

EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE TOXINAS INHIBIDORAS DE CANALES DE K⁺

Saucedo Yáñez A., Ramírez Cordero B., Brieba de Castro L., Possani Postay L. y del Río Portilla F.

Laboratorio Bioquímica 1, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 3000, Ciudad Universitaria, México, D.F., C.P. 04510. Teléfono (55) 5622 4613, jfrp@servidor.unam.mx.

Introducción

Los canales de K⁺ juegan un papel central en los mecanismos de excitabilidad celular y transducción de señales, sus características fisiológicas y estructurales pueden ser elucidadas utilizando toxinas peptídicas aisladas del veneno de alacrán. Algunas de estas toxinas (KTx) que son bloqueadores de alta afinidad y selectividad para canales de potasio dependientes de voltaje, son péptidos de cadena corta, de 23 a 43 aminoácidos, que se estabilizan con 3 o 4 puentes disulfuro. El conocimiento de su estructura ayudaría a mejorar el entendimiento de su función e interacción con el canal y conducir al diseño de fármacos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con estos canales.¹

Del veneno del alacrán *T. trivittatus* se purificó una toxina de 28 aminoácidos (Tx1), inhibidora del canal de potasio dependiente de voltaje Kv 1.2. La secuencia de esta toxina tiene una identidad menor al 40% con las α -KTx conocidas. Lamentablemente la cantidad de toxina obtenida a partir del veneno fue insuficiente para elucidar su estructura por resonancia magnética nuclear (RMN). Fue por ello que se construyó un plásmido con la secuencia codificante de la toxina Tx1 (pTx1), que permite la expresión en *E. coli* bajo la regulación del operón *lac*. Tx1 se produce como una fusión a tiorredoxina con una etiqueta de histidinas para facilitar la purificación.

Resultados

Para la expresión de la proteína de fusión se hizo la transformación de células de *E. coli* Rosetta-gami (DE3) con el plásmido pTx1. En medio de cultivo LB se indujo la expresión con IPTG 0.5 mM a 30°C. La purificación de la proteína de fusión (21 kDa) se hizo por cromatografía de afinidad metal quelato (CAMQ) utilizando una columna tipo HiTrap Ni-NTA. La proteína de fusión se hidrolizó con trombina para obtener a la toxina Tx1 recombinante (3.3 kDa). Posteriormente, fue necesario remover mediante CAMQ el segmento que contiene a la etiqueta de histidinas. Finalmente, en la última etapa de purificación de la toxina recombinante se utilizó cromatografía de líquidos de fase reversa (C18), técnica con la que fue posible separar dos péptidos, que al ser caracterizados por espectrometría de masas con ionización por "electrospray" tuvieron la masa esperada para la toxina recombinante, 3325 Da.

La estructura tridimensional de las toxinas se estimó con los datos espectroscópicos derivados de la obtención e interpretación de los espectros de RMN COSY, TOCSY y NOESY.

¹ Rodríguez de la Vega R., et al. *Trends Pharm. Sci.* 24(2003)222.