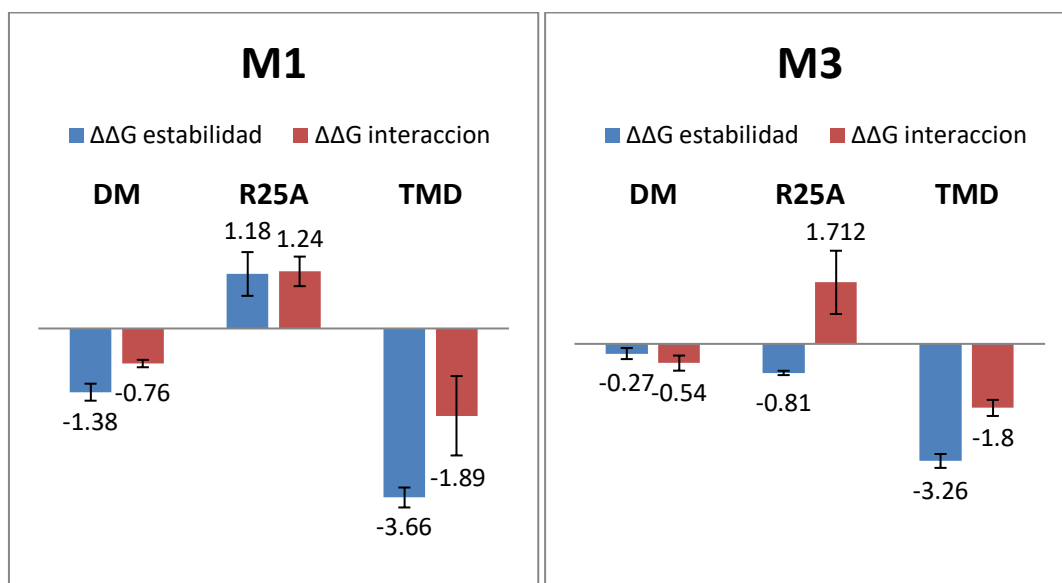


Figura 17. Mutaciones en FoldX de nuevas variantes. Datos en Kcal/mol (n = 5).

7.10 Purificación y plegamiento de nuevas variantes

Se obtuvieron las masas moleculares correspondientes a la formación de tres enlaces disulfuro después de la oxidación, perdiéndose 6 unidades de masa, pertenecientes a los 6 protones de los grupos sulfidrilo (-SH) de las 6 cisteínas. Las variantes de Discrepina plegadas/oxidadas eluyen a una concentración de 23.1% (R25A) y de 28% (TMD) en acetonitrilo. Las masas moleculares de los péptidos plegados son de 4,091.9 Da y 4,228.06 Da, para R25A y TMD, respectivamente (**Fig. 18**). Además, se confirmó que su estructura secundaria es similar a la estructura secundaria de Discrepina nativa y la variante V6KD20K (DM) mediante dicroísmo circular (**Fig. 19**).

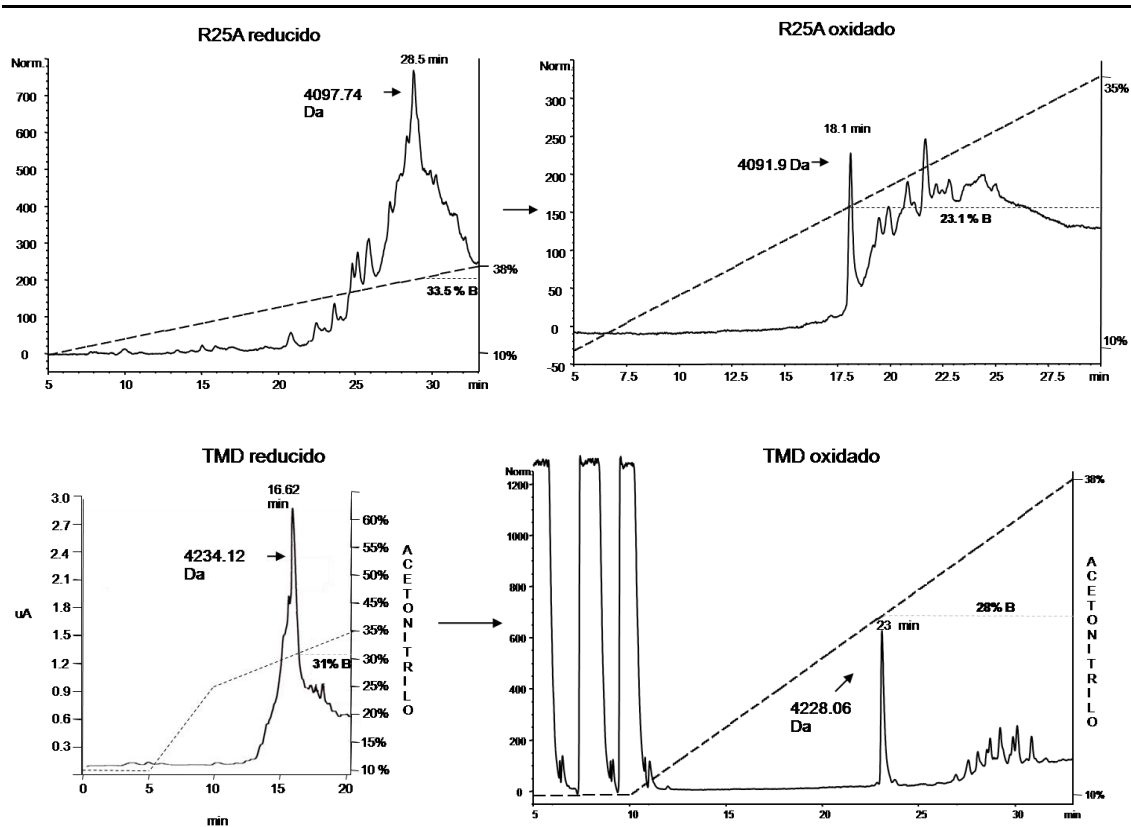


Figura 18. Cromatogramas de purificación y plegamiento de las variantes de Discrepina R25A y TMD.

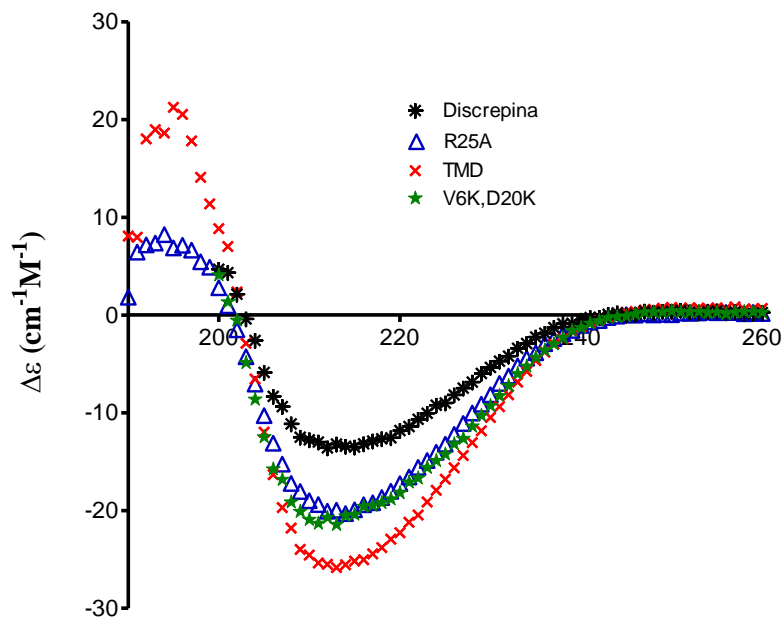


Figura 19. Dicroísmo Circular de Discrepina y variantes. Todas mantienen un mínimo a 210-212 de estructura secundaria antiparalela al igual que Discrepina (nativa). La concentración de cada péptido fue de 100, 75, 75 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para TMD, R25A, DM y Discrepina nativa, respectivamente.

7.11 Actividad de Discrepina y variantes en el Kv4.3

El canal Kv4.3 es un canal generador de corriente tipo-A. A la fecha no se tienen reportes de otras toxinas de alacrán que bloqueen este canal, los únicos reportes pertenecen a toxinas de araña, las cuales actúan principalmente como moduladoras, por lo que se hipotetiza que interacciona con el dominio sensor y no con el dominio del poro ⁴⁹.

Los experimentos realizados para Discrepina en el canal Kv4.3 resultaron en una K_d de 270 nM, esto es una afinidad menor que la calculada para Shab. También se ensayó la variante DM, la cual mostró una afinidad de 144 nM (**Fig. 20**). Ambas afinidades son menores que las reportadas para células granulares de cerebelo (**Tabla 2**).

Estos resultados indican que este canal, probablemente, no es el que está siendo bloqueado en las células granulares de cerebelo y, por ende, tampoco es el responsable de la corriente tipo-A que se observa bloqueada por la toxina en dichos experimentos.

También se ensayaron las variantes propuestas para Shab (TMD y R25A), las cuales se discuten más adelante.

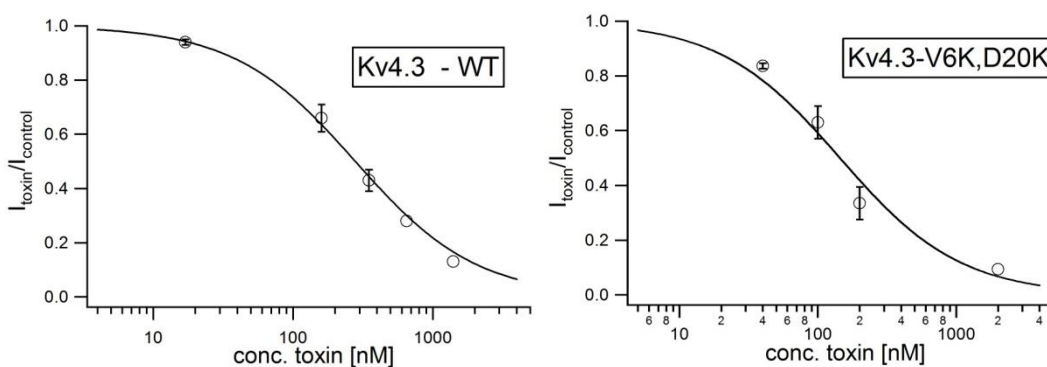


Figura 20. Curva de IC₅₀ para Kv4.3 con Discrepina y DM. Afinidades de 270 nM y 144 nM respectivamente.

7.12 “Docking” de la interacción Kv4.3 y la variante V6KD20K

7.12.1 Estrategia ZDOCK-ZRANK

Se siguió la misma metodología que fue utilizada para generar el modelo Shab-DM. Se analizó el top 100 de ZRANK de todas las corridas y solo se encontró una toxina bloqueando el poro en el complejo 37, donde la R25 se introduce al filtro de selectividad (**Fig. 21, arriba**). Los restantes 99 modelos se encuentran fuera del poro como se puede apreciar en la misma Fig. 21 (**abajo, izquierda y derecha**).

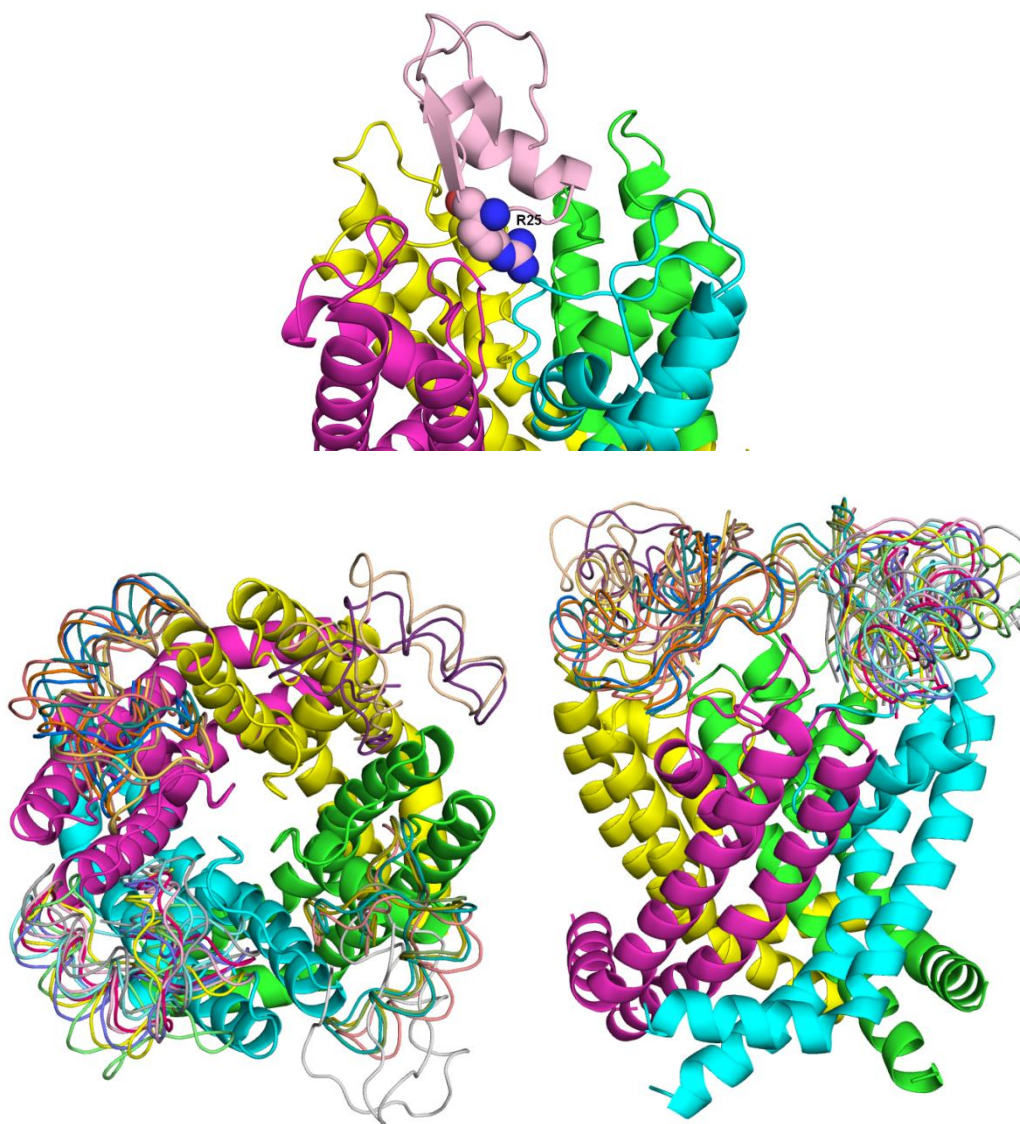


Figura 21. Modelo ZDOCK-ZRANK. Arriba, complejo 37 con la R25 hacia el filtro de selectividad; abajo-izq., vista superior de los mejores 30 complejos; Abajo-der., vista lateral de los mejores 30 complejos. El canal

se representa en caricatura y cada color representa una subunidad. La toxina se representa en listones, cada una con un color distinto.

7.12.2 Estrategia CLUSPRO 2.0

ClusPro arroja 4 corridas donde se eligen los mejores complejos según cuatro funciones de energía distintas: Balanceada, Electrostática, Hidrofóbica, VDW-Electrostática. De estas cuatro, la única que encontró modelos donde la toxina bloqueara el poro fue VdW-Electrostática. Esta corrida arrojó 6 estructuras, las cuales tenían a R25 introducida en el filtro de selectividad del canal (**Fig. 22**). A la de mejor energía se le realizó una simulación con PELE.

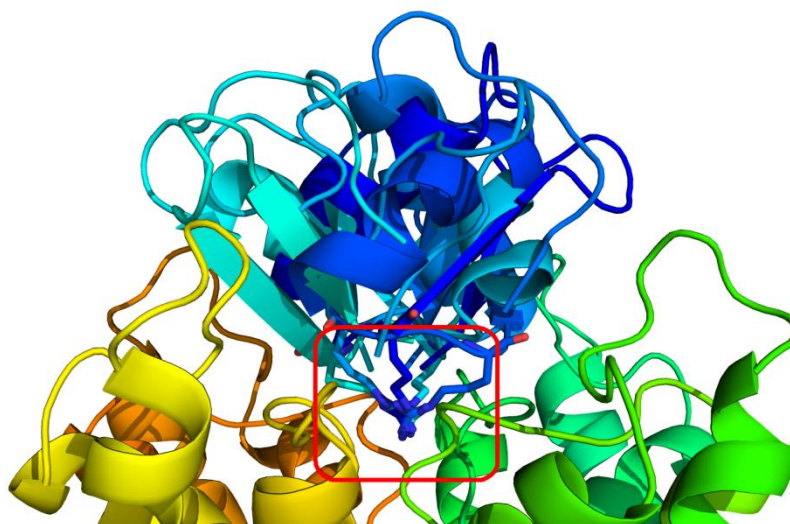


Figura 22. Conformación más representativa encontrada en ClusPro2.0. La R25 se encuentra apuntando al filtro de selectividad (cuadro rojo). Los colores amarillo y verde representan el canal Kv4.3 y los azules son las toxinas.

7.11.3 Estrategia RosettaDock

De 5 corridas sometidas al servidor 4 fueron fallidas. La corrida exitosa arrojó las 10 estructuras con mejor energía. Se calculó la energía de enlace con FoldX y se eligieron los 2 modelos de menor energía (**Tabla 10**, en rojo). Se encontró que las estructuras de la toxina en estos dos modelos no presentaban enlaces disulfuro lo que podría conllevar a cambios conformacionales espurios o irreales, por lo que se llevó a cabo un arreglo de la estructura. El arreglo consistió en sobreponer la estructura de la toxina que se utilizó como archivo de

entrada sobre la del resultado y realizar simulaciones con PELE hasta tener estructuras de baja energía manteniendo los 3 enlaces disulfuro.

Tabla 10. Energías de interacción de los modelos de RosettaDock con FoldX

Modelo	Energía
Kv4.3-Dis2_dm_01.pdb	6.15
Kv4.3-Dis2_dm_02.pdb	0.05
Kv4.3-Dis2_dm_03.pdb	1.70
Kv4.3-Dis2_dm_04.pdb	2.22
Kv4.3-Dis2_dm_05.pdb	3.80
Kv4.3-Dis2_dm_06.pdb	2.26
Kv4.3-Dis2_dm_07.pdb	1.35
Kv4.3-Dis2_dm_08.pdb	2.29
Kv4.3-Dis2_dm_09.pdb	2.98
Kv4.3-Dis2_dm_10.pdb	2.74

Los dos modelos mostraron el modo “clásico” de interacción, con la K38 dentro del filtro de selectividad (**Fig. 23**).

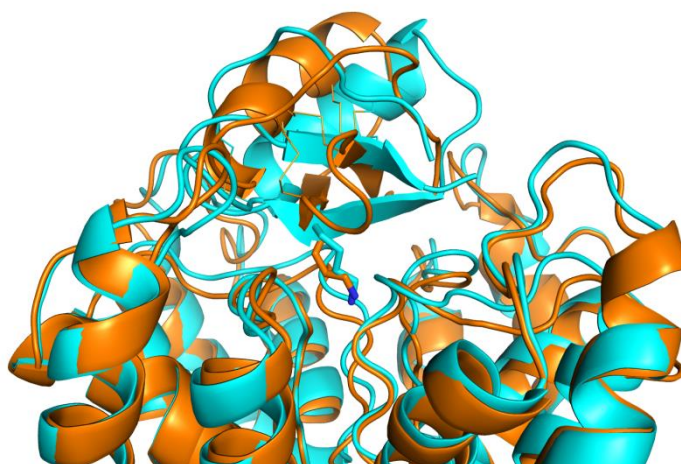


Figura 23. Superposición de los modelos Rosetta02 (M2) en cian y Rosetta07 (M1) en naranja.

7.11.4 Elección del modelo Kv4.3-DM

Dada la mala energía de interacción que se obtenían en los resultados de Docking (**Tabla 10**) se procedió a realizar simulaciones con la finalidad de mejorarla. Se realizaron simulaciones en PELE (**Fig. 24**) para los complejos obtenidos del “Docking” de aquellas estructuras con mejor energía de interacción obteniéndose los resultados resumidos en la **Tabla 11**. Aquí se puede observar que los modelos obtenidos con RosettaDock tienen una mejor energía de interacción, principalmente el M2 con -8.61 Kcal/mol (en rojo).

Tabla 11. Energías de interacción de tres modelos de “Docking” (Kv4.3-DM).

Modelo	Energía de interacción (Kcal/mol)
ClusPro	-3.02
Rosetta 02	-8.61
Rosetta 07	-3.71

En la simulación con PELE de los 3 complejos Kv4.3-DM se observa la tendencia, propia del funcionamiento del algoritmo de encontrar estructuras con energías cada vez más bajas. (Fig. 24). Se puede observar que el M2 es el que más estructuras encontró en los 500 pasos de simulación y también que son los de menor energía. Esto a su vez coincide con el hecho de que la estructura con mejor energía de interacción se encontró en la corrida de este modelo (Tabla 11).

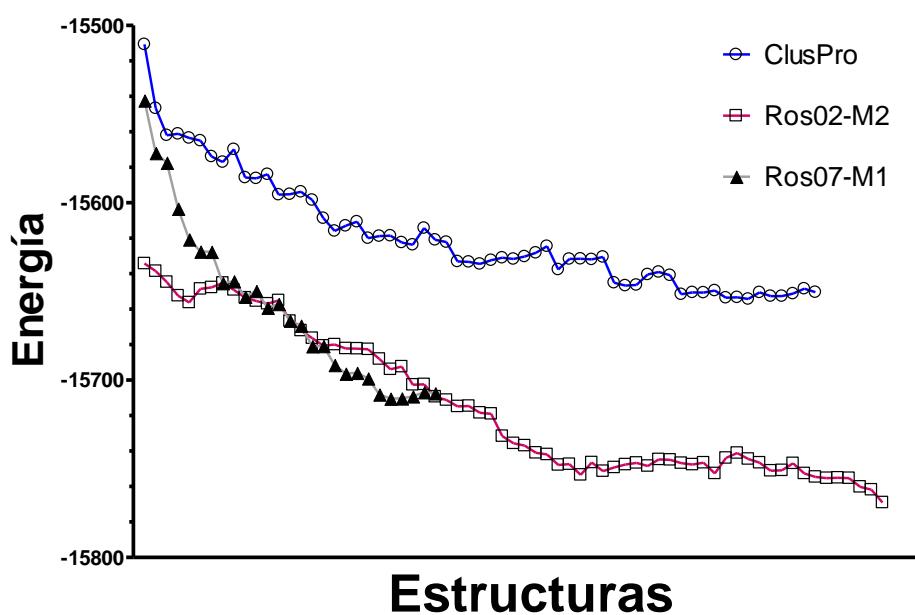


Figura 24. Simulación con PELE (Kv4.3-DM). Cada punto representa una estructura.

7.12 Escaneo de posiciones en los modelos Kv4.3

Un primer detalle que llama la atención es que son residuos con carga positiva los que permiten más cambios en ambos modelos, y especialmente los que destacan en ambos modelos son las posiciones K6, K13, K16, R21, R33 y el residuo polar T35 (Fig. 25).

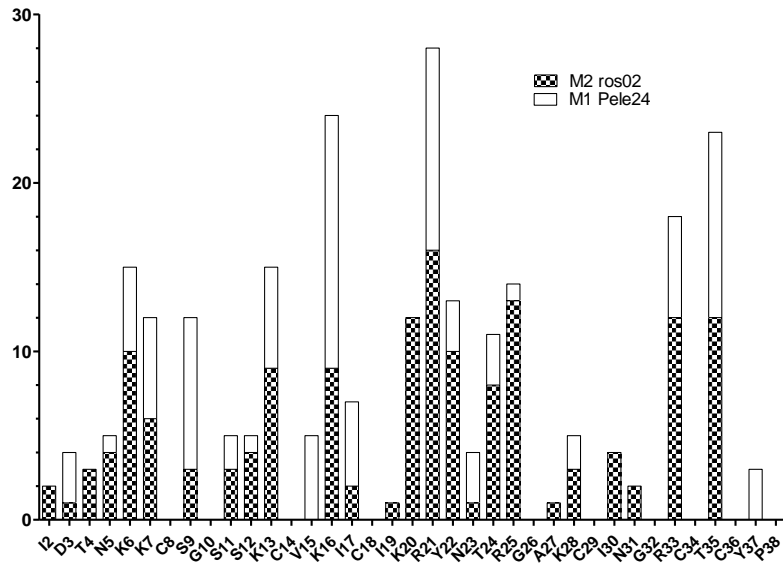


Figura 25. Permisividad de los modelos de Kv4.3 con DM.

Esto tiene que ver, sin duda, con que el Kv4.3 es un canal menos cargado negativamente que el Shab por lo cual los residuos básicos de la toxina no tienen la misma relevancia que para Shab en la interacción (Fig.26).

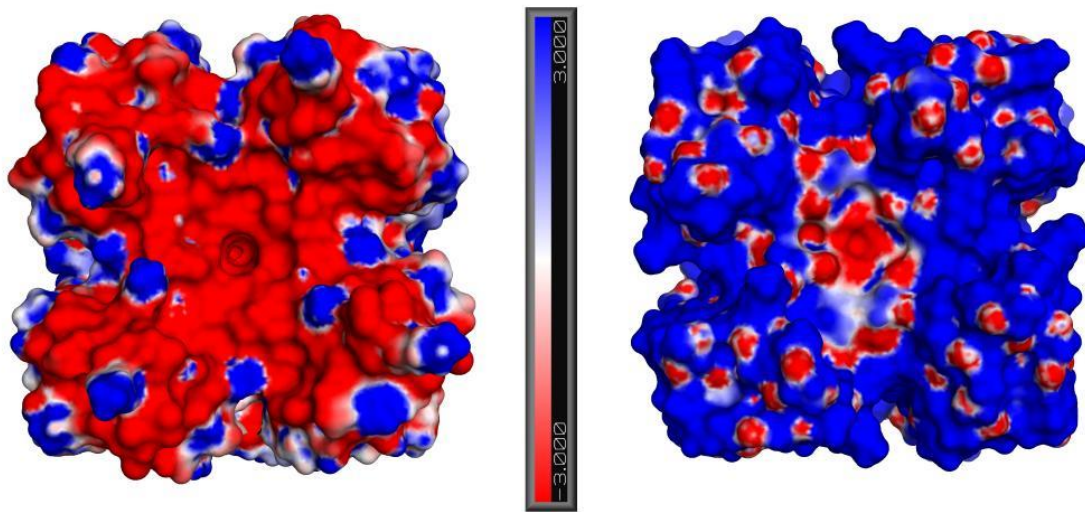


Figura 26. Vista superior de superficie electrostática de Shab (izq) y Kv4.3 (der).

El residuo R25, al igual que en Shab, tiene un comportamiento dispar en los dos modelos de Rosetta, por lo tanto, también es una mutante que, probablemente, nos puede ayudar a descartar entre uno u otro modelo del Rosseta y del de Cluspro.

A diferencia de los resultados en el escaneo de posiciones en Shab, aquí se puede apreciar que la posición 35 está entre los primeros 3 lugares de permisividad, mientras la 12 no destaca, lo cual indica que éste último podría ser un residuo más comprometido en la interacción.

7.13 Simulación con PELE y barrido de alaninas de Kv4.3-DM (M2)

Se realizó otra simulación sobre la estructura 66 de la primera corrida de PELE dado que esta estructura era la de mejor energía de interacción (**Fig. 27**), y el barrido de alaninas se realizó a partir de las estructuras de ésta segunda simulación con PELE (**Fig. 28**). En él también se puede observar la importancia de la díada funcional (K28 y Y37) en la interacción, y del P38, todos por encima de las 1.5 Kcal/mol. Además, se observa a R25 también cercano a las 1.5 Kcal/mol, lo que resulta especialmente importante porque es un residuo que se propuso cambiar por alanina.

El barrido de alaninas también coincide con el barrido de posiciones (“PositionScan”) o gráfica de permisividad cuando se analizan los residuos básicos, en los cuales se puede apreciar que no hay pérdida energética. Esta observación es coherente con el modelo de superficie electrostática, pues nos indica que los residuos básicos no son tan importantes como en Shab debido a la menor carga negativa que posee Kv4.3 (**Fig. 26**).

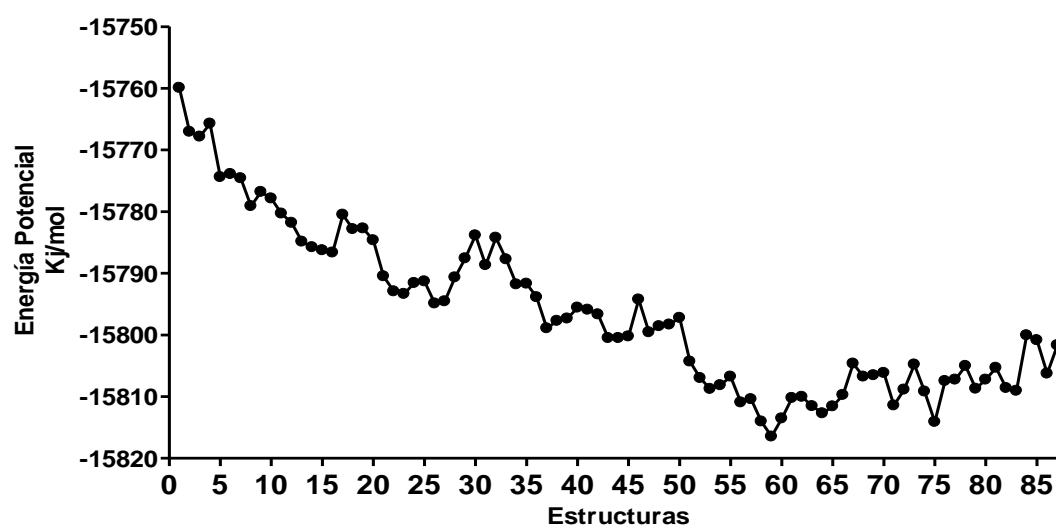


Figura 27. Simulación con PELE de la estructura 66 (Kv4.3-DM) de la primera corrida (M2).

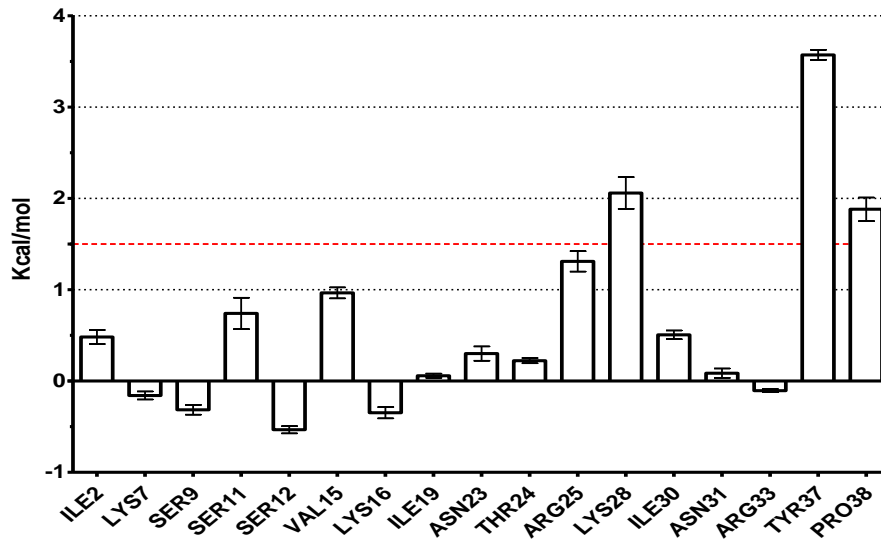


Figura 28. Barrido de alaninas de estructuras de la 2da corrida de Kv4.3-DM (Fig. 27). Barras de error representan un IC del 95%.

7.13 Resultados de nuevas variantes en el canal Shab y Kv4.3

7.13.1 En Shab

Al probar las nuevas variantes en el canal Shab, se observó, al igual que con las otras variantes, una recuperación de la corriente, confirmando la reversibilidad de la interacción en este canal (Fig. 29). El cambio R25A se comportó como FoldX lo predijo en los modelos 1 y 3, disminuyendo la energía de interacción, mientras que con TMD ocurrió lo contrario, ya que se esperaba una mejoría y en cambio se obtuvo una K_d de 2 μM (Fig.29C).

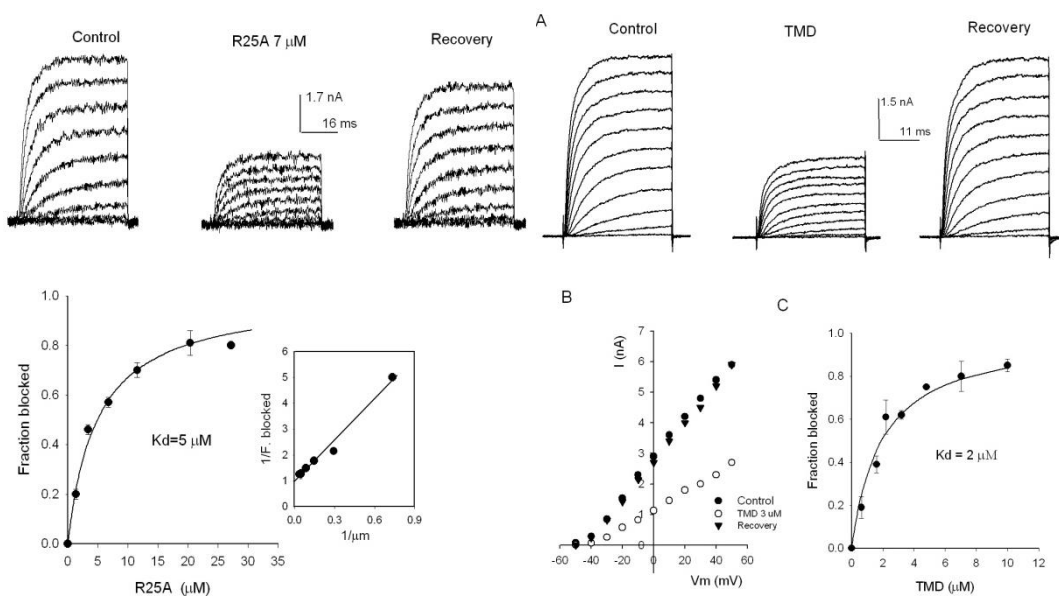


Figura 29. Ensayos electrofisiológicos de las nuevas variantes TMD y R25A

A diferencia de las primeras variantes comparadas, donde hubo una buena correlación, en estas nuevas variantes había una clara discrepancia de datos por lo que había que hacer uso de otras herramientas con la finalidad de explicar el fenómeno. Por ello, más adelante, se realizaron análisis con el servidor PISA y el programa APBS, el primero para analizar las áreas de interface y la energía libre de hidrofobicidad de la interacción y el segundo para calcular la energía libre electrostática.

7.13.2 En Kv4.3

El resultado de los ensayos de electrofisiología de las variantes TMD y R25A es de una mejoría en la afinidad (**Fig.30**).

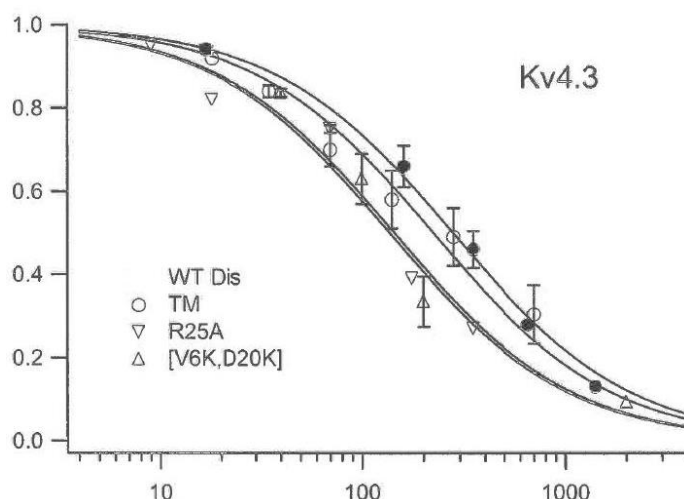


Figura 30. Dosis-respuesta de nuevas mutantes de Discrepina. Discrepina ($IC_{50}=270 \text{ nM} \pm 17$), TM o TMD ($IC_{50}=224 \text{ nM} \pm 24$), R25A ($IC_{50}=135 \text{ nM} \pm 20$), DM ($IC_{50}=144 \text{ nM} \pm 24$)

Al generar las mutantes *in silico* del modelo M1 y M2 no se observa una correlación con los datos experimentales para todos los casos (**Tabla 12**). En el modelo M1, solamente en DM se ve un comportamiento semejante al experimental y en el modelo M2 en las variantes TMD y, en menor medida, DM, ya que el $\Delta\Delta G$ de interacción queda en cero. En este complejo (Kv4.3-Discrepina) también tenemos el problema de no contar con variantes que tengan un cambio significativo en la afinidad, por lo que cualquier conclusión se debe manejar con precaución.

Un análisis con PISA y APBS se realizó y se muestra más adelante para intentar comprender mejor el fenómeno y aportar más datos que den más sustento a la discusión.

Tabla 12. Energías experimentales e *in silico* de mutantes en Kv4.3

Variantes	Experimental	Modelo 1		Modelo 2		
	IC ₅₀ (nM)	$\Delta\Delta G^*$	$\Delta\Delta G_S$	$\Delta\Delta G_B$	$\Delta\Delta G_S$	$\Delta\Delta G_B$
Discrepina	270	-	-	-	-	-
DM	144	-0.37	-0.63	-0.7	-0.6	0.03
R25A	135	-0.41	1.18	1.9	1.35	1.34
TMD	224	-0.11	5.25	6.2	-2.62	-1.1

* $\Delta\Delta G = RT \ln(IC_{50_{mut}}/IC_{50_{wt}})$; $\Delta\Delta G_S =$ Estabilidad; $\Delta\Delta G_B =$ Energía de interacción.

Datos en Kcal/mol. Los datos se generaron con el campo de fuerza FoldX.

7.14 Discusión y análisis del comportamiento de las nuevas variantes en el canal Shab.

Con la finalidad de averiguar el motivo de las inconsistencias se analizaron las posiciones de manera independiente con el comando BuildModel de FoldX. En la **Figura 31** están las energías de estabilización e interacción para los modelos M1 y M3. En ella podemos observar como en todos los casos la energía de estabilización es favorecedora para las 2 posiciones, pero la de interacción solamente favorece a S12L. Uno de los motivos por lo que esto sucede es porque Leu en la posición 35 no hace buenos contactos, incluso, deja más área accesible al disolvente que la Thr. El servidor PISA nos arroja que el área enterrada de la superficie del residuo pasa de 70% a 40% con Leu, en cambio, la posición 12 se mantiene en 70% cuando se sustituye Ser por Leu, es decir, con L35 hay menos contactos. Debido a que el archivo de salida en el escaneo de posiciones solo se dan valores de estabilidad y no de interacción, lo que obtuvimos fue un cambio que en términos energéticos podría beneficiar a la toxina, pero no a la interacción de ésta con el canal. En ese sentido, lo que nos está indicando estos datos son una menor complementariedad de interfaces en la interacción, lo que haría más inestable a la misma.

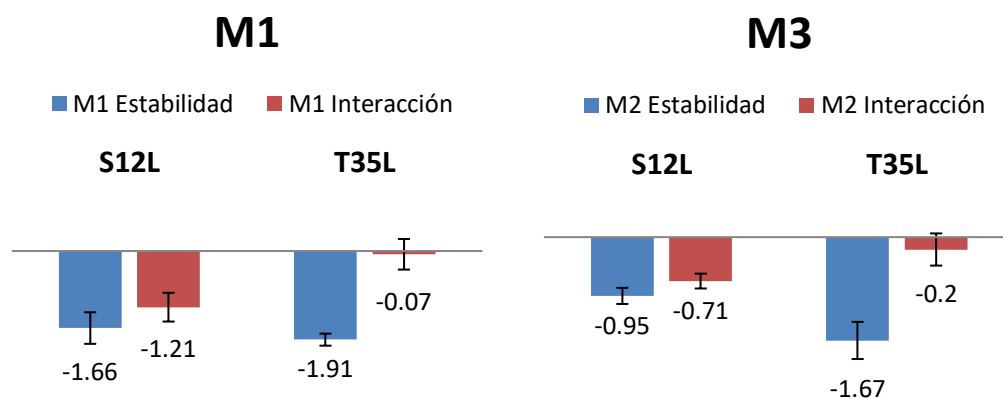


Figura 31. Energías in silico de estabilidad e interacción en Shab de M1 y M3.

Si se hace el cálculo de la energía libre electrostática de la interacción con el programa APBS ($\Delta G_{\text{interacción}} = \Delta G_{\text{desolvatación de la toxina}} + \Delta G_{\text{desolvatación del canal}} + \Delta G_{\text{interacción electrostática de toxina+canal}}$)⁵¹ obtenemos la siguiente tabla (**Tabla 13**):

Tabla 13. Energías APBS de Shab con variantes

Energía	WT	DM	R25A	TMD
	Kcal/mol			
$\Delta G_{\text{desoltx}}$	22.63	25.20	20.66	23.65
$\Delta G_{\text{desolch}}$	16.74	21.59	19.87	20.95
$\Delta G_{\text{elett+ch}}$	-45.90	-55.63	-44.26	-51.41
$\Delta G_{\text{interacción}}$	-6.53	-8.84	-3.72	-6.81

En la Tabla 13 se observa que no hay incremento de TMD mayor a DM como se aprecia en los datos de FoldX. Haciendo una revisión detallada del cálculo de interacción de FoldX, se encuentran algunas inconsistencias. Primero: el $\Delta\Delta G$ de energía electrostática de DM a TMD es de -0.27 Kcal/mol. Esto resulta claramente contradictorio con los datos arrojados por APBS (**Fig. 13, Tabla 13**), y no se explica pues en TMD hay un residuo básico menos respecto a DM, además, los otros dos residuos que se están cambiando son hidrofóbicos por polares. En el cálculo de FoldX, el parámetro que hace la diferencia es el de interacciones hidrofóbicas que, sumándole la ganancia en energía electrostática, manda a TMD a una ganancia energética superior, incluso, que DM.

En cambio, en el cálculo de APBS se aprecia una ligera energía de enlace mayor en TMD respecto a WT. Esto se debe, con seguridad, al residuo K20 presente en TMD, lo que le da una energía de interacción electrostática 5.51 Kcal/mol mayor (**Tabla 13**), pero que se compensa, a su vez, con un mayor costo de desolvatación. El cambio T35L, al dejar mayor superficie accesible a disolvente y hacer menos contactos puede ser la causa en la caída a una afinidad 2 μ M como indica la electrofisiología. Lo que se ve entonces en el cálculo de interacción de la TMD en Shab con FoldX es la suma de las contribuciones de L12 y K20, pero en una situación real la disminución en el área de interface estaría desencadenando la caída de afinidad reportada experimentalmente.

Generando una regresión lineal entre los $\Delta\Delta G$ de APBS contra los $\Delta\Delta G$ experimentales, se obtiene una r de 0.85 y una r^2 de 0.73 (**Fig.32**). Es decir, en términos cualitativos y cuantitativos APBS describe o correlaciona mejor con los datos experimentales que FoldX para este modelo. Esto se podría explicar porque APBS ve las contribuciones de cargas en la interacción, y los datos de permisividad y barrido de alaninas indican que en este modelo los residuos cargados son los de mayor importancia.

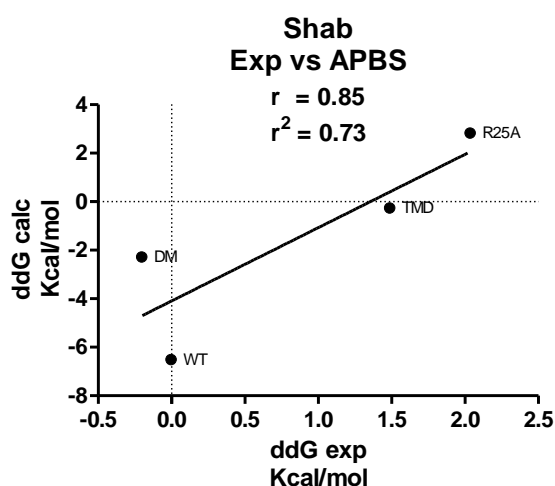


Figura 32. Regresión lineal de nuevas variantes y DM respecto a datos experimentales.

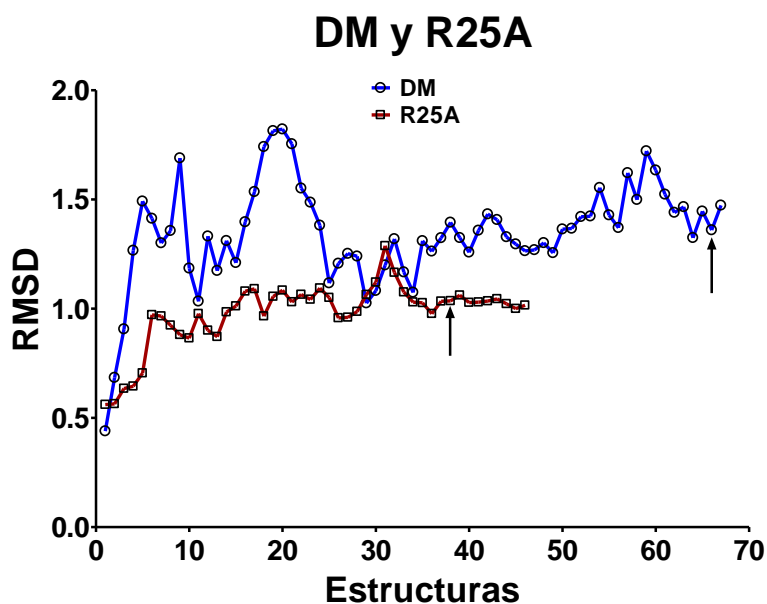
7.15 Discusión y análisis del comportamiento de las nuevas variantes en el canal Kv4.3

Como se aprecia en la Tabla 12, los cálculos de energía de FoldX no correlacionan bien con los datos experimentales. Para el Modelo 1 se obtiene una r de 0.3 y 0.2, y una r^2 de 0.08 y 0.06 para la energía de estabilidad e interacción respectivamente. En el caso del Modelo 2 la r es de -0.47 y -0.64, y la r^2 de 0.22 y 0.4 para la estabilidad e interacción, respectivamente.

Si bien los valores obtenidos son pobres, se puede rescatar que el M2 logró predecir, al menos cualitativamente, el comportamiento de TMD, dándonos un $\Delta\Delta G$ negativo *in silico*, coherente con el experimental.

Respecto a R25A, si se analizan los parámetros de la función de FoldX, se puede observar que hay una pérdida de 1.23 Kcal/mol en las interacciones de VdW cuando se modifica R25A, y de 1.73 Kcal/mol en la energía electrostática. Si se hace la mutación de A a R de regreso, lo que se observa es -1.23 Kcal/mol de ganancia en la energía de hidrofobicidad y 0.2 Kcal/mol de pérdida en repulsiones de VdW, mientras que se pierden 1.1 Kcal/mol en la entropía de la cadena lateral. Tomando en cuenta estos datos, se puede suponer que el complejo es menos estable con Arg en esa posición por el tamaño de la misma, pero el programa le está dando más peso a la energía de contactos VdW y electrostática aportada. Para corroborar la hipótesis se realizó una simulación con PELE con ambas mutantes y se calculó el RMSD.

En la **Figura33** se muestra graficado el RMSD de las estructuras de cada simulación. Se puede observar que el complejo con R25A es más estable con una media de RMSD de 0.98 angstroms mientras que DM, a pesar de tener mayor afinidad se mueve más en el complejo. Las estructuras con mejor energía de interacción de cada corrida se enviaron al servidor PISA (**Fig. 33**, flechas) para calcular el área de la interface y el ΔG de hidrofobicidad de los complejos, donde se obtuvo que el complejo con A25es el que tiene mejor energía de hidrofobicidad y que posee un área de interface mayor. Es decir, un residuo de menor tamaño está permitiendo un mejor acomodo de la toxina en el canal.



	RMSD (Media)	Área de Interface(A ²)	ΔG hidrofobicidad(Kcal/mol)
DM	1.35±0.23	865.5	-6.8
R25A	0.98±0.15	945.2	-7.2

Figura 33. RMSD de estructuras PELE, cálculos de Interface y ΔG de hidrofobicidad de las estructuras con mejor energía de interacción en la simulación (flechas en gráfica).

Si se calcula la energía libre electrostática de DM con APBS, da un resultado de **3.37 Kcal/mol**. Este resultado indica que a diferencia del complejo Shab-DM, el complejo formado con Kv4.3 no está favorecido por la energía electrostática, y si por las interacciones hidrofóbicas, donde al parecer son las fuerzas dominantes de la interacción. Esto concuerda si recordamos que el potencial electrostático del canal Kv4.3 se observa considerablemente menos cargado negativamente que el Shab (ver **Fig. 26**), por lo que resulta lógico esperar que los residuos básicos de la toxina no jueguen el papel predominante que juegan en Shab como lo indica el barrido de alaninas (**Fig. 28**) y la gráfica de permisividad (**Fig. 25**).

7.16 Diseño 2

Una vez percatados del fallo en TMD se propuso generar una nueva variante con un mayor muestreo conformacional y, además, partiendo de la estructura con mejor energía de interacción en la simulación para la siguiente simulación.

En la primera simulación de M1-Shab se utilizaron los siguientes parámetros: 0.5 y 0.05 angstroms de traslación y rotación, respectivamente, además de modos normales para darle

flexibilidad a las cadenas principales de las moléculas. El resultado de esta simulación, en 500 pasos, se encontraron 23 estructuras con menor energía, siendo el número 3 la que tenía mejor energía de interacción con -5.56 Kcal/mol (**Fig.34**). Se partió de esta estructura para otra simulación, pero reduciendo la traslación y rotación a 0.2 y 0.02 angstroms, respectivamente, también con modos normales. El resultado nos arroja 44 estructuras encontradas siendo el número 41 la que mejor energía de interacción con -9.04 Kcal/mol (**Fig. 35**). Partiendo de la estructura 44 se realizó una nueva simulación reduciendo ahora el movimiento de traslación y rotación a 0.1 y 0.01 angstroms, respectivamente, sin modos normales en 250 pasos, pero solo se encontraron 4 soluciones de menor energía global, pero con menor energía de interacción.

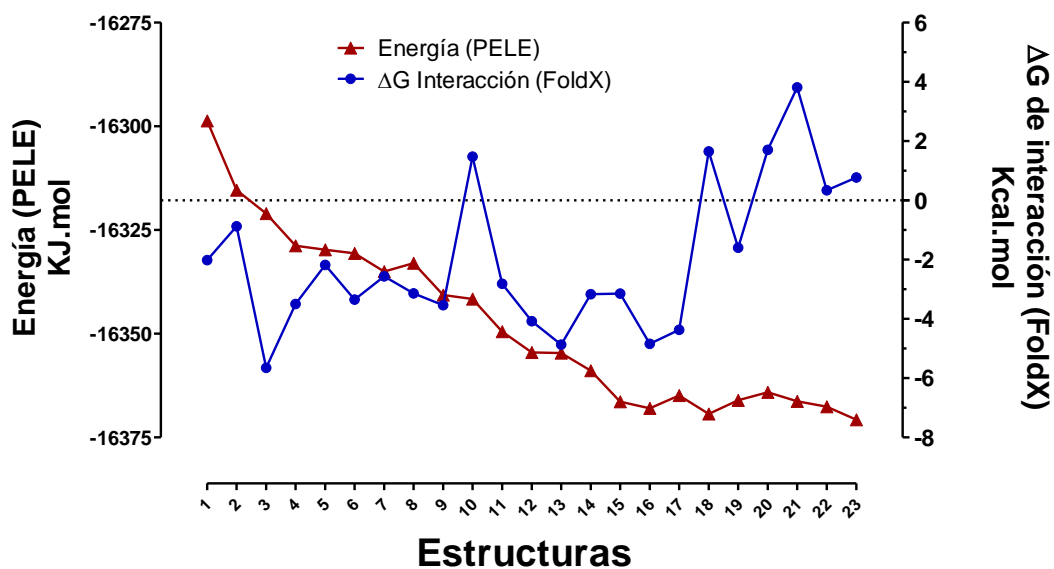


Figura 34. Simulación 1 del M1-Shab para el Diseño 2.

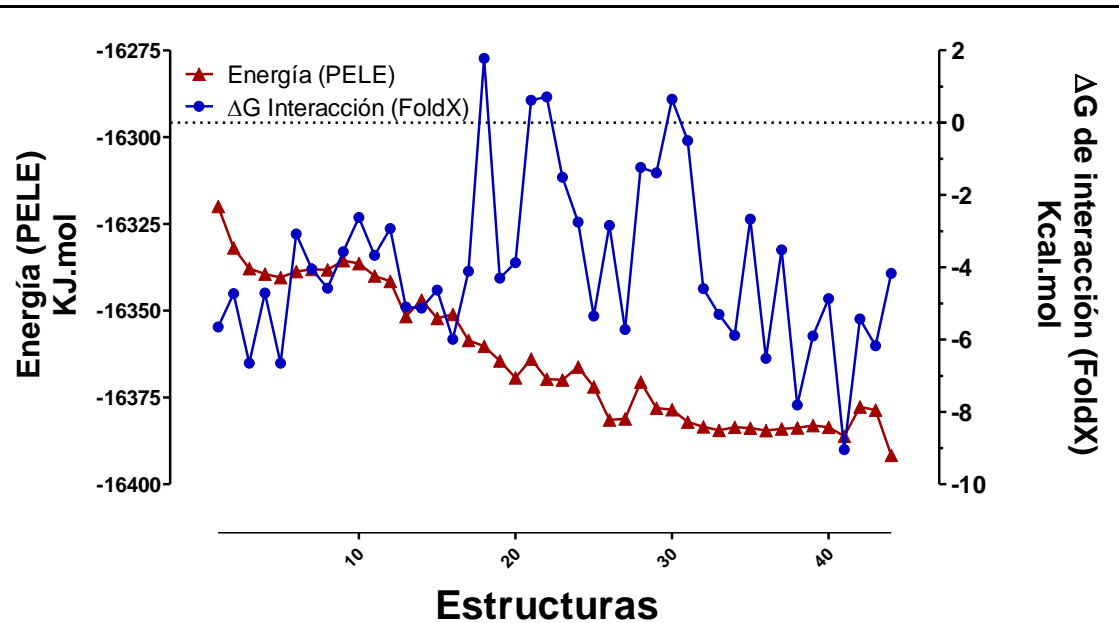


Figura 35. Simulación 2 del M1-Shab Estructura 3.

Se realizó un barrido de alaninas de la estructura 41 para comparar con los resultados del barrido de la Figura 15 (Fig. 36). En esta comparación se puede apreciar que los residuos más importantes se conservan en esta nueva estructura, pero, además, la relevancia en la pérdida de energía de interacción es más clara. Además, otros residuos que no habían sido detectados como relevantes en el análisis de la Figura 15, aquí toman importancia incrementando la pérdida de energía de interacción a más de 1 Kcal/mol los residuos S11, K13, K16 y N31, mientras que S12 y T35 siguen comportándose como residuos no relevantes en la interacción. Por otro lado, el residuo S9 y R33, toman un lugar significativo en este nuevo resultado. El ensayo de una variante con cambio en los residuos que hubo un cambio significativo respecto al primer barrido de alaninas como S11 y K16, nos ayudaría a concluir si una búsqueda más exhaustiva de complejos de mejor energía es necesaria. Por lo pronto queda en evidencia que los residuos que ya se habían detectado como importantes en este nuevo análisis se ven con mayor claridad.

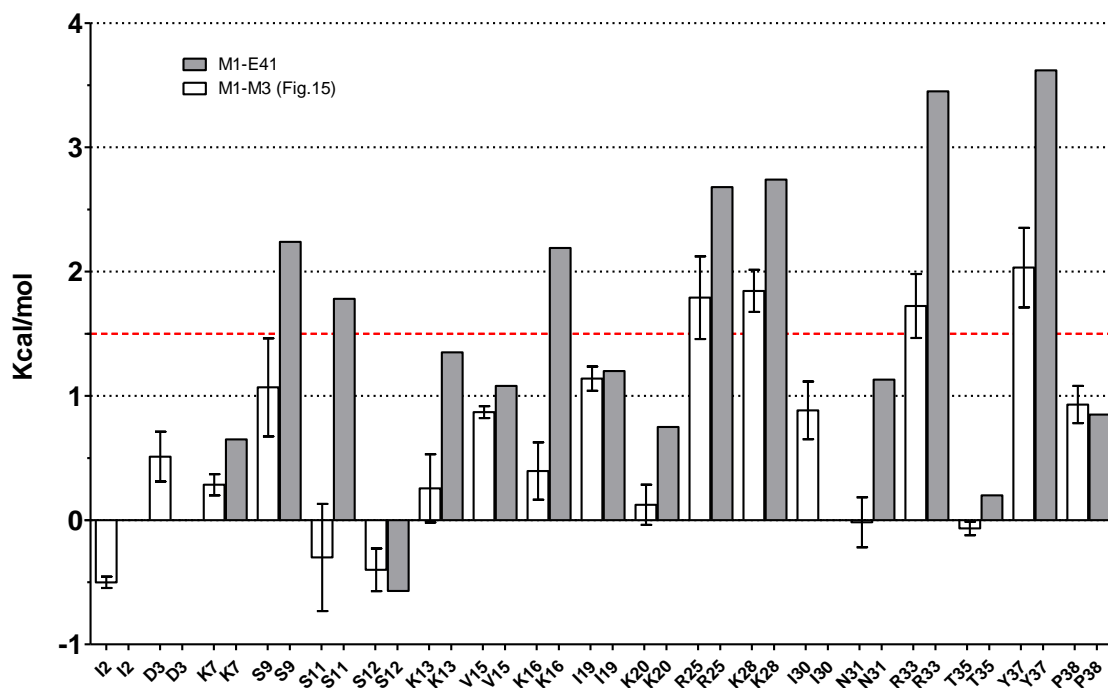


Figura 36. Energía de interacción del barrido de alaninas en la estructura 41 de la simulación 2, en diseño 2 (en gris) y barrido de alaninas de la figura 15 (en blanco).

Realizando un escaneo de posiciones (“Position Scan”) sobre esta estructura se encontró que la posición 12 sigue siendo la que más cambios acepta y con mejor energía de estabilidad (Tabla 14), pero en este caso los residuos con menor energía fueron los residuos aromáticos (Y, W, F). Por ello, S12 se sometió a una nueva fase de mutaciones, pero ahora repitiendo cada cambio 3 veces con el comando “BuildModel” y calculando la energía de interacción.

Tabla 14. Escaneo de posiciones de la estructura 41 de la simulación 2 a partir de 1 Kcal/mol

Cambio	Estabilidad (Kcal/mol)
SERE12Y	-3.77594
SERE12W	-2.60527
ASPE3F	-2.2015
SERE12F	-2.09194
SERE12R	-1.92561
SERE12M	-1.86283
SERE12L	-1.80649
SERE12K	-1.73373
ASPE3Y	-1.69973
ASPE3P	-1.63016

ARGE33T	-1.59686
ARGE21L	-1.49914
ARGE33F	-1.49635
ARGE21M	-1.48718
SERE9F	-1.45997
ILEE17S	-1.36177
SERE9Y	-1.26255
SERE12I	-1.24464
ARGE33W	-1.14999
ASNE5G	-1.12607
SERE12Q	-1.08872
ARGE33S	-1.06265
ARGE33Y	-1.01383

El resultado obtenido ahora con el comando “BuildModel (**Fig. 37**) arroja a Met y Trp como los de mejor energía de interacción (Tyr tiene una desviación estándar muy grande), quedando 0.5Kcal/mol atrás de Leu, residuo que había sido elegido en el primero diseño. Por el mismo argumento esgrimido en el primer diseño, Met fue descartada y se eligió a S12W como el cambio a realizar. Para confirmar que este cambio mejora el área de interface y la energía de hidrofobicidad de la interacción se utilizó PISA (**Tabla 15**), donde se observó que tanto el área de interacción como la energía de hidrofobicidad mejoran con el cambio S12W.

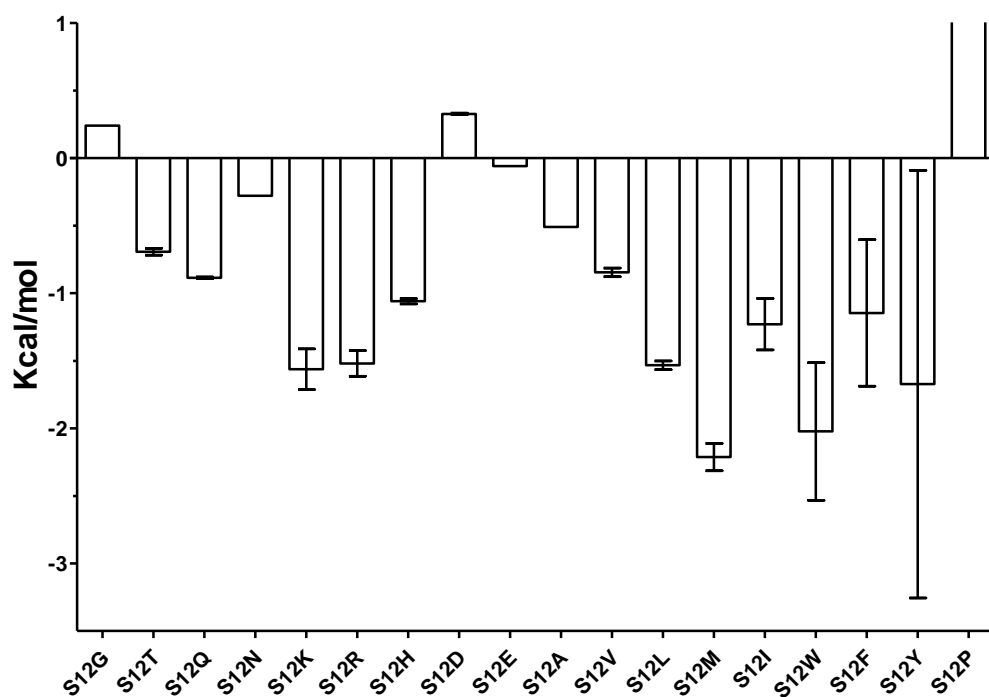


Figura 37. Energía de interacción del escaneo de posiciones para la posición 12 con el comando “BuildModel”. Barras de error representan la desviación estándar.

Tabla 15. Comparación con PISA de la interface de S12 y W12 en la estructura 41 de la simulación 2

	Área de Interface(\AA^2)	ΔG hidrofobicidad(Kcal/mol)
S12	1167.4	-7.4
W12	1257.4	-9.1

8.CONCLUSIONES

En este trabajo se reporta por primera vez un bloqueador de origen peptídico sobre el Shab de *Drosophila melanogaster*, canal del tipo rectificador tardío y sobre el Kv4.3, canal generador de corriente Tipo-A. Tampoco han sido reportados bloqueadores peptídicos para los homólogos mamíferos de Shab (Kv2.1 y Kv2.2), ni para el Kv4.1, por lo que Discrepina es un ligando candidato para estudiar más sobre la electrofisiología y farmacología de estos canales iónicos.

Con ambos canales Shab y Kv4.3 hubo recuperación de la corriente, a diferencia de los ensayos en las células granulares de cerebelo, donde el bloqueo por Discrepina es irreversible, esto lleva a la conclusión de que ninguno de éstos son los responsables de la corriente que se ve en dichas células, por lo cual es interesante llegar a conocer que tipos de receptores iónicos generan las corrientes Tipo-A en estas células.

El “Docking Molecular” para el complejo Shab-DM arrojó una toxina posicionada en el “modo clásico” sobre el canal en 3 modelos que fueron elegidos con 3 funciones de energía y 2 estrategias claramente distintas (Firedock y ZDock). Este resultado indica, en conjunto con el barrido de alaninas donde los residuos de la diada funcional son encontrados como relevantes, que hay una alta probabilidad de que este sea el modo de interacción real.

El comando “PositionScan” de FoldX, encargado de realizar el escaneo de cambios en la secuencia de las moléculas, es un buen predictor de regiones inestables, sin embargo, hay que cuidar la interpretación de los datos que arroja. Este comando envía un archivo de salida donde da los cambios que favorecen a la estabilidad del complejo, pero esta no siempre correlaciona con la energía de interacción como se pudo observar en el análisis de los cambios S12L y T35L (**Fig. 31**). Por lo tanto, un segundo análisis de interacción resulta esencial. Por esto realizamos un segundo diseño con más simulaciones donde encontramos una estructura de menor energía (estructura 41) que representaba de manera similar los datos del barrido de alaninas, pero exacerbando el cambio de energía al mutar los residuos, lo que ayuda a una mejor interpretación de los datos. Además, en dicho análisis realizando de manera más

minuciosa encontramos que el cambio S12W parece ser un mejor prospecto que S12L para mejorar la afinidad.

El error que se vio en el cálculo *in silico* de la variante TMD se debe a que está viendo las contribuciones de L12 y K20, pero en un experimento *in vitro* la reducción en el área de la interface al realizar el cambio T35L podría estar afectando la estabilidad de la interacción.

En R25A, cambió en un orden de magnitud la afinidad en Shab, los programas son capaces de detectar una disminución en la energía de interacción. Esto nos indica que cambios en la afinidad mayores a 1 Kcal/mol nos estarían arrojando predicciones con mayor confianza que aquellos que rondan los 0.5 Kcal/mol. Por esto, mutantes con cambios de afinidad mayores son necesarias para continuar el análisis de la interacción.

Es importante precisar que el análisis independiente de los cambios es imprescindible debido a que si se hace y analiza los cambios de manera simultánea en un mismo modelo sin permitir acomodarse a la toxina según las nuevas redes de interacción de residuos se arriesga a ver interacciones espurias, productos de artefactos del modelo utilizado. Así pues, resulta primordial generar un buen muestreo conformacional de la interacción que dé robustez a los datos como el generado en el diseño 2.

En Kv4.3 vemos como confiar en una función de energía sin consultar otros algoritmos que prioricen otro tipo de interacciones puede darnos resultados equivocados. En R25A, por ejemplo, FoldX le da más peso al aporte electrostático y de VdW aportado por un residuo de mayor tamaño (Arg), mientras que con APBS podemos notar que no estamos viendo un complejo donde las energías electrostáticas son las más importantes dada la baja carga negativa de este canal. Por otro lado, vemos mediante un análisis de estabilidad calculando el RMSD de DM y R25A, que la movilidad es mayor cuando la toxina tiene R25, lo que es un indicador de menor estabilidad, sumado a que con PISA vemos una mayor superficie de contacto cuando tenemos el residuo alanina en esa posición. Es decir, con un residuo pequeño la toxina se está acomodando mejor en el canal.

En términos generales, podemos concluir, que el apoyo en diferentes funciones de energía resulta esencial para entender el fenómeno y proceso de interacción de dos moléculas, y que el apoyo en un muestreo conformacional, para obtener estructuras de baja energía que robustezcan el análisis de posiciones es también de suma importancia, tanto para robustecer el análisis de mutaciones como para analizar la estabilidad de algún complejo.

Con respecto a nuestra hipótesis inicial, podemos decir que existe una correlación de datos experimentales de afinidad con datos *in silico*, en este trabajo, no fue verdadera, sin embargo, hay buenos indicios de que hemos encontrado modelos que explican la interacción. Los indicios más fuertes, en ambos casos, son los datos del barrido de alaninas, donde estos nos arrojan como importantes residuos que ya se saben son relevantes la interacción de este tipo de toxinas, por lo que ensayar variantes con estos cambios son esenciales para la confirmación de los modelos además de mutantes que cambien más drásticamente la afinidad por los canales blanco, Shab y Kv4.3, y que, de esa manera, nos permitan ir entendiendo poco a poco las interacciones importantes en la interacción para poder mejorar la afinidad y especificidad de variantes de la Discrepina.

9. PERSPECTIVAS

Ensayar Discrepina en los canales Kv2.1, Kv2.2 y Kv4.1, para confirmar que también puede bloquear a los homólogos de los canales ensayados.

Ensayar variantes que funcionen como control positivo de los modelos, en este caso K28 y Y37, para darle sustento a la teoría del “modo clásico” de interacción con ambos canales.

Ensayar variantes S11 y R33 en Shab para comprobar que son residuos importantes en la interacción, así como el cambio T35L para asegurarse de que es un cambio perjudicial en la interacción con el canal iónico como lo ve PISA.

Ensayar la mutante P38A en Kv4.3 para comprar que es un residuo importante como lo indica el barrido de alaninas. También analizar que residuos básicos se pueden cambiar por hidrofóbicos y así dar certeza a la teoría que nos dice, según los datos de escaneo de posiciones y barrido de alaninas, que los residuos básicos no son relevantes en esta interacción dado el bajo potencial electrostático negativo de este canal.

Ensayar la variante S12W, que se predice una mejora en ~ 2 Kcal/mol la interacción. Dicha variante en el canal Shab permitirá validar la capacidad predictiva de los programas y la metodología en empleada en este trabajo.

10. REFERENCIAS

1. Lodish HF. *Molecular Cell Biology*. 5th ed. (Freeman and Company, ed.); 2003.
2. Alberts B. The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. *Cell*. 1998;92(3):291-294. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9476889>. Accessed December 10, 2010.
3. Brunner HG, van Driel MA. From syndrome families to functional genomics. *Nat Rev Genet*. 2004;5(7):545-551. doi:10.1038/nrg1383.
4. Ryan DP, Matthews JM. Protein-protein interactions in human disease. *Curr Opin Struct Biol*. 2005;15(4):441-446. doi:10.1016/j.sbi.2005.06.001.
5. Uetz P, Giot L, Cagney G, et al. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. 2000;403(6770):623-627. doi:10.1038/35001009.
6. Gavin A-C, Aloy P, Grandi P, et al. Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature*. 2006;440(7084):631-636. doi:10.1038/nature04532.
7. Dutta S, Berman HM. Large macromolecular complexes in the Protein Data Bank: a status report. *Structure*. 2005;13(3):381-388. doi:10.1016/j.str.2005.01.008.
8. Sali A, Overington JP. Derivation of rules for comparative protein modeling from a database of protein structure alignments. *Protein Sci*. 1994;3(9):1582-1596. doi:10.1002/pro.5560030923.
9. Chothia C, Lesk AM. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J*. 1986;5(4):823-826. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1166865&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed December 31, 2010.
10. Orengo CA, Thornton JM. Protein families and their evolution-a structural perspective. *Annu Rev Biochem*. 2005;74:867-900. doi:10.1146/annurev.biochem.74.082803.133029.
11. Chothia C. Proteins. One thousand families for the molecular biologist. *Nature*. 1992;357(6379):543-544. doi:10.1038/357543a0.
12. Jones TA, Thirup S. Using known substructures in protein model building and crystallography. *EMBO J*. 1986;5(4):819-822. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1166864&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed October 21, 2010.
13. Lensink MF, Méndez R, Wodak SJ. Docking and scoring protein complexes: CAPRI 3rd Edition. *Proteins*. 2007;69(4):704-718. doi:10.1002/prot.21804.
14. Fagerberg L, Jonasson K, von Heijne G, Uhlén M, Berglund L. Prediction of the human membrane proteome. *Proteomics*. 2010;10(6):1141-1149. doi:10.1002/pmic.200900258.
15. White S. Membrane Proteins of Known Structure. <http://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/>. Accessed April 17, 2015.
16. Capener CE. Ion channels: structural bioinformatics and modelling. *Hum Mol Genet*. 2002;11(20):2425-2433. doi:10.1093/hmg/11.20.2425.

-
17. MacKinnon R. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature*. 1991;350(6315):232-235. doi:10.1038/350232a0.
 18. Ranganathan R, Lewis JH, MacKinnon R. Spatial localization of the K⁺ channel selectivity filter by mutant cycle-based structure analysis. *Neuron*. 1996;16(1):131-139. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8562077>. Accessed January 6, 2011.
 19. Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, et al. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev*. 2005;57(4):473. doi:10.1124/pr.57.4.10.1.
 20. Yellen G. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*. 2002;419(6902):35-42. <http://www.nature.com/nature/journal/v419/n6902/abs/nature00978.html>. Accessed January 6, 2011.
 21. Doyle DA. The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K⁺ Conduction and Selectivity. *Science (80-)*. 1998;280(5360):69-77. doi:10.1126/science.280.5360.69.
 22. Long SB, Campbell EB, Mackinnon R. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science*. 2005;309(5736):897-903. doi:10.1126/science.1116269.
 23. Long SB, Tao X, Campbell EB, MacKinnon R. Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature*. 2007;450(7168):376-382. doi:10.1038/nature06265.
 24. Coetzee W a, Amarillo Y, Chiu J, et al. Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;868:233-285. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10414301>.
 25. Tytgat J. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: α -KTx molecular subfamilies. *Trends Pharmacol Sci*. 1999;20(11):444-447. doi:10.1016/S0165-6147(99)01398-X.
 26. Legros C, Céard B, Bougis PE, Martin-Eauclaire MF. Evidence for a new class of scorpion toxins active against K⁺ channels. *FEBS Lett*. 1998;431(3):375-380. [http://www.febsletters.org/article/S0014-5793\(98\)00780-7/abstract](http://www.febsletters.org/article/S0014-5793(98)00780-7/abstract). Accessed January 7, 2011.
 27. Rodríguez de la Vega R. Novel interactions between K⁺ channels and scorpion toxins. *Trends Pharmacol Sci*. 2003;24(5):222-227. doi:10.1016/S0165-6147(03)00080-4.
 28. MacKinnon R, Heginbotham L, Abramson T. Mapping the receptor site for charybdotoxin, a pore-blocking potassium channel inhibitor. *Neuron*. 1990;5(6):767-771. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1702643>. Accessed January 7, 2011.
 29. Eriksson MAL, Roux B. Modeling the structure of agitoxin in complex with the Shaker K⁺ channel: a computational approach based on experimental distance restraints extracted from thermodynamic mutant cycles. *Biophys J*. 2002;83(5):2595-2609. doi:10.1016/S0006-3495(02)75270-3.
 30. Zachariae U, Schneider R, Velisetty P, et al. The molecular mechanism of toxin-induced conformational changes in a potassium channel: relation to C-type inactivation. *Structure*. 2008;16(5):747-754. doi:10.1016/j.str.2008.01.018.
 31. Lange A, Giller K, Hornig S, et al. Toxin-induced conformational changes in a potassium channel revealed by solid-state NMR. *Nature*. 2006;440(7086):959-962. doi:10.1038/nature04649.
 32. Yu L, Sun C, Song D, et al. Nuclear magnetic resonance structural studies of a potassium channel-charybdotoxin complex. *Biochemistry*. 2005;44(48):15834-15841. doi:10.1021/bi051656d.

-
33. Lecoq A. On the Convergent Evolution of Animal Toxins. CONSERVATION OF A DIAD OF FUNCTIONAL RESIDUES IN POTASSIUM CHANNEL-BLOCKING TOXINS WITH UNRELATED STRUCTURES. *J Biol Chem.* 1997;272(7):4302-4309. doi:10.1074/jbc.272.7.4302.
 34. Cordero-Morales JF, Cuello LG, Zhao Y, et al. Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter. *Nat Struct Mol Biol.* 2006;13(4):311-318. doi:10.1038/nsmb1069.
 35. D'Suze G, Batista CVF, Frau A, et al. Discrepin, a new peptide of the sub-family alpha-ktx15, isolated from the scorpion *Tityus discrepans* irreversibly blocks K⁺ -channels (IA currents) of cerebellum granular cells. *Arch Biochem Biophys.* 2004;430(2):256-263. doi:10.1016/j.abb.2004.07.010.
 36. Prochnicka-Chalufour A, Corzo G, Satake H, et al. Solution structure of discrepin, a new K⁺-channel blocking peptide from the alpha-KTx15 subfamily. *Biochemistry.* 2006;45(6):1795-1804. doi:10.1021/bi0519248.
 37. Prestipino G, Corzo G, Romeo S, et al. Scorpion toxins that block transient currents (I(A)) of rat cerebellum granular cells. *Toxicol Lett.* 2009;187(1):1-9. doi:10.1016/j.toxlet.2009.01.027.
 38. Vacher H, Alami M, Crest M, Possani LD, Bougis PE, Martin-Eauclaire M-F. Expanding the scorpion toxin α -KTX 15 family with AmmTX3 from *Androctonus mauretanicus*. *Eur J Biochem.* 2002;269(24):6037-6041. doi:10.1046/j.1432-1033.2002.03294.x.
 39. Serôdio P, Rudy B. Differential expression of Kv4 K⁺ channel subunits mediating subthreshold transient K⁺ (A-type) currents in rat brain. *J Neurophysiol.* 1998;79(2):1081-1091. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9463463>.
 40. Romeo S, Corzo G, Vasile A, Satake H, Prestipino G, Possani LD. A positive charge at the N-terminal segment of Discrepin increases the blocking effect of K⁺ channels responsible for the IA currents in cerebellum granular cells. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1780(4):750-755. doi:10.1016/j.bbagen.2008.01.012.
 41. Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, et al. Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr Protoc Protein Sci.* 2007;Chapter 2:Unit 2.9. doi:10.1002/0471140864.ps0209s50.
 42. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007;23(21):2947-2948. doi:10.1093/bioinformatics/btm404.
 43. Chen R, Li L, Weng Z. ZDOCK: an initial-stage protein-docking algorithm. *Proteins.* 2003;52(1):80-87. doi:10.1002/prot.10389.
 44. Pierce B, Weng Z. ZRANK: reranking protein docking predictions with an optimized energy function. *Proteins.* 2007;67(4):1078-1086. doi:10.1002/prot.21373.
 45. Jacobson MP, Friesner RA, Xiang Z, Honig B. On the Role of the Crystal Environment in Determining Protein Side-chain Conformations. *J Mol Biol.* 2002;320(3):597-608. doi:10.1016/S0022-2836(02)00470-9.
 46. Andrusier N, Nussinov R, Wolfson HJ. FireDock: fast interaction refinement in molecular docking. *Proteins.* 2007;69(1):139-159. doi:10.1002/prot.21495.
 47. Schymkowitz J, Borg J, Stricher F, Nys R, Rousseau F, Serrano L. The FoldX web server: an online force field. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(Web Server issue):W382-W388. doi:10.1093/nar/gki387.
 48. Buslenko NP, Shreider YA, Tee GJ. *The Monte Carlo Method: The Method of Statistical Trials*. Pergamon Press; 1966. http://books.google.com.mx/books/about/The_Monte_Carlo_Method.html?id=gfWIPgAACAAJ&pgis=1. Accessed April 20, 2015.
-

-
49. Sharman JL, Mpamhanga CP, Spedding M, et al. IUPHAR-DB: new receptors and tools for easy searching and visualization of pharmacological data. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(Database issue):D534-D538. doi:10.1093/nar/gkq1062.
 50. Méndez R, Leplae R, De Maria L, Wodak SJ. Assessment of blind predictions of protein-protein interactions: current status of docking methods. *Proteins.* 2003;52(1):51-67. doi:10.1002/prot.10393.
 51. Wang T, Tomic S, Gabdoulina RR, Wade RC. How optimal are the binding energetics of barnase and barstar? *Biophys J.* 2004;87(3):1618-1630. doi:10.1529/biophysj.104.040964.