

Determinación computacional de la relación estructura-actividad en las conotoxinas cal29b y xm11a, y su unión a los receptores farmacológicos en *Mycobacterium tuberculosis*.

**Carlos Santiago Velo Fernández**  
Máster en Bioinformática y Bioestadística  
Área 1

**Miguel Romero Cuevas**

**Javier Luis Cánovas Izquierdo**  
Junio 2019



Esta obra está sujeta a una licencia de Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada [3.0 España de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/)

## FICHA DEL TRABAJO FINAL

<b>Título del trabajo:</b>	<i>Determinación computacional de la relación estructura-actividad en las conotoxinas cal29b y xm11a, y su unión a los receptores farmacológicos en Mycobacterium Tuberculosis.</i>
<b>Nombre del autor:</b>	<i>Carlos Santiago Velo Fernández</i>
<b>Nombre del consultor/a:</b>	<i>Miguel Romero Cuevas</i>
<b>Nombre del PRA:</b>	<i>Javier Luis Cánovas Izquierdo</i>
<b>Fecha de entrega (mm/aaaa):</b>	06/2019
<b>Titulación:</b>	<i>Máster en Bioinformática y Bioestadística</i>
<b>Área del Trabajo Final:</b>	<i>Área 1</i>
<b>Idioma del trabajo:</b>	<i>Español</i>
<b>Palabras clave</b>	<i>conotoxin, Mycobacterium, docking, cadd</i>
<p><b>Resumen del Trabajo (máximo 250 palabras):</b> <i>Con la finalidad, contexto de aplicación, metodología, resultados i conclusiones del trabajo.</i></p>	
<p>Las conotoxinas son un grupo de péptidos procedentes del veneno de los caracoles marinos del género <i>Conus</i> que han sido estudiadas en los últimos años debido a su gran potencial terapéutico para el tratamiento de múltiples enfermedades.</p> <p>Estudios recientes describen dos conotoxinas, cal29b y xm11a, con actividad sobre <i>Mycobacterium tuberculosis</i>, cuya infección es una de las principales causas de muerte a nivel mundial.</p> <p>Estas conotoxinas no han sido caracterizadas estructuralmente todavía y su mecanismo de acción es desconocido, por lo que el empleo de las técnicas bioinformáticas puede ofrecer una aproximación a las estructuras de las conotoxinas y al método de unión a las posibles dianas terapéuticas.</p> <p>En este trabajo se ha propuesto una caracterización estructural para estas conotoxinas a partir de su secuencia y se ha realizado el acoplamiento ligando-receptor para determinar su unión a las dianas farmacológicas más relevantes actualmente para esta bacteria.</p> <p>Los resultados muestran ciertas coincidencias estructurales entre las conotoxinas con actividad antibacteriana y en las conformaciones adoptadas sobre las dianas, aunque estos resultados no son concluyentes y es necesario un mayor estudio de las conotoxinas para determinar su mecanismo de acción.</p>	

**Abstract (in English, 250 words or less):**

Conotoxins are a group of peptides extracted from the venom of marine cone snails belonging to genus *Conus*. In the last few years these peptides have been studied due to its great therapeutic potential.

Recent research studies describe two new conotoxins, cal29a and xm11a, which showed pharmacological activity against *Mycobacterium tuberculosis*, the main cause of tuberculosis. This disease is one of main causes of death worldwide.

The structure of these conotoxins is not published and their mechanism of action is unknown. Bioinformatic tools like Computer Aided Drug Design (CADD) could give an approach to the structure and how conotoxins binds to the targets.

As a result of this research we propose a structural characterization from the peptide sequence of these conotoxins and peptide-protein docking models for the most relevant targets for *Mycobacterium tuberculosis*.

The results of this reseach show similarities between conotoxins with antimycobacterial activity. However, more studies are needed in order to characterize the mechanism of action.

## Índice

1.	Introducción .....	1
1.1	Contexto y justificación del Trabajo .....	1
1.2	Objetivos del Trabajo .....	3
1.3	Enfoque y método seguido .....	4
1.4	Planificación del Trabajo .....	5
1.5	Breve resumen de productos obtenidos .....	8
1.6	Breve descripción de los otros capítulos de la memoria .....	8
2.	Materiales y métodos. ....	9
3.	Resultados .....	12
3.1	Selección de conotoxinas y secuencia.....	12
3.2	Modelos tridimensionales para las conotoxinas.....	17
3.3	Selección de receptores y estructura tridimensional. ....	33
3.4	Acoplamiento conotoxina-receptor. ....	36
3.5	Análisis de resultados.....	38
4.	Conclusiones .....	54
5.	Glosario .....	57
6.	Bibliografía .....	58

## Lista de figuras

Figura 1: Ziconotide (Prialt)	1
Figura 2: Esquema de la pared celular de Mycobacterium Tuberculosis	2
Figura 3: Calendario de la planificación del trabajo.	7
Figura 4: Parámetros establecidos en PEP-FOLD.	10
Figura 5: Pantalla principal de HPEPDOCK	10
Figura 6: Parámetros de Chimera para el alineamiento.	11
Figura 7: Alineamiento de las tres secuencias en CLUSTAL.	13
Figura 8: Modelo generado para cal29b	18
Figura 9: Diagrama de Ramachandran para cal29b	19
Figura 10: Disposición de las cisteínas y sus interacciones intramoleculares	20
Figura 11: Regiones de hidrofobicidad del modelo.	20
Figura 12: Modelo generado para cal29a.	21
Figura 13: Diagrama de Ramachandran para cal29a.	22
Figura 14: Disposición de las cisteínas y sus interacciones intramoleculares-	23
Figura 15: Regiones de hidrofobicidad para el modelo.	23
Figura 16: Modelo generado para xm11a.	24
Figura 17: Diagrama de Ramachandran para xm11a.	25
Figura 18: Superposición de RXIA y xm11a	26
Figura 19: Alineamiento de RXIA y xm11a	26
Figura 20: Disposición de las cisteínas y sus interacciones intramoleculares.	27
Figura 21: Regiones de hidrofobicidad para el modelo.	27
Figura 22: Superposición de cal29a y cal29b	28
Figura 23: Alineamiento de cal29a y cal29b	29
Figura 24: Superposición de xm11a y cal29b.	30
Figura 25: Alineamiento de xm11a y cal29b.	30
Figura 26: Superposición de los tres modelos.	31
Figura 27: Alineamiento de las tres estructuras.	32
Figura 28: Acoplamiento cal29b-maltosyltransferase	38
Figura 29: Lugar de unión de cal29b (violeta) -maltosyltransferase	39
Figura 30: Acoplamiento xm11a-ClpC1	40
Figura 31: Lugar de unión de xm11a-ClpC1	41
Figura 32: Acoplamiento cal29b-ClpC1	42
Figura 33: Lugar de unión cal29b-ClpC1	42
Figura 34: Acoplamiento cal29a-ClpC1	44
Figura 35: Lugar de unión cal29a-ClpC1	44
Figura 36: Superposición de las tres conformaciones para ClpC1	46
Figura 37: Acoplamiento entre xm11a y oxidorreductase	47
Figura 38: Lugar de unión entre xm11a (violeta) y oxidorreductase	48
Figura 39: Acoplamiento cal29b-DprE1	49
Figura 40: Lugar de unión cal29b y DprE1	49
Figura 41: Acoplamiento cal29a-DprE1	51
Figura 42: Lugar de unión cal29a-DprE1	52
Figura 43: Superposición de las tres conformaciones para DprE1	53

## Lista de tablas

Tabla 1: Planificación del trabajo por tareas .....	5
Tabla 2: Hitos en la planificación del trabajo .....	6
Tabla 3: Entregas del trabajo según la guía de la asignatura. ....	6
Tabla 4: Resumen de las secuencias de las conotoxinas seleccionadas. ....	12
Tabla 5: Cargas de las conotoxinas.....	13
Tabla 6: Clasificación de los patrones de cisteína en la actualidad. Extraída de [26] ....	14
Tabla 7: Clasificación de superfamilias y el número de precursores que contienen actualmente. Extraída de [26] .....	15
Tabla 8: Patrones de cisteína en las conotoxinas seleccionadas. ....	16
Tabla 9: Parámetros para el modelo de cal29b en PEP-FOLD.....	17
Tabla 10: Parámetros obtenidos para cal29a en PEP-FOLD.....	21
Tabla 11: Parámetros para el modelo xm11a en PEP-FOLD. ....	24
Tabla 12: Lista de dianas terapéuticas seleccionadas. ....	35
Tabla 13: Resumen de las energías de acoplamiento para los diferentes ligandos y sus receptores.....	37

# 1. Introducción

## 1.1 Contexto y justificación del Trabajo

En los últimos años el estudio de compuestos procedentes de organismos marinos ha sido uno de los principales objetivos de la investigación farmacéutica para la búsqueda de nuevas moléculas con potencial terapéutico. El medio marino posee unas características variables, como la temperatura o la presión, que ha provocado que las especies que lo habitan hayan desarrollado diferentes mecanismos a través de la evolución para poder sobrevivir, incluyendo moléculas con actividad farmacológica que tienen potencial para su uso terapéutico en humanos.

Desde que se describiese el primer compuesto de origen marino con actividad biológica en los años 50 [1] el interés sobre este tipo de moléculas ha ido creciendo y actualmente se han descrito más de 30.000 compuestos procedentes de organismos marinos, siendo descritos más de 1.000 cada año [2]. Estos estudios han llevado a la autorización de varias moléculas para su uso en humanos, como Ziconotide, comercializado como Prialt® [3] para el tratamiento del dolor crónico; Carragenina, comercializado como Carragelose® [4] con actividad antiviral; o Trabectedina, comercializada como Yondelis® [5] por la española PharmaMar.

El ziconotide fue el primer fármaco de este origen autorizado en el año 2004 por la FDA [6] y en 2005 por la EMA [7]. Esta molécula deriva de la conotoxina MVIIA [8], obtenida del estudio del caracol marino *Conus Magus*, que forma parte de la amplia familia Conidae y que es uno de los principales objetivos en la investigación de compuestos de origen marino.

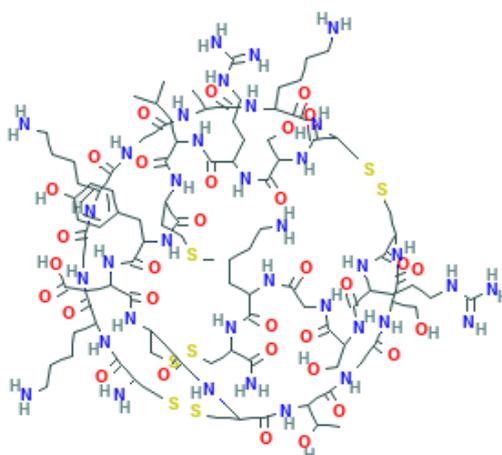


Figura 1: Ziconotide (Prialt®). Imagen extraída de [64]

Esta familia de caracoles marinos comenzó su estudio en los años 70 debido a la gran potencia que presentaba su veneno [9]. Los estudios mostraron que este veneno se compone de cientos de péptidos de pequeño tamaño, con múltiples acciones farmacológicas, denominados **conotoxinas**.

La composición del veneno varía en cada especie de *Conus*, y son muy pocos los péptidos que se repiten en otras especies, por lo que existe una enorme variedad de conotoxinas y las estimaciones indican que existen decenas de miles de péptidos únicos [10] [11], aunque actualmente solamente se han caracterizado menos de 3000 conotoxinas [12].

A medida que se estudian nuevas especies de este género se van describiendo nuevos péptidos con diferentes actividades farmacológicas [13], principalmente sobre los canales iónicos activados por voltaje aunque también actúan sobre otras dianas tales como receptores de acetilcolina, de serotonina o de adrenalina [14] [15]. La diversidad de dianas farmacológicas hace que estas moléculas se estudien para el tratamiento de enfermedades como Alzheimer, Parkinson [16] o cáncer [17] [18].

Recientemente se ha descubierto una conotoxina, cal29b [19], procedente de *Californiconus californicus*, que muestra actividad antimicobacteriana, una acción farmacológica novedosa para este tipo de moléculas. La investigación de nuevos medicamentos para la **tuberculosis** es uno de los principales objetivos globales de la sanidad actualmente. Esta enfermedad es la principal causa de muerte por infección y es la novena causa de muerte a nivel mundial [20].

La dificultad en el tratamiento de esta enfermedad se debe a que la bacteria que la causa, *Mycobacterium tuberculosis*, es altamente resistente a antibióticos [21]. Esta bacteria posee diversos mecanismos de resistencia entre los que destaca su característica compleja membrana celular que dificulta la entrada de fármacos al interior [22]

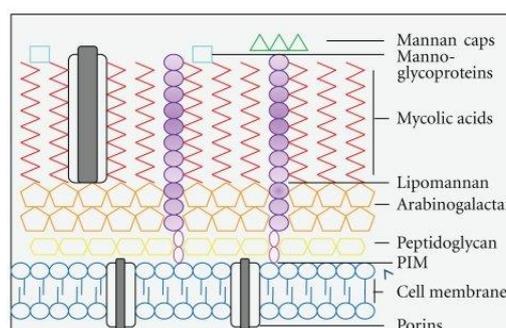


Figura 2: Esquema de la pared celular de *Mycobacterium Tuberculosis*. Imagen extraída de [65]

Actualmente el tratamiento consiste en la asociación de antibióticos durante periodos prolongados [23], por lo que se investiga buscando nuevas alternativas terapéuticas.

Las técnicas de descubrimiento de fármacos asistido por ordenador (CADD) han ido adquiriendo relevancia en la investigación farmacéutica en los últimos años. Este conjunto de técnicas bioinformáticas puede darnos una aproximación a la caracterización estructural y tratar de determinar las posibles dianas terapéuticas sobre las que podrían tener actividad las moléculas, para posteriormente realizar un estudio farmacológico.

La conotoxina cal29b no ha sido estudiada estructuralmente todavía ni se conoce su mecanismo de acción. La caracterización de sus modelos tridimensionales y posterior unión a receptores presentes en *Mycobacterium tuberculosis* exige el empleo de la bioinformática para poder describir las características de este péptido y aportar nuevos conocimientos sobre su actividad antibacteriana.

## **1.2 Objetivos del Trabajo**

### **Objetivos generales:**

1. Caracterizar estructuralmente conotoxinas estudiadas experimentalmente con potencial terapéutico antimicobacteriano y los posibles receptores sobre los que podrían actuar.
2. Emplear métodos computacionales para determinar su unión a las posibles dianas terapéuticas y su acción farmacológica.

### **Objetivos específicos:**

1. Seleccionar las conotoxinas con potencial terapéutico para el tratamiento de la tuberculosis en la investigación actual a partir de estudios farmacológicos.
2. Caracterizar su estructura tridimensional.
3. Seleccionar los receptores farmacológicos sobre los que podrían actuar y obtener su estructura tridimensional.

4. Realizar el acoplamiento entre conotoxina y receptor mediante técnicas computacionales.
5. Analizar los resultados obtenidos para profundizar en su actividad farmacológica.

### **1.3 Enfoque y método seguido**

En este trabajo se pretende aportar nuevos datos sobre los eventos moleculares por los que determinadas conotoxinas presentan actividad antimicobacteriana. Para ello, se caracterizará estructuralmente estos péptidos y se analizan sobre que dianas terapéuticas podrían ejercer su función en *Mycobacterium tuberculosis*.

A la hora de realizar el trabajo es necesario obtener las estructuras tridimensionales de estas moléculas. Estos péptidos son recientes y no se han publicado todavía sus estructuras tridimensionales, por lo que se ha tenido que proponer unos modelos estructurales. La selección de otras conotoxinas bien caracterizadas estructuralmente hubiese cambiado la temática del trabajo, donde ha prevalecido la selección de estas conotoxinas recientes por el gran interés terapéutico por la enfermedad.

Para la selección de receptores en *Mycobacterium tuberculosis* se ha tenido en cuenta las características tanto de los péptidos antibacterianos como de la propia bacteria. Se ha seleccionado una variedad de posibles receptores seleccionando los más relevantes según la bibliografía seleccionada para ofrecer una visión más amplia, ya que este tipo de péptidos tienen diversos mecanismos de acción y el estudio de una sola diana hubiese sido demasiado específico para los objetivos de este trabajo.

## 1.4 Planificación del Trabajo

Tareas para la realización del trabajo:

1. Realizar una búsqueda bibliográfica de las conotoxinas con actividad antimicobacteriana.
2. Caracterizar la estructura tridimensional de las mismas a partir de su secuencia.
3. Estudiar las posibles dianas terapéuticas para su actividad farmacológica y obtener su estructura tridimensional.
4. Realizar las técnicas de acoplamiento.
5. Analizar los resultados obtenidos.
6. Redacción de la memoria.
7. Elaboración de la presentación.

*Tabla 1: Planificación del trabajo por tareas*

TAREA	TIEMPO ASIGNADO (DÍAS)
Búsqueda en bases de datos	7
Estructura tridimensional	7
Estudio de receptores	7
Acoplamiento	18
Análisis de resultados	11
Redacción de la memoria	12
Elaboración de la presentación	6

Se han marcado los siguientes hitos en función de las principales etapas del trabajo:

Tabla 2: Hitos en la planificación del trabajo

HITOS	DESCRIPCIÓN	FECHA
<b>Lista de conotoxinas</b>	En este punto debemos tener ya la lista de conotoxinas sobre las que se trabajará posteriormente	26/03/2019
<b>Estructuras tridimensionales</b>	En esta fecha debemos disponer de las estructuras tridimensionales de las conotoxinas y receptores.	11/04/2019
<b>Resultados</b>	Tras la fase de docking y el análisis ya tendremos los resultados del trabajo previos a la redacción de la memoria.	6/05/2019
<b>Memoria</b>	En este hito intermedio ya deberíamos tener finalizada la memoria a falta de ultimar los detalles de la entrega.	31/05/2019

Además de los hitos propuestos debemos tener en cuenta las fechas de las distintas entregas del TFM para su evaluación continuada, que sirven como referencia.

Tabla 3: Entregas del trabajo según la guía de la asignatura.

ENTREGAS	FECHA
<b>Desarrollo del trabajo – fase 1</b>	24/04/2019
<b>Desarrollo del trabajo – fase 2</b>	20/05/2019
<b>Cierre de la memoria</b>	04/06/2019
<b>Elaboración de la presentación</b>	12/06/2019

## Calendario del proyecto:

En la planificación del trabajo se ha establecido el siguiente calendario, de acuerdo con la planificación de la asignatura y los hitos establecidos.

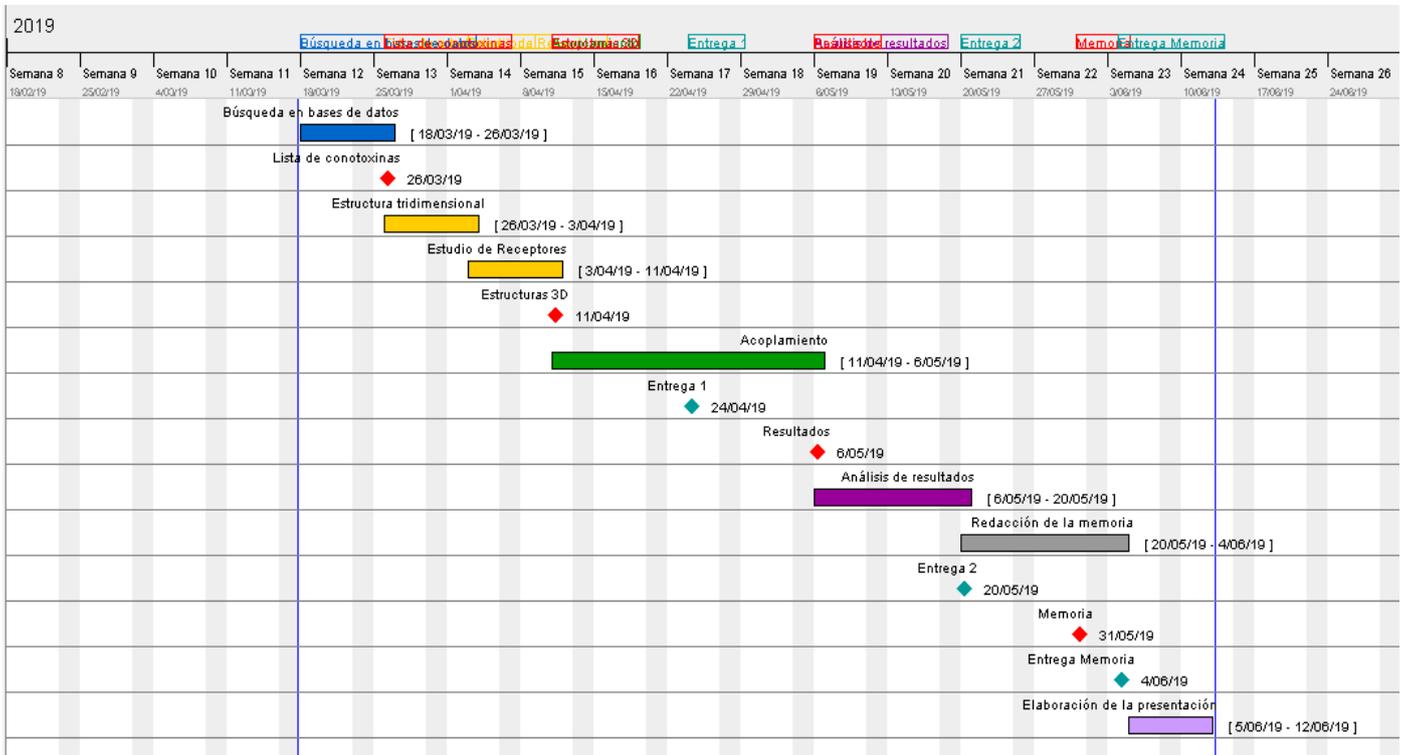


Figura 3: Calendario de la planificación del trabajo.

### **1.5 Breve resumen de productos obtenidos**

El principal resultado de este trabajo consiste en una memoria donde se proponen unos modelos tridimensionales para estas conotoxinas y se caracterizan estructuralmente, para posteriormente mostrar cómo se unen a distintos receptores de *Mycobacterium tuberculosis* planteando un posible mecanismo de acción.

Además de la memoria se obtiene la presentación donde se sintetiza los principales aspectos del trabajo para su exposición y defensa.

### **1.6 Breve descripción de los otros capítulos de la memoria**

- **Materiales y métodos:** En este capítulo se han descrito los métodos empleados para la realización de las diferentes partes del trabajo.
- **Selección de conotoxinas y caracterización:** A partir de las conotoxinas seleccionadas tras la revisión bibliográfica se describen las características de las conotoxinas a partir de sus secuencias.
- **Obtención de los modelos tridimensionales:** Se presentan los modelos tridimensionales obtenidos y sus características principales a través de la comparación entre los modelos.
- **Selección de receptores y estructuras tridimensionales:** En el capítulo se ha determinado las dianas celulares de *Mycobacterium tuberculosis* sobre las que realizar el acoplamiento.
- **Acoplamiento ligando-receptor:** Este capítulo consiste en una breve descripción de las características del acoplamiento y los resultados obtenidos.
- **Análisis:** Se seleccionan los acoplamientos más relevantes y se determinan los aminoácidos implicados en la unión y las conformaciones adoptadas por los péptidos.

## 2. Materiales y métodos.

### 2.1.1 Búsqueda bibliográfica

Para plantear este trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica de los estudios más relevantes de conotoxinas en los últimos años, concretamente aquellos basados en el aspecto experimental y que no hayan caracterizado totalmente los péptidos obtenidos.

Tras la selección de las conotoxinas se ha revisado nuevamente estudios en la búsqueda de las posibles dianas terapéuticas de *Mycobacterium tuberculosis* sobre las que podrían actuar estas conotoxinas, teniendo en cuenta las características de los péptidos antibacterianos.

La búsqueda de esta bibliografía se ha hecho empleado principalmente la base de datos de **PubMed Central** (PMC) [24] y el motor de búsqueda de **Google Scholar** [25], filtrando los resultados priorizando los obtenidos en los últimos años. También se ha consultado la base de datos especializada en conotoxinas **Conoserver** [26] y publicaciones especializadas en farmacología de origen marino como **Marine Drugs** [27].

### 2.1.2 Análisis de secuencia y modelos tridimensionales

Una vez seleccionadas las conotoxinas se ha realizado un alineamiento entre las secuencias de las conotoxina mediante **BLAST** [28] y **Clustal Omega** [29]. Para determinar las cargas de los péptidos se ha empleado **PEPSTATS** [30].

Posteriormente, y al no disponer de sus estructuras tridimensionales caracterizadas en las bases de datos, se ha procedido a crear los modelos mediante el empleo de **PEP-FOLD** [31,32,33]. La selección de esta herramienta se ha basado en la especificidad de esta herramienta por los péptidos de pequeño tamaño. Para obtener los modelos se ha realizado 200 simulaciones y se ha empleado el generador “ts5”, específico para péptidos de más de 10 aminoácidos.

\* Number of simulations

\* Generator

\* Sort models by

\* Perform MQA

\* MonteCarlo steps:

Figura 4: Parámetros establecidos en PEP-FOLD.

Posteriormente se ha realizado un refinamiento mediante **ModRefiner** [34] para mejorar la calidad de los modelos tridimensionales. Para la evaluación de los modelos se ha empleado el programa **MolProbity** [35], obteniendo el diagrama de Ramachandran.

En el caso de las dianas terapéuticas de *Mycobacterium tuberculosis*, tras la selección se han obtenido las estructuras tridimensionales en la base de datos de **Protein Data Bank (PDB)** [36,37].

### 2.1.3 Acoplamiento ligando-receptor

Para realizar los acoplamientos se ha optado por **HPEPDOCK** [38,39,40,41,42], una herramienta específica en el acoplamiento péptido-proteína flexible y que encajaba con las características del trabajo realizado y el formato de los modelos obtenidos.

**HPEPDOCK Server**  
Blind peptide-protein docking by fast modeling of peptide conformations and global sampling of binding orientations.

[Huang\_Lab] [HPEPDOCK] [Help] [Output example]

**Receptor Input** using **ONE** of the following four options: [help]

- Upload your **pdb** file in **PDB format**:  Ningún arc...eccionado [example]
- OR** provide your **structure** by PDB ID:ChainID:  (Example: 3BFW:A)
- OR** copy and paste your **sequence** below in **FASTA format** (Sample input):
- OR** upload your **sequence** file in **FASTA format**:  Ningún arc...eccionado [example]

**Peptide Input** using **ONE** of the following four options: [help]

- Upload your **pdb** file in **PDB format**:  Ningún arc...eccionado [example]
- OR** provide your **structure** by PDB ID:ChainID:  (Example: 3BFW:B)
- OR** copy and paste your **sequence** below in **FASTA format** (Sample input):
- OR** upload your **sequence** file in **FASTA format**:  Ningún arc...eccionado [example]

**Docking Options:** ▶ [Specify binding site, output, and peptide parameters:](#) (Optional)

Figura 5: Pantalla principal de HPEPDOCK

#### 2.1.4 Visualización y análisis de estructuras.

Para visualizar los modelos tridimensionales se ha trabajado con el programa **Chimera** [43], ya que permite trabajar con varias moléculas y darle el formato adecuado para la presentación, además de poder realizar las superposiciones y acoplamientos entre los diferentes modelos.

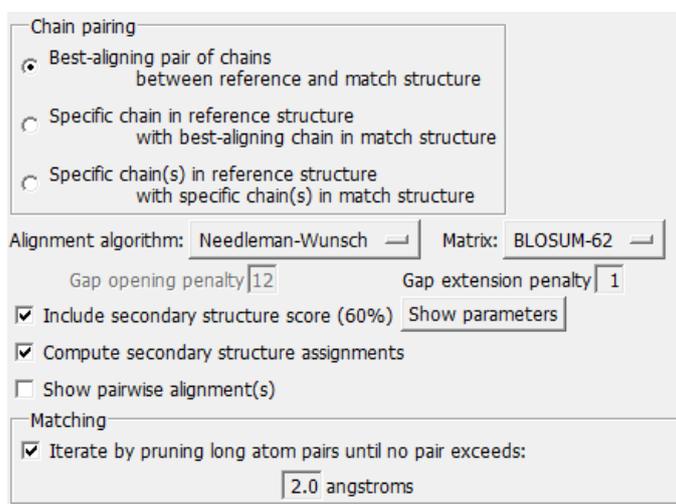


Figura 6: Parámetros de Chimera para el alineamiento.

En el análisis de los acoplamientos se ha empleado el programa **Discovery Studio** [44], que permite una mejor visualización de las interacciones entre el acoplamiento y el receptor.

### 3. Resultados

#### 3.1 Selección de conotoxinas y secuencia.

En el estudio de las conotoxinas procedentes de *Californiconus californicus* se ha descubierto un nuevo péptido, denominado actualmente **cal29b** [19], que se caracteriza por presentar una acción antimicobacteriana.

Además, en el mismo estudio se detalla que existe una conotoxina con una secuencia peptídica similar, la conotoxina **cal29a** [19][45], pero que a diferencia de la primera no posee actividad antibacteriana. El único cambio en ambas secuencias se encuentra en los residuos situados en la posición 20 y 21, Lisina y Ácido Aspártico, que varía en cada conotoxina. Esta diferencia parece ser significativa en su actividad farmacológica por lo que la caracterización estructural de estas conotoxinas podría ser de utilidad para tratar de determinar la relación estructura-actividad.

En la búsqueda de más información sobre esta posibilidad terapéutica en conotoxinas se ha encontrado otra conotoxina con similar actividad farmacológica denominada **xm11a** [46], obtenida a partir de *Conasprella ximenes*. Al igual que las anteriores se desconocen sus posibles dianas terapéuticas.

Estos tres péptidos poseen unas características que permiten su estudio mediante la comparativa entre sus estructuras y su diferente actividad farmacológica.

Tabla 4: Resumen de las secuencias de las conotoxinas seleccionadas.

Conotoxina	Secuencia	Número de residuos	Actividad sobre Micobacterias
<b>cal29b</b>	RPKCCCVCGVVGRKCCSTW <b>KD</b> CHPVHLPCSSG	33	Si
<b>cal29a</b>	RPKCCCVCGVVGRKCCSTW <b>DK</b> CHPVHLPCSS	32	No
<b>xm11a</b>	GRCRGFREDCSQHRDCCGDLCCNGNTCVITVIACPKW	37	Si

Los péptidos antibacterianos poseen ciertas características de forma general [47]. Una de ellas es que son péptidos pequeños, con secuencias de entre 12 y 50 aminoácidos. Además, son péptidos de naturaleza catiónica, por lo que se ha calculado la carga total de estos péptidos. Para determinar la carga se ha empleado PEPSTATS.

Tabla 5: Cargas de las conotoxinas.

Conotoxina	Carga
cal29b	+5.0
cal29a	+5.0
xm11a	+1.5

Para analizar las coincidencias entre las conotoxinas se ha realizado alineamiento entre las secuencias. Entre cal29b y cal29a muestra un 94% de identidad entre ambas dada la similitud entre ambas. Si realizamos un alineamiento de las 3 secuencias obtenemos que tanto cal29a como cal29b poseen un 26.30% de identidad con la secuencia de xm11a. Además, se han encontrado regiones relativamente conservadas entre las 3 secuencias.

```

xm11a      GRCRGFREDCSQHRDCCGDLCCNGNTCVITVIACPKW----- 37
cal29a     -----RPKCCVC-----GVVGRKCCSTWKDCHPVHLPSPSSG 33
cal29b     -----RPKCCVC-----GVVGRKCCSTWKDCHPVHLPSPSS- 32
           : .**                *; .* .*

```

Figura 7: Alineamiento de las tres secuencias en CLUSTAL.

Las conotoxinas se caracterizan por los residuos de cisteína que presentan. Además del número de residuos de cisteína, el motivo estructural que forman estas conotoxinas es un aspecto relevante para la estructura de estos péptidos, ya que en estas regiones se encuentran altamente conservadas para conotoxinas de una misma familia [48]. Por tanto, el patrón de cisteínas puede indicarnos ciertas características estructurales propias para cada grupo de conotoxinas.

Esto ha hecho que se haya establecido una clasificación en función de estos patrones estructurales y del número de cisteínas:

Tabla 6: Clasificación de los patrones de cisteína en la actualidad. Extraída de [26]

Patrón	Estructura	Número de Cisteínas
I	CC-C-C	4
II	CCC-C-C-C	6
III	CC-C-C-CC	6
IV	CC-C-C-C-C	6
V	CC-CC	4
VI/VII	C-C-CC-C-C	6
VIII	C-C-C-C-C-C-C-C-C-C	10
IX	C-C-C-C-C-C	6
X	CC-C.[PO]C	4
XI	C-C-CC-CC-C-C	8
XII	C-C-C-C-CC-C-C	8
XIII	C-C-C-CC-C-C-C	8
XIV	C-C-C-C	4
XV	C-C-CC-C-C-C-C	8
XVI	C-C-CC	4
XVII	C-C-CC-C-CC-C	8
XVIII	C-C-CC-CC	6
XIX	C-C-C-CCC-C-C-C-C	10
XX	C-CC-C-CC-C-C-C-C	10
XXI	CC-C-C-C-CC-C-C-C	10
XXII	C-C-C-C-C-C-C-C	8
XXIII	C-C-C-CC-C	6
XXIV	C-CC-C	4
XXV	C-C-C-C-CC	6
XXVI	C-C-C-C-CC-CC	8
XXVII	C-CC-C-C-C	6
XXVIII	C-CC-C-CC-C-C-C-C	10
XXIX	CCC-C-CC-C-C	8

Además de la clasificación en función de estos patrones estructurales se ha establecido una clasificación en superfamilias [26]. Esta clasificación se basa en las secuencias precursoras génicas para las conotoxinas y actualmente distingue 28 superfamilias distintas.

*Tabla 7: Clasificación de superfamilias y el número de precursores que contienen actualmente. Extraída de [26]*

<b>Superfamilia</b>	<b>Precursores de proteínas</b>
<b>A</b>	288
<b>B1</b>	18
<b>B2</b>	21
<b>B3</b>	1
<b>C</b>	4
<b>D</b>	114
<b>E</b>	1
<b>F</b>	3
<b>G</b>	1
<b>H</b>	10
<b>I1</b>	26
<b>I2</b>	66
<b>I3</b>	10
<b>J</b>	32
<b>K</b>	4
<b>L</b>	15
<b>M</b>	448
<b>N</b>	3
<b>O1</b>	605
<b>O2</b>	140
<b>O3</b>	43
<b>P</b>	12
<b>Q</b>	22
<b>R</b>	1
<b>S</b>	21
<b>T</b>	239
<b>V</b>	2
<b>Y</b>	1

Los estudios muestran que tanto cal29a como cal29b actualmente se clasifican dentro de la superfamilia O1, la más amplia hasta la fecha [26]. La conotoxina xm11a se sitúa en la superfamilia I1.

En cuanto a los patrones estructurales tanto cal29a como cal29b comparten el mismo patrón. Este patrón no dispone de referencias estructurales ya que los únicos representantes actualmente son estas 2 conotoxinas y se ha clasificado como XXIX.

En el caso de xm11a el patrón estructural es el XI, que está ampliamente estudiado [49] y consta de una estructura referencia procedente de la conotoxina RXIA [50]. Este tipo de patrón estructural suele tener actividad sobre los canales iónicos de sodio.

*Tabla 8: Patrones de cisteína en las conotoxinas seleccionadas.*

<b>Conotoxina</b>	<b>Residuos de cisteína</b>	<b>Patrón</b>	<b>Superfamilia</b>
Cal29b	CCC-C-CC-C-C	XXIX	O1
Cal29a	CCC-C-CC-C-C	XXIX	O1
xm11a	C-C-CC-CC-C-C	XI	I1

## 3.2 Modelos tridimensionales para las conotoxinas.

Aunque no se conoce la estructura tridimensional de estas conotoxinas existen unas características que cumplen la mayoría de los péptidos antibacterianos. Además del tamaño del péptido y su carga, estas moléculas se suelen caracterizar por la presencia de hélices alfa o láminas beta y regiones hidrofóbicas e hidrofílicas [47]. De esta forma tienen carácter anfótero y esto podría facilitar su actividad farmacológica. Estas características se han tenido en cuenta a la hora de estudiar las estructuras.

Para generar los modelos tridimensionales se ha empleado PEP-FOLD ya que no se encuentran publicadas las estructuras de estos péptidos actualmente.

### 3.2.1 Conotoxina cal29b:

Como resultado de las simulaciones se han obtenido 200 estructuras. La selección del modelo se ha basado en la clasificación proporcionada por la herramienta de los modelos seleccionando las estructuras de menor energía.

En este caso se ha seleccionado el primer modelo obtenido en PEP-FOLD.

*Tabla 9: Parámetros para el modelo de cal29b en PEP-FOLD.*

sOPEP	avg	gdt	max	q	tm
-55.6771	0.426	0.551	0.463	0.355	0.335

A este modelo se ha aplicado un refinamiento mediante ModRefiner para mejorar su calidad. El modelo obtenido finalmente es el siguiente, donde se han coloreado los residuos de cisteína para facilitar su visualización.

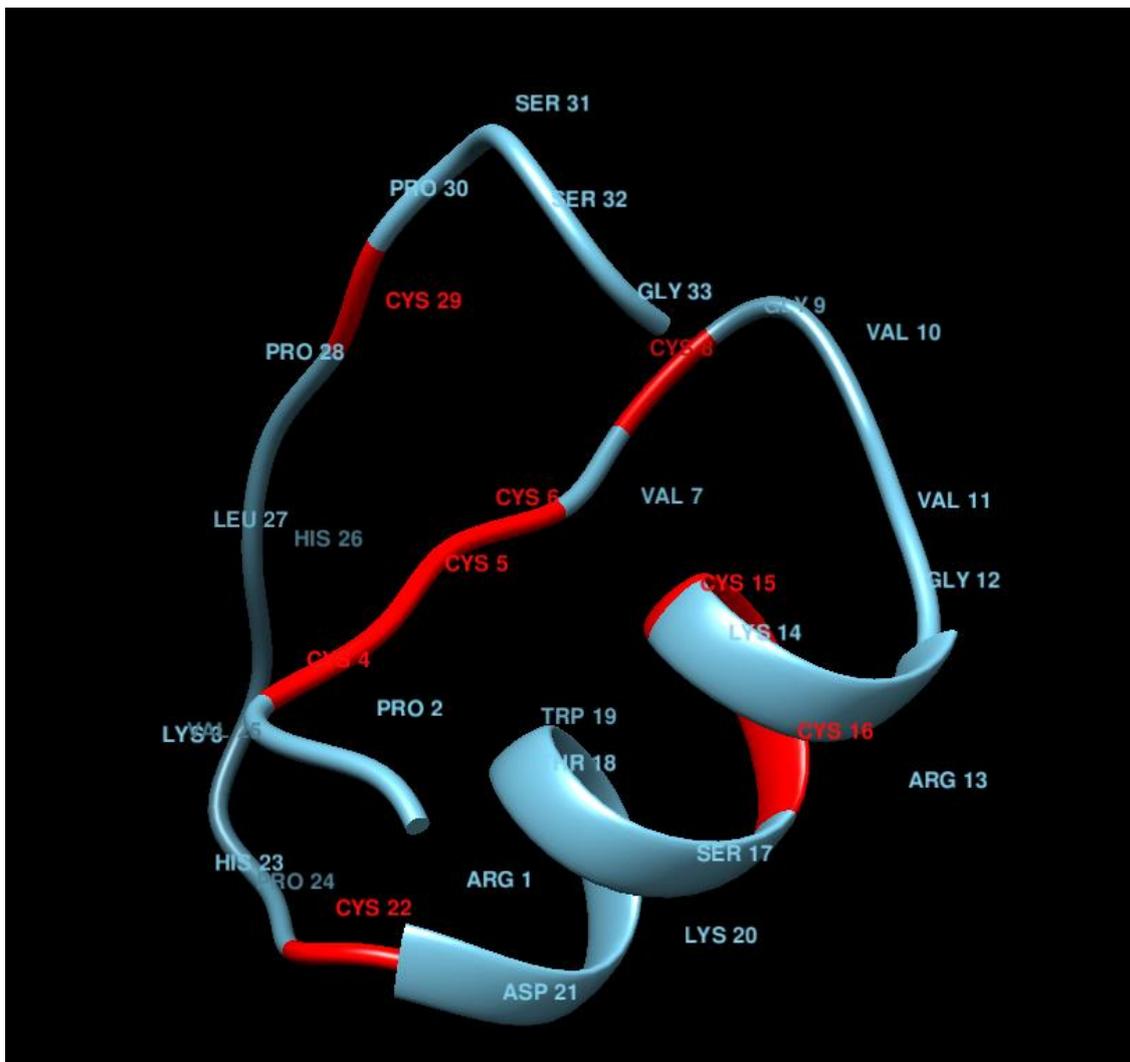


Figura 8: Modelo generado para cal29b

Tras este refinamiento se ha validado mediante un diagrama de Ramachandran, comprobando la mejora esperada en el modelo:

Residuos favorecidos	30	93.30 %
Residuos permitidos	1	3.35 %
Residuos no permitidos	0	3.35 %

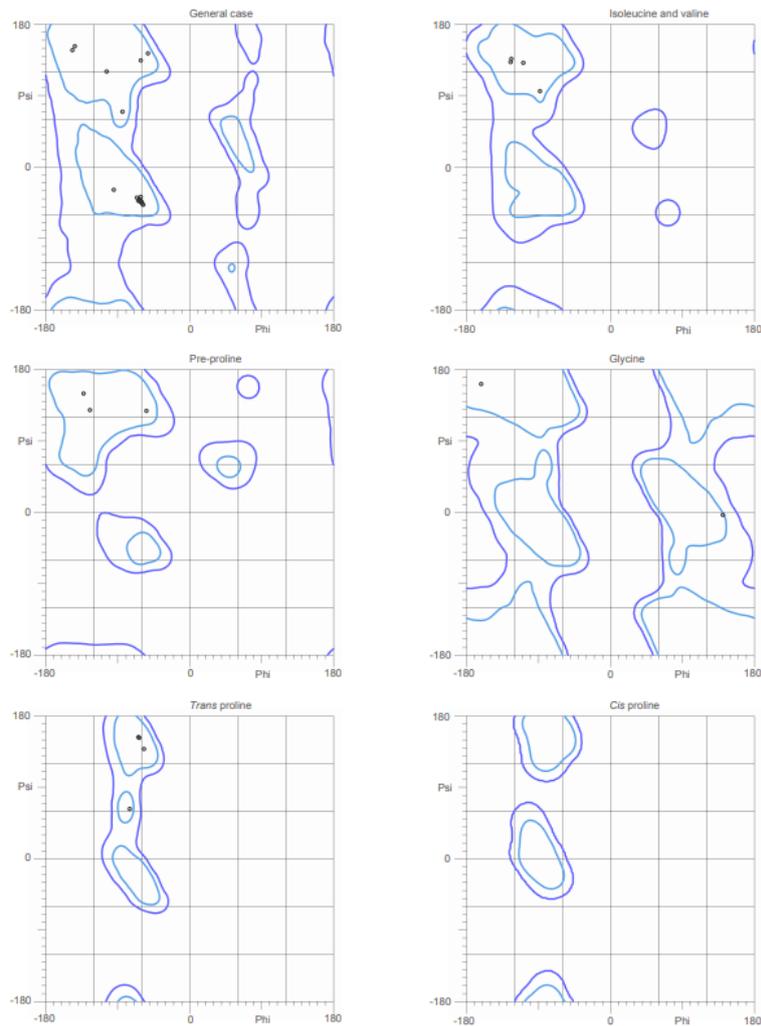


Figura 9: Diagrama de Ramachandran para cal29b

Al visualizar los diferentes modelos generados por PEP-FOLD se puede comprobar como en todos se encuentra una hélice alfa situada en el centro de la estructura, compuesta por los residuos situados entre la cisteína en la posición 15 y la cisteína situada en la posición 22. Esta característica estructural podría ser interpretada como propia del patrón estructural de cisteínas XXIX.

Estos residuos se sitúan hacia el interior de la estructura, creando enlaces que encierran la parte central del péptido y creando una zona hidrófoba. Además, se puede ver como también están distribuidas las zonas hidrófilas e hidrófobas en la molécula, coincidiendo con las características generales para péptidos antibacterianos.

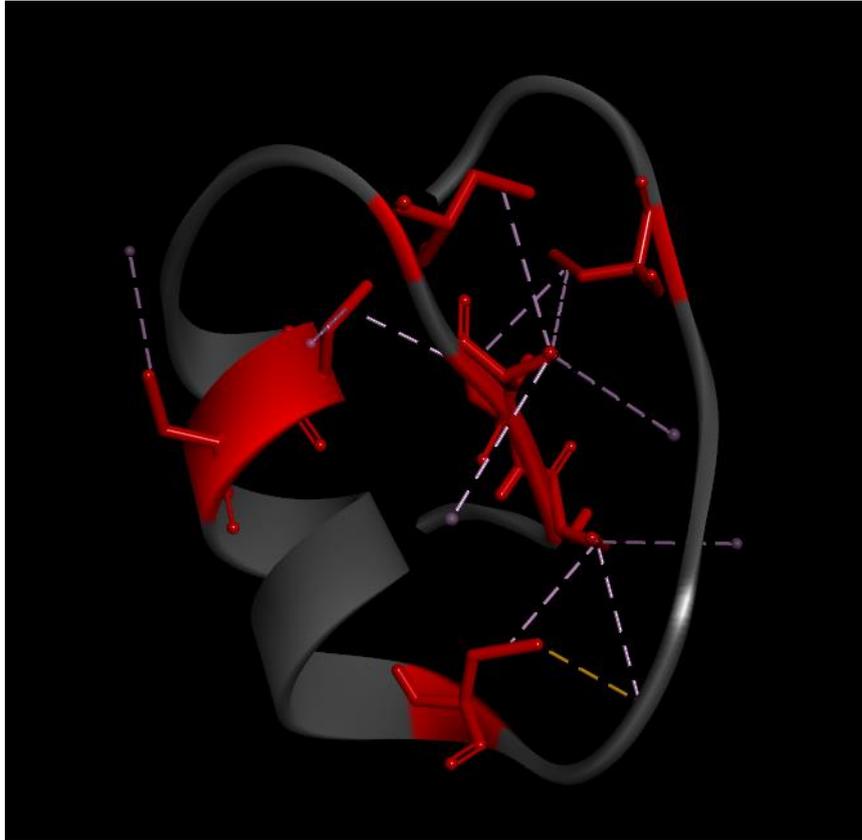


Figura 10: Disposición de las cisteínas y sus interacciones intramoleculares

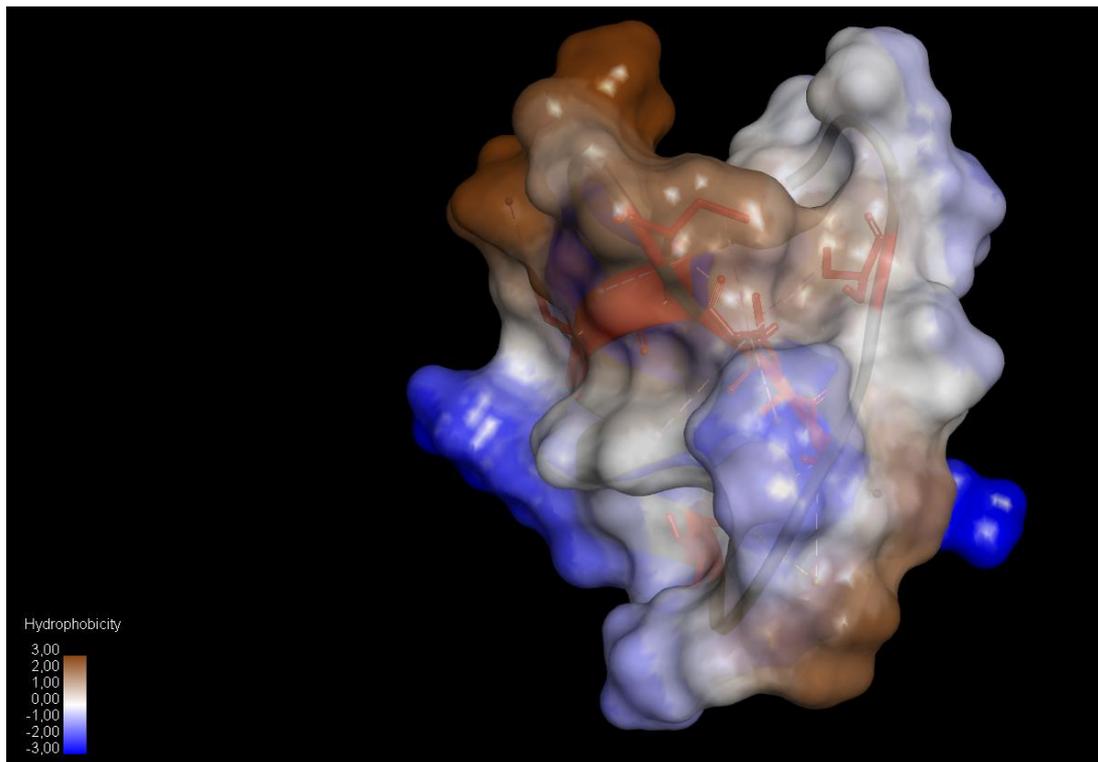


Figura 11: Regiones de hidrofobicidad del modelo.

### 3.2.2 Conotoxina cal29a:

De forma similar a la anterior se ha seleccionado el modelo obtenido. En este caso el modelo seleccionado es el 3, ya que es el que mejor cumple el patrón previsto con la hélice alfa en la zona central y la diferencia en la energía es mínima respecto a la de los modelos 1 y 2.

Tabla 10: Parámetros obtenidos para cal29a en PEP-FOLD

sOPEP	avg	gdt	max	q	tm
-52.4294	0.375	0.504	0.398	0.321	0.276

Tras el refinamiento se obtiene el modelo tridimensional final:

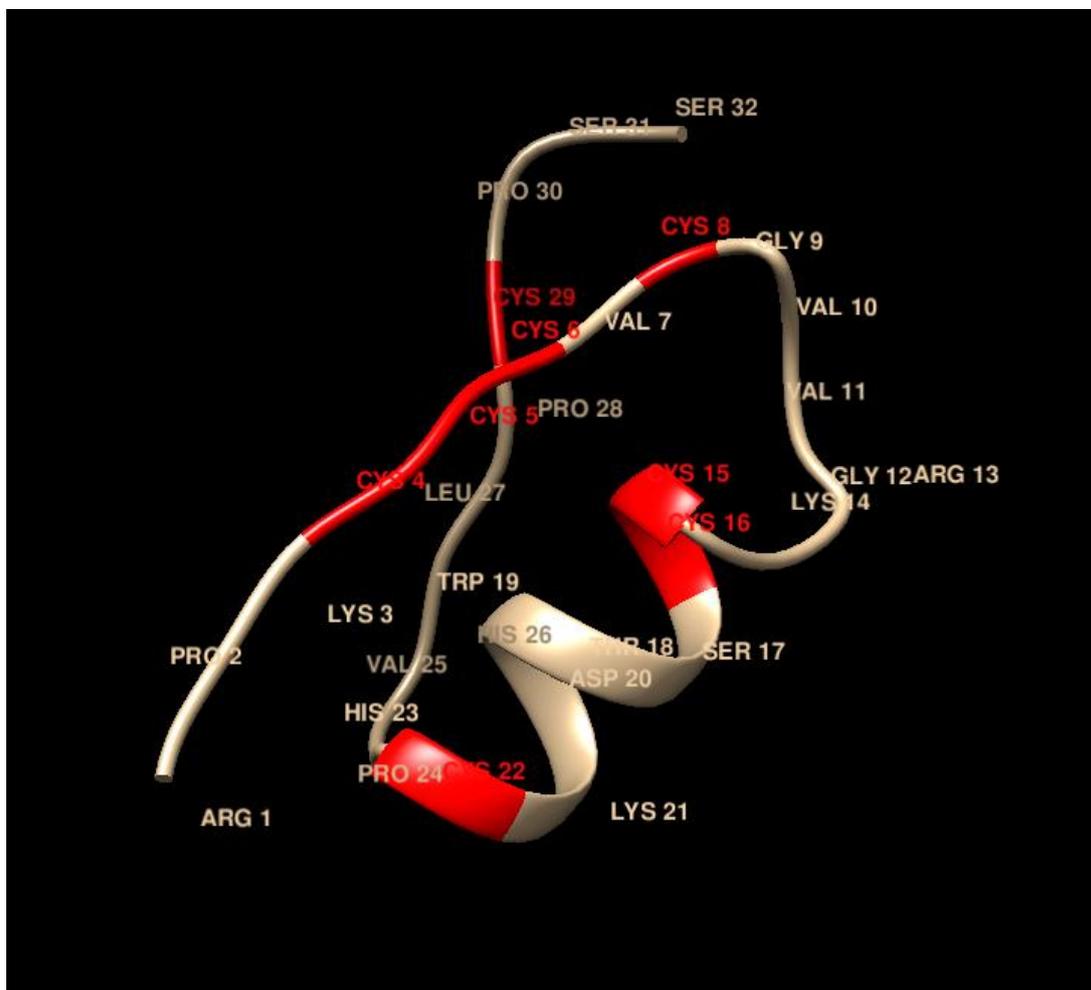


Figura 12: Modelo generado para cal29a.

Al validar el modelo obtenemos los siguientes resultados:

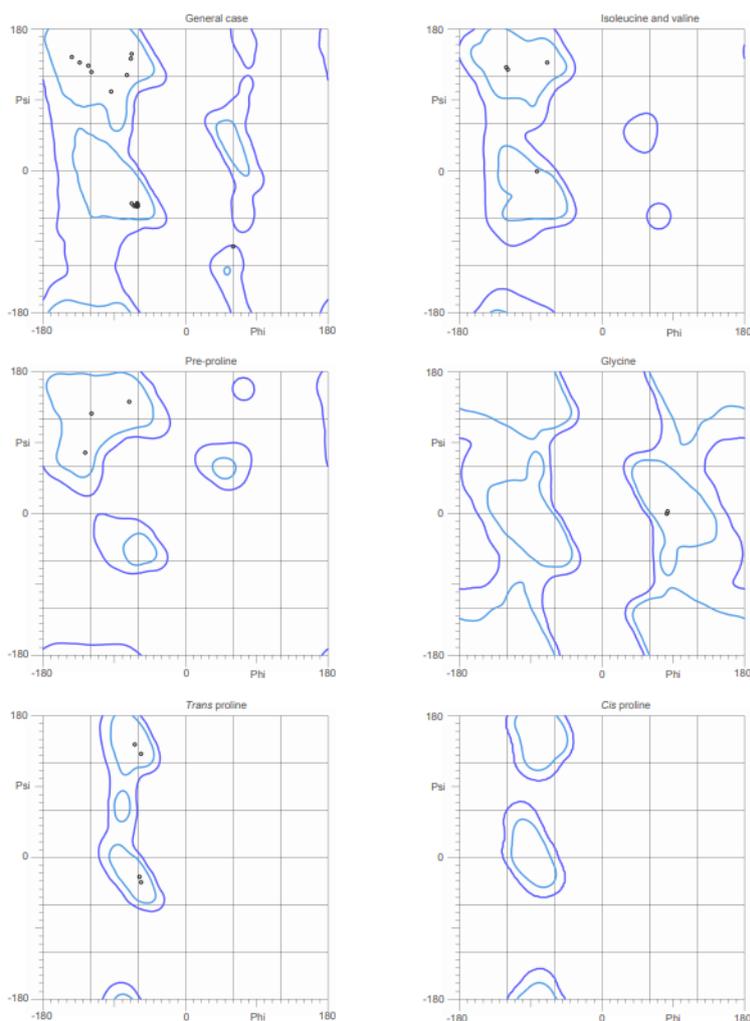


Figura 13: Diagrama de Ramachandran para cal29a

Residuos favorecidos	29	96.67 %
Residuos permitidos	1	3.33 %
Residuos no permitidos	0	0.00 %

En el caso de esta conotoxina se puede comprobar como se mantiene la hélice alfa obtenida en el modelo de cal29b, que podría formar parte del patrón estructural XXIX viendo los resultados para ambas conotoxinas. La hélice en este caso va desde la lisina en la posición 13 hasta el aspartato 21. Además, las cadenas laterales a la hélice adoptan una conformación similar a la de cal29b.

Al analizar las cisteínas se comprueba como se sitúan principalmente hacia el interior del péptido interactuando e igual que en la conotoxina anterior esto favorecerá las zonas hidrofóbicas en esa región y las hidrófilas en el resto.

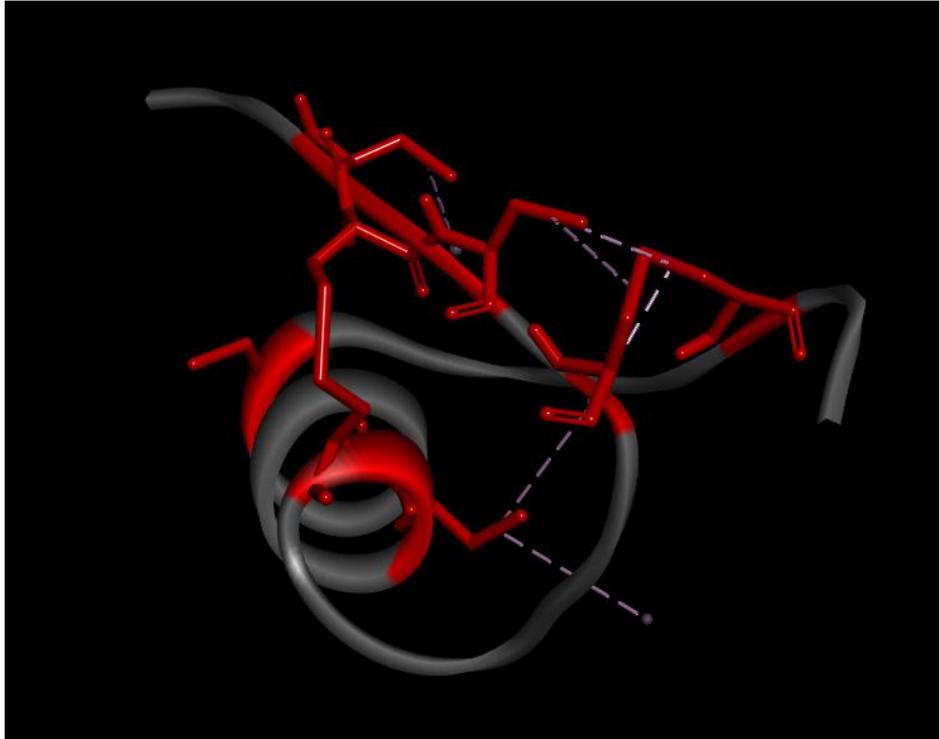


Figura 14: Disposición de las cisteínas y sus interacciones intramoleculares-

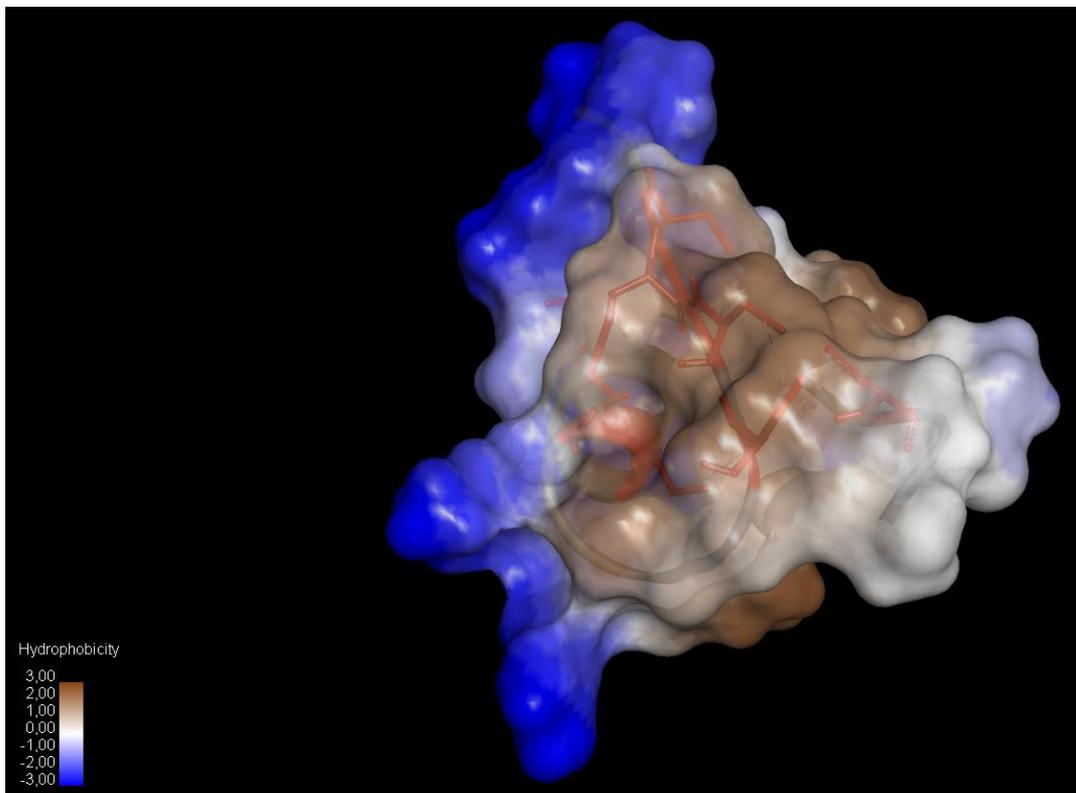


Figura 15: Regiones de hidrofobicidad para el modelo.



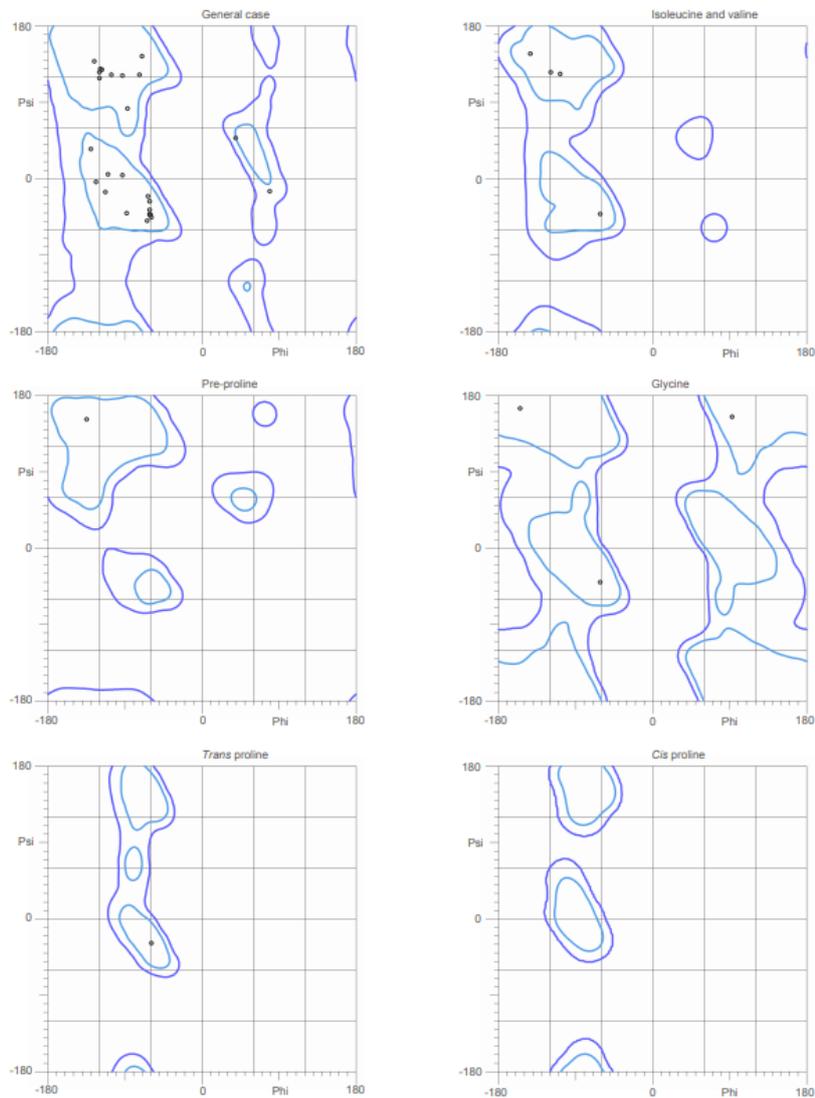


Figura 17: Diagrama de Ramachandran para xm11a.

La estructura para este modelo es muy diferente a la de las conotoxinas anteriores, siendo lo esperado debido a las diferencias en la secuencia peptídica y en el patrón de cisteínas. En este caso también se ha encontrado una hélice en el centro de la estructura, más corta que las vistas anteriormente.

Esta conotoxina pertenece a la misma familia que la conotoxina RXIA y comparte patrón de cisteína, por lo que se puede comparar con esta estructura de referencia para ver las coincidencias entre ambas.

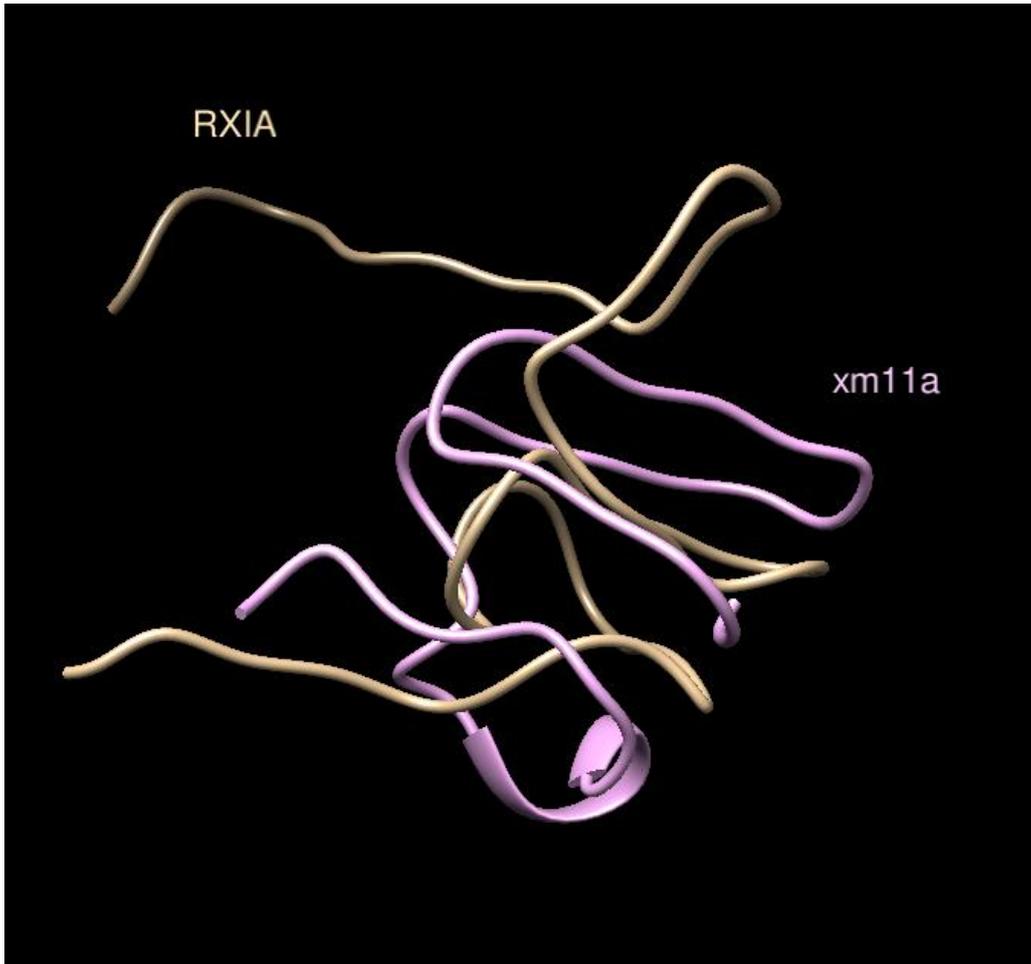


Figura 18: Superposición de RXIA y xm11a

RMSD: ca	1	11	21	31	41	51	61	
2p4l.pdb, chain A	1	G P S F C K A D E	K P C E Y H A	D C C N C L S C I C A P	S T N W I L P G C	S T S S F F K I		46
xm11a_ref.pdb	1	G R C R G F R E D C S	Q H R D C C G D L C C N C G N T C	V I T			V I	37

Figura 19: Alineamiento de RXIA y xm11a

Analizando el alineamiento se puede observar como existen zonas conservadas entre ambas estructuras, especialmente las pertenecientes al patrón de cisteínas indicando que el modelo generado respeta la composición estructural de este patrón

Si se analizan los residuos de cisteína se puede ver como se sitúan hacia el interior de la estructura, creando una distribución de las zonas hidrófobas e hidrófilas.

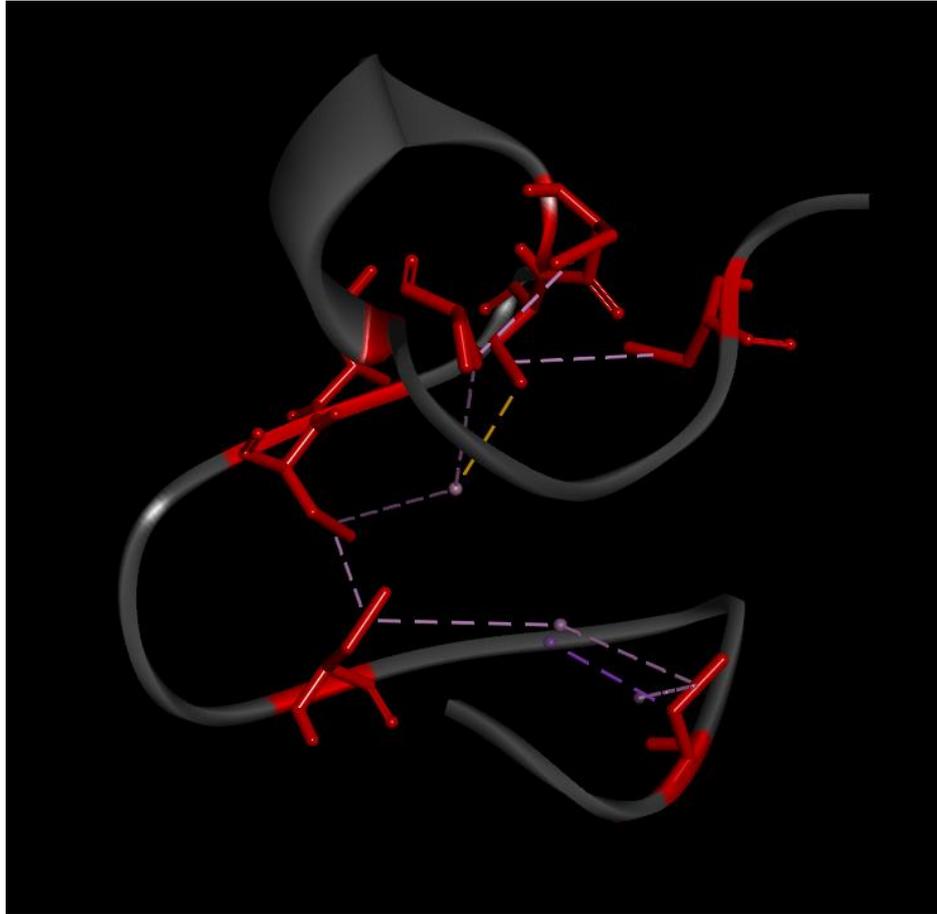


Figura 20: Disposición de las cisteínas y sus interacciones intramoleculares.

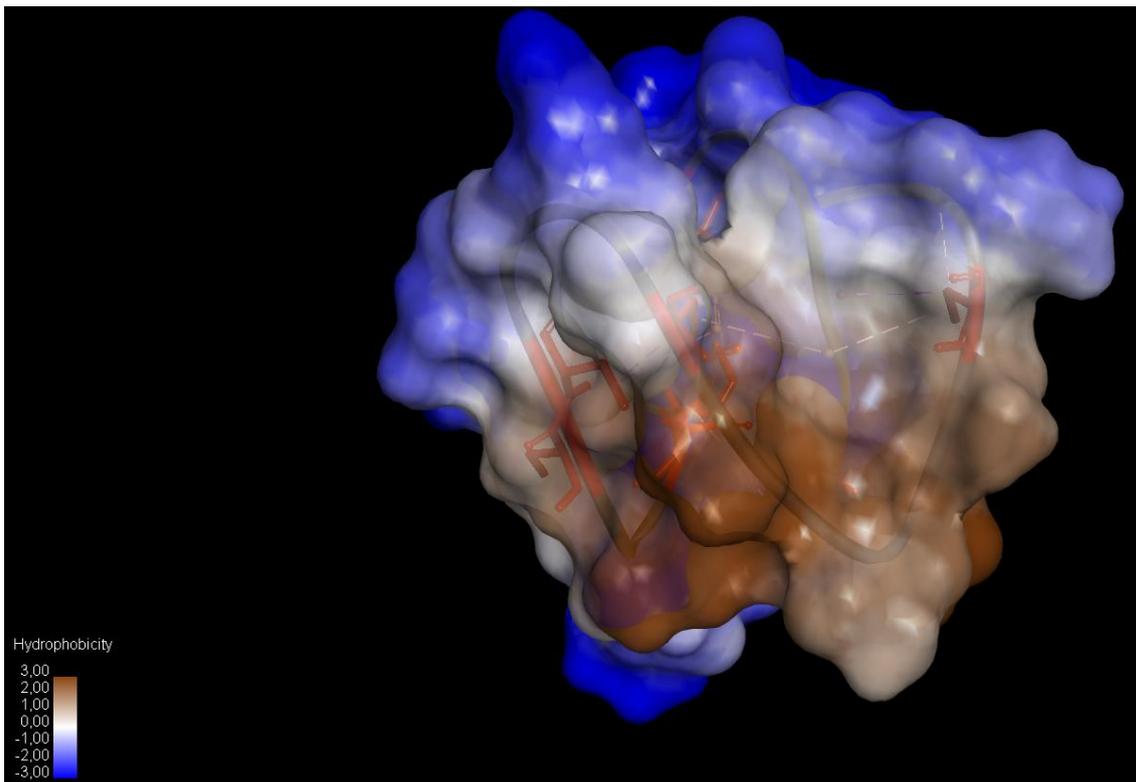


Figura 21: Regiones de hidrofobicidad para el modelo.

### 3.2.4 Alineamientos:

Como parte de la caracterización estructural se han realizado alineamientos en las secuencias peptídicas para destacar las diferencias y similitudes en las estructuras obtenidas.

#### - cal29a y cal29b:

Mediante la superposición de los modelos tridimensionales comprobamos la similitud entre ambas estructuras.

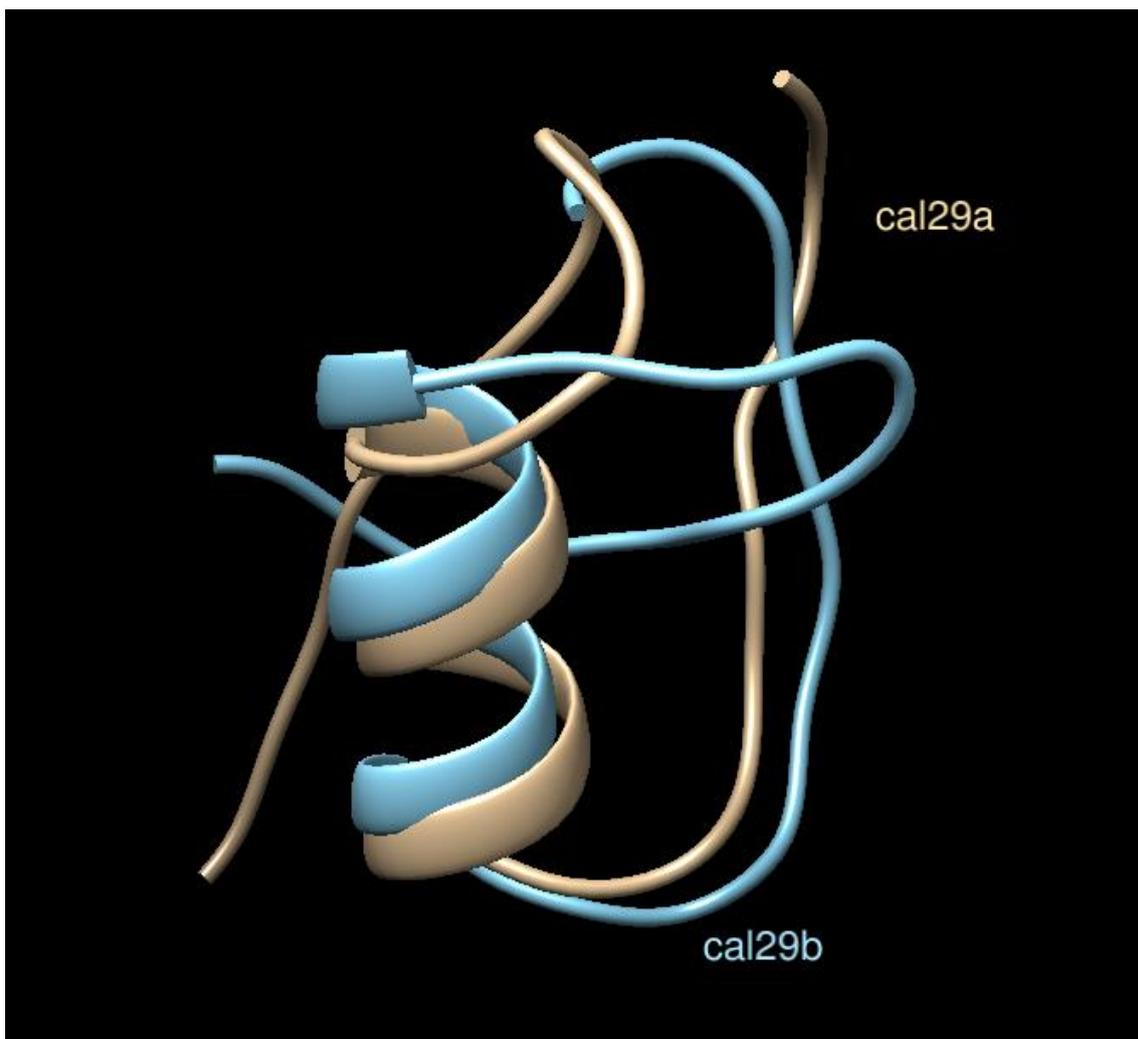


Figura 22: Superposición de cal29a y cal29b

Ambos modelos tienen cierta similitud, destacando la hélice situada en la zona central de la cadena y los giros antes y después de esta estructura. La principal diferencia la encontramos en las estructuras correspondientes al inicio de las secuencias.

Al realizar el alineamiento de las estructuras podemos ver cuáles son las regiones que coinciden entre ambas, siendo destacable la hélice alfa y el final de la secuencia.

RMSD: ca	1	11	21	31	41								
cal29a_ref.pdb	1 RPK...C	CCVC	GV.....	VG	RKCCSTW	KC H..	PVHLP	CP	SS	32			
cal29b_ref.pdb	1 ..R	PK	.....	CCVC	GV	GRKCC	STW	KD	CH	PVHLP	CP	SS	33

Figura 23: Alineamiento de cal29a y cal29b

Como resultado del alineamiento se obtienen los siguientes parámetros:

*RMSD of cal29a\_ref.pdb with cal29b\_ref.pdb: 2.275*

*Overall RMSD: 2.275*

*Sequence lengths: 32 33*

*SDM (cutoff 5.0): 49.592*

*Q-score: 0.318*

Estos resultados indican una correspondencia entre las estructuras, pero las diferencias vistas en los modelos tridimensionales hace que esta no sea total y esto se nota en los valores de RMSD y Q-score.

- **cal29b y xm11a:**

Se ha realizado una comparación entre estas dos conotoxinas ya que ambas poseen actividad antimicrobiana para determinar las posibles similitudes entre ambas, pese a poseer patrones estructurales de cisteína distintos.

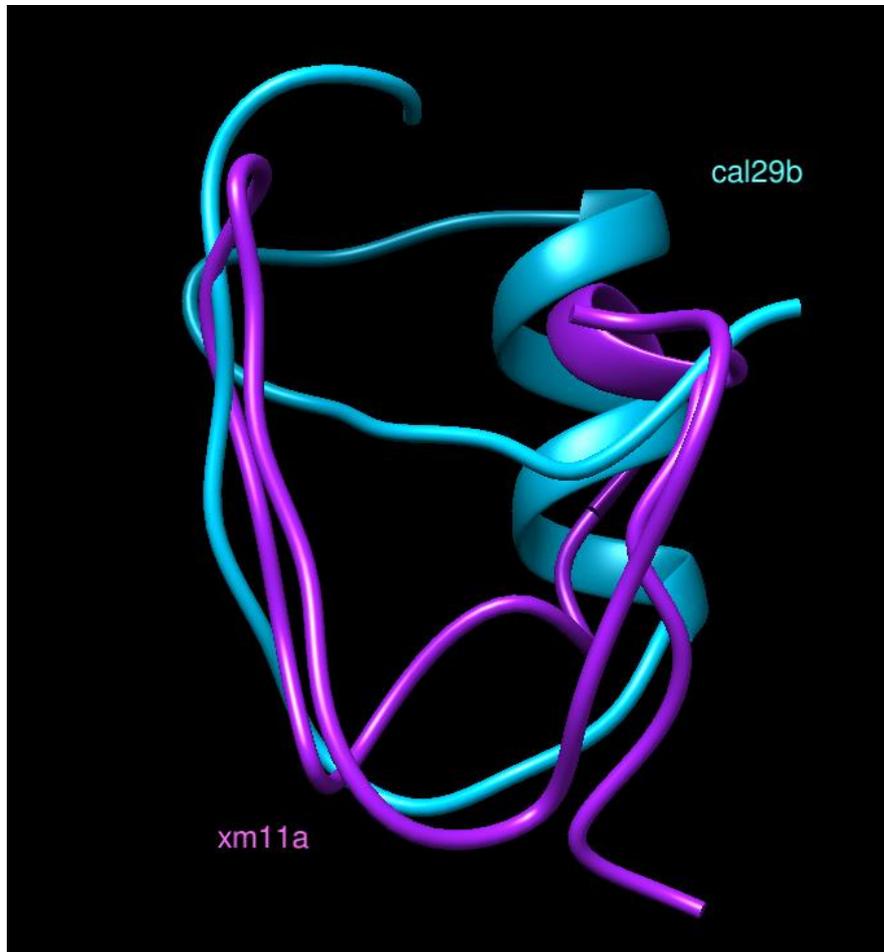


Figura 24: Superposición de xm11a y cal29b.

Si se comparan las 2 estructuras se ven diferencias en el inicio y el final de la secuencia de ambas, aunque encontramos una coincidencia entre las regiones con hélice alfa y una disposición tridimensional relativamente coincidente que se ha visto con la disposición de los enlaces intramoleculares de cisteína anteriormente.

RMSD: ca	1	11	21	31	41	51									
xml1a_ref.pdb	1 GRCRGF	RE	D	CSQH	RD	CC	GD	LCCNG	NTC	VIT	VIAC	PKW	...	37	
cal29b_ref.pdb	1	RP	KC	CCVCG	VVGR	K	CC	STWK	D	CH	PVHL	PCP	...	SSG	33

Figura 25: Alineamiento de xm11a y cal29b.

En el alineamiento vemos como hay ciertas zonas que coinciden, concretamente las zonas centrales de ambos péptidos, correspondiente con la región de hélice alfa. Sin embargo la disposición tridimensional de las cadenas laterales a la hélice no se ajusta demasiado entre los dos modelos.

RMSD of xml1a\_ref.pdb with cal29b\_ref.pdb: 2.563  
Overall RMSD: 2.563  
Sequence lengths: 37 33  
SDM (cutoff 5.0): 69.070  
Q-score: 0.13

Estos parámetros indican una baja correspondencia global entre los modelos, siendo lo esperado según los patrones de cisteína de ambos modelos, aunque las conformaciones tridimensionales y la disposición de la hélice alfa tienen similitudes y hacen que el valor RMSD no sea tan elevado.

- **cal29a, cal29b y xm11a:**

Se ha realizado una comparativa entre los tres modelos generados.

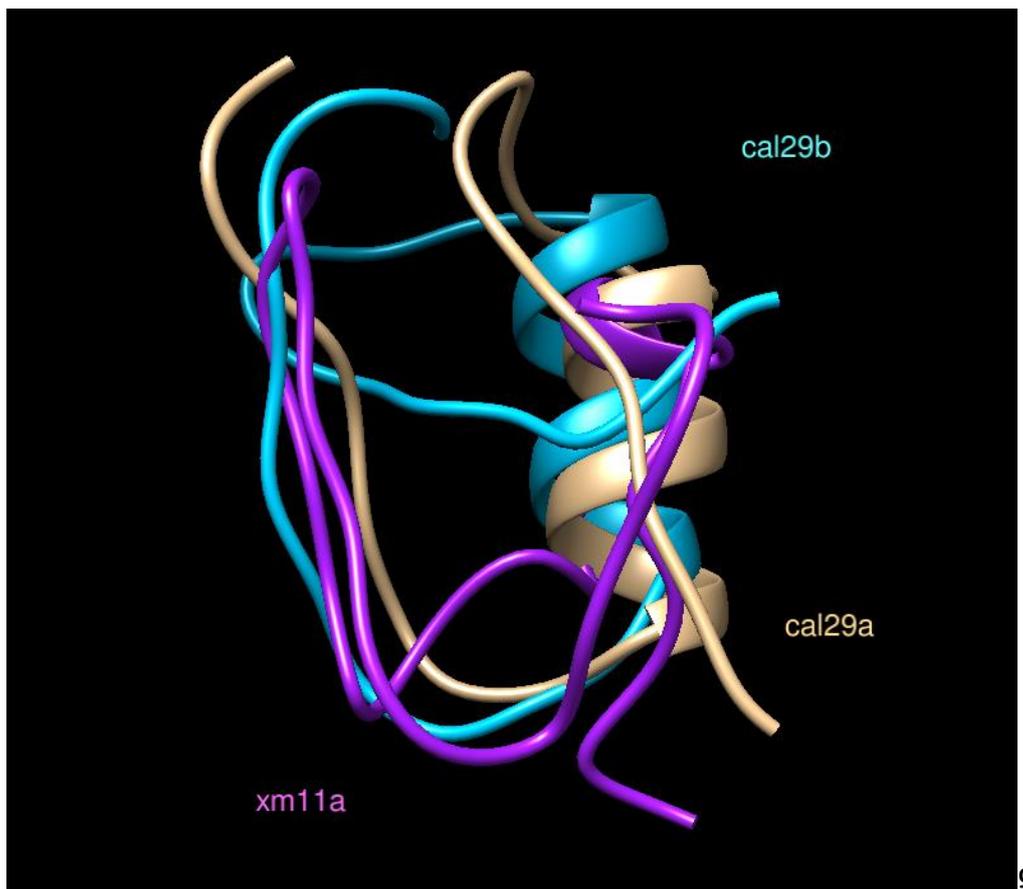


Figura 26: Superposición de los tres modelos.



### 3.3 Selección de receptores y estructura tridimensional.

Una de las principales características de *Mycobacterium Tuberculosis* es una compleja membrana, con una pared celular gruesa y una pared celular con alto contenido en lípidos, confiriéndole un carácter hidrófobo que dificulta la entrada de moléculas antibióticas. Los péptidos antibacterianos poseen unas características que podrían ser de utilidad para este paso, ya que su carga positiva y carácter anfótero les facilitaría la entrada en el interior celular.

Uno de los pasos clave en los estudios para el descubrimiento de nuevos fármacos es la selección de posibles dianas terapéuticas. Debido a las características de los péptidos antibacterianos estos podrían actuar sobre la misma membrana o atravesarla hacia el interior celular, interaccionando así con los mecanismos celulares de la bacteria y pudiendo alterar su función produciendo finalmente la acción bactericida [47].

Por tanto, en la selección de dianas se han englobado varios procesos biológicos de la bacteria, seleccionando para ello algunas de las dianas más relevantes según la bibliografía consultada [51,52,53]

- **Transporte de hierro:** Este proceso biológico es vital para cualquier organismo y por ello los mecanismos de transporte y almacenamiento son posibles dianas terapéuticas. En este caso se ha seleccionado la proteína reguladora dependiente de hierro (**IdcR**) [54], cuya disfunción producirá un exceso de hierro y un daño oxidativo en la bacteria.
- **Membrana:** Esta estructura característica en las micobacterias es una de las dianas con mayor interés para el descubrimiento de nuevos fármacos. La proteína **MmpL3** [55] ha mostrado ser vital para el crecimiento de las micobacterias, por lo que ha sido seleccionada como diana terapéutica. También se ha seleccionado la proteína **MscL** [56], que pertenece a los canales mecanosensitivos y se ocupa de regular la presión osmótica de la célula. Múltiples estudios la destacan como una posible diana terapéutica para péptidos antibacterianos. Además, se ha seleccionado la proteína **OmpA** [57], cuya función es la de formar poros en la membrana, y **PknB** [58], que controla la síntesis de peptidoglicanos en la formación de la membrana.

- **Proteasas:** Este grupo de proteínas tienen una función clave para estas bacterias y ya son dianas terapéuticas para la lasomicina, otro antibiótico peptídico. Concretamente se han seleccionado la proteasa **ClpP1** [59], esencial para el crecimiento, y **ClpC1** [60], su subunidad con función ATPasa.
- **Metabolismo celular:** La modulación de los diferentes procesos de metabolismo celular una vez entra el péptido en la bacteria hace que sea necesario seleccionar diversas posibles dianas terapéuticas relacionadas, en función de los últimos estudios publicados [51,52,53].
- **Respiración celular:** La importancia de este proceso hace que sea una posible diana terapéutica para estos péptidos. En este caso se ha seleccionado la proteína **NdhII** [61], con función oxidasa y que ya es diana terapéutica de otros antibióticos; la subunidad b del citocromo bc1-aa3 (**QcrB**) [62] y la oxidorreductasa, **DprE1** [63], estudiadas recientemente como posibles dianas por su importancia funcional.

Para obtener las estructuras tridimensionales se ha empleado la base de datos de Protein Data Bank (PDB). Aunque en algunos estudios ya se incluía el código PDB correspondiente a las dianas, en otros solamente se incluía el nombre del gen que las codifica o el nombre de la enzima, por lo que se han filtrado los resultados empleando las herramientas de búsqueda avanzada de la base de datos para obtener los correspondientes a la bacteria *Mycobacterium Tuberculosis*.

En la siguiente tabla se resume las dianas terapéuticas seleccionadas, incluyendo su función biológica, el nombre del gen que codifica las proteínas y el código PDB correspondiente a la estructura tridimensional en la base de datos:

Tabla 12: Lista de dianas terapéuticas seleccionadas.

Proceso biológico	Gen	Descripción	PDB
<b>Transporte de Hierro</b>	IdeR	Iron-dependent regulator protein	<a href="#">2ISY</a>
<b>Membrana</b>	mmpL3	Mycobacterial membrane protein large	<a href="#">6N40</a>
	MscI	Mechanosensitive channel of large conductance	<a href="#">2OAR</a>
	OmpA	outer membrane protein A	<a href="#">2L26</a>
	PknB	phosphorylated pseudokinase-FHA	<a href="#">3OTV</a>
<b>Proteasas</b>	ClpP1	Cutinase-like proteins	<a href="#">5DZK</a>
	ClpC1	Cutinase-like proteins ATPase	<a href="#">3WDB</a>
<b>Metabolismo</b>	ICL	Isocitrate lyase	<a href="#">1F8M</a>
	GlcB	Malate Synthase	<a href="#">5H8P</a>
	PEPCK	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	<a href="#">4R43</a>
	Lpd	Lipoamide dehydrogenase	<a href="#">4M52</a>
	GlgE	Maltosyltransferase	<a href="#">4U33</a>
	panC	Pantothenate Synthetase	<a href="#">2A88</a>
	panB	Hydroxymethyltransferase	<a href="#">1OY0</a>
	aroC	Chorismate Synthase	<a href="#">1ZTB</a>
	nrdF2	Ribonucleotide Reductase	<a href="#">1UZR</a>
	tmk	Thymidine Kinase	<a href="#">1G3U</a>
<b>Cadena respiratoria</b>	NdhII	Menaquinone oxidoreductase	<a href="#">5ERY</a>
	QcrB	Cytochrome bc1-aa3	<a href="#">6HWH</a>
	DprE1	oxidoreductase	<a href="#">4FDP</a>

### 3.4 Acoplamiento conotoxina-receptor.

En esta fase del trabajo se procede a la realización de los acoplamientos entre los ligandos (las conotoxinas) y los receptores seleccionados. Debido a las características del acoplamiento a realizar, entre un péptido y una proteína, y al tamaño de ambas estructuras se ha seleccionado la herramienta **HPEPDOCK Server**.

Esta herramienta realiza un acoplamiento flexible, teniendo en cuenta las características de los péptidos y las posibles conformaciones que pueden adoptar para unirse al receptor.

Como resultado del acoplamiento se han obtenido los ficheros en formato PDB para ligando y receptor con las conformaciones más estables del acoplamiento, que se han unido posteriormente mediante el programa **Chimera**.

Tabla 13: Resumen de las energías de acoplamiento para los diferentes ligandos y sus receptores.

Receptor	cal29a	cal29b	xm11a
IdeR	-213.759	-201.136	-189.502
mmpL3	-222.173	-236.309	-222.946
MscI	-229.192	-214.204	-222.085
OmpA	-211.096	-202.808	-200.039
PknB	-215.447	-222.995	-231.321
ClpP1	-207.339	-201.360	-204.239
ClpC1	-200.114	-223.965	-217.357
ICL	-272.654	-264.909	-214.326
GlcB	-206.361	-199.556	-198.394
PEPCK	-214.767	-211.810	-198.838
Lpd	-240.273	-201.521	-204.410
GlgE	-217.723	-256.636	-217.220
panC	-218.711	-217.725	-220.285
panB	-251.860	-251.377	-219.210
aroC	-213.942	-215.067	-203.196
nrdF2	-224.232	-210.133	-201.041
tmk	-219.282	-209.088	-206.180
NdhII	-200.438	-199.981	-206.630
QcrB	-241.968	-219.797	-184.835
DprE1	-213.658	-224.934	-225.050

## 3.5 Análisis de resultados.

Debido a las características de estos péptidos se ha optado por realizar un acoplamiento flexible, teniendo en cuenta las conformaciones que pueden adoptar los péptidos en su enlace con las dianas terapéuticas. Estos acoplamientos conotoxina-receptor muestran varias posibles dianas farmacológicas para la conotoxina cal29b y xm11a, aunque los resultados no muestran ninguna diana terapéutica clara.

La diana **GlgE** presenta el mejor resultado para la conotoxina cal29b y significativamente mayor que el de cal29a y xm11a, por lo que se ha seleccionado para estudiarlo ya que podría ser una posible diana terapéutica para este péptido.

También se ha obtenido resultados relevantes para las dianas **ClpC1** y **DprE1**, donde se han obtenido resultados similares para las conotoxinas antimicobacterianas mientras que para cal29a han sido poco relevantes.

### 3.5.1 Acoplamiento cal29b-GlgE (maltosyltransferase):

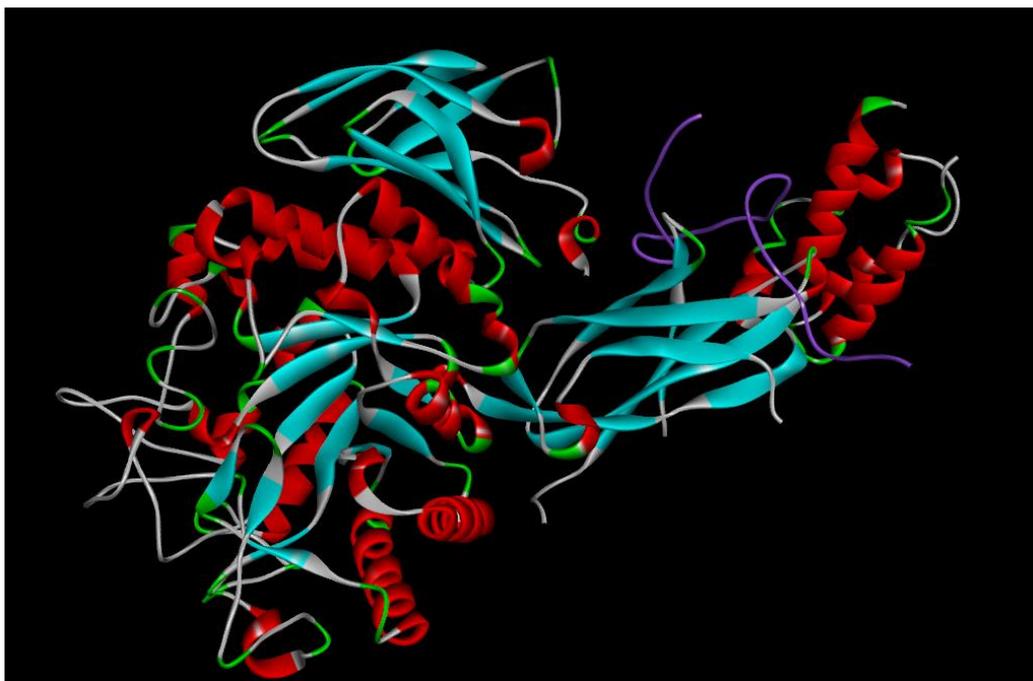


Figura 28: Acoplamiento cal29b-maltosyltransferase

El ligando se sitúa en una de las cavidades del modelo. Se ha analizado el sitio de unión para estudiar el tipo de interacciones:

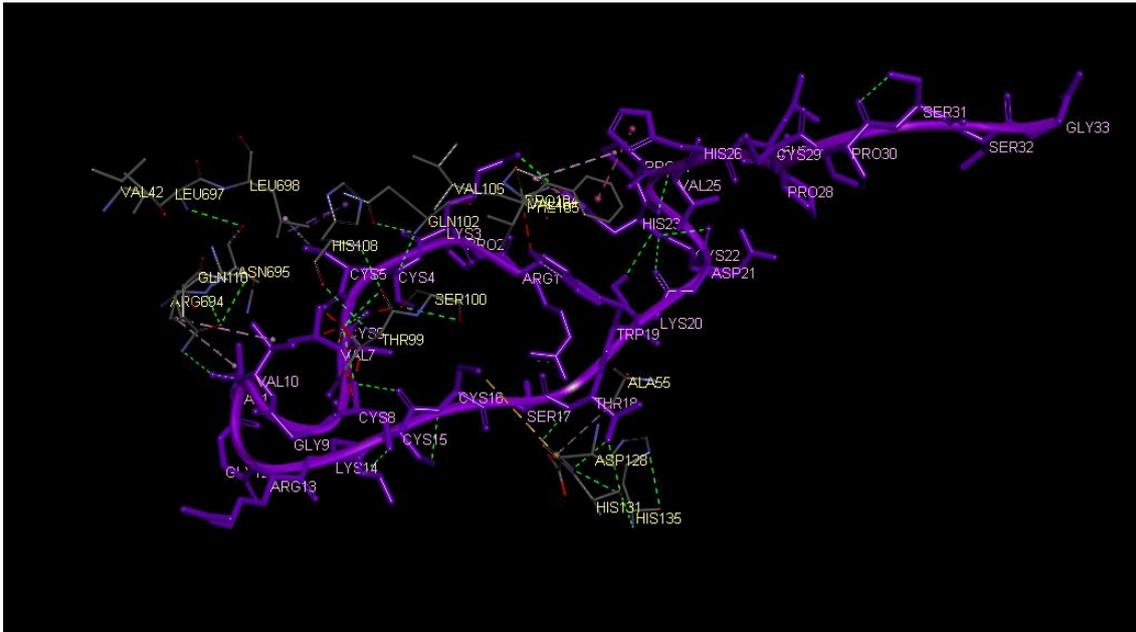


Figura 29: Lugar de unión de cal29b (violeta) -maltosyltransferase

El ligando se une a la proteína mediante los siguientes enlaces entre residuos:

Residuos en ligando	Residuos en receptor
Cisteína 4	Glutamato 102
Cisteína 5	Leucina 698
Cisteína 6	Serina 100
Cisteína 6	Treonina 99
Valina 7	Treonina 99
Cisteína 8	Treonina 99
Valina 10	Glutamato 110
Valina 11	Arginina 694
Cistina 16	Histidina 131
Treonina 18	Histidina 131
Triptófano 19	Fenilalanina 105
Histidina 23	Prolina 104
Histidina 26	Fenilalanina 105

El resultado del acoplamiento indica que cal29b se une a este receptor de forma significativa y podría ser la causa de su actividad antibacteriana, aunque es necesario un mayor estudio sobre este acoplamiento para poder determinar su potencial, ya que actualmente no se disponen de estudios de inhibidores peptídicos para este receptor.

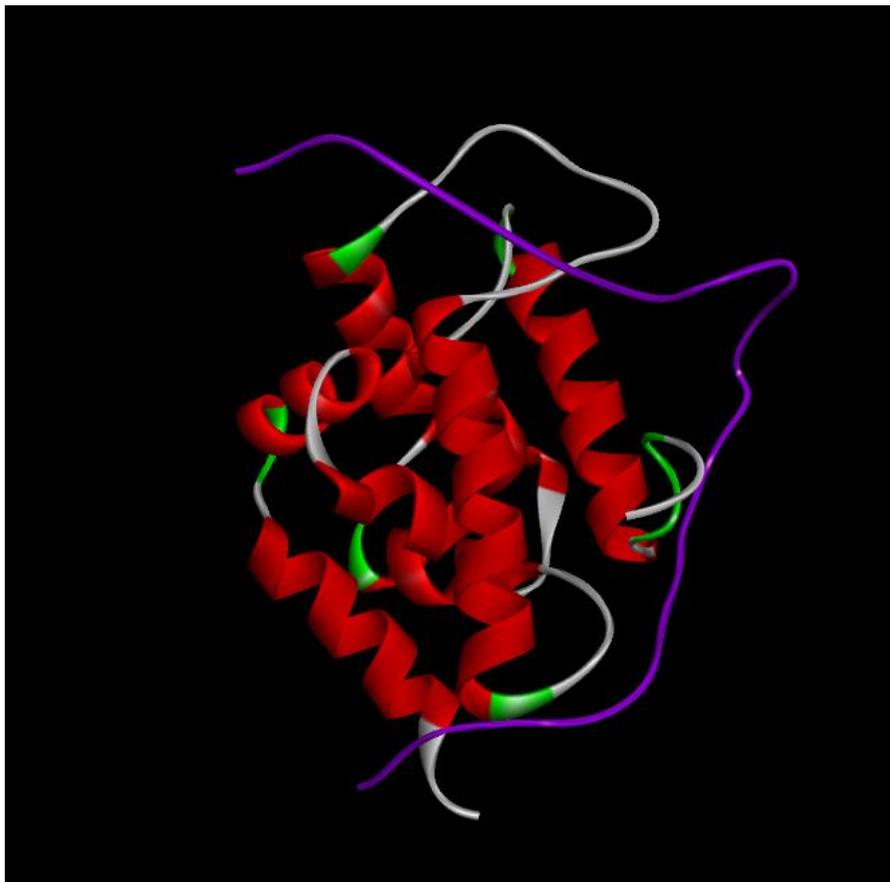
### 3.5.2 Acoplamiento conotoxina-ClpC1 (Cutinase-like proteins ATPase)

Para este caso los resultados son mejores en las conotoxinas antimicobacterianas que en cal29a, por lo que se ha estudiado el acoplamiento en las tres moléculas.

Este receptor es una diana terapéutica para otros fármacos peptídicos como lasomicina, eucumicina y ciclomarina A [66].

#### - **xm11a:**

El acoplamiento obtenido es el siguiente:



*Figura 30: Acoplamiento xm11a-ClpC1*

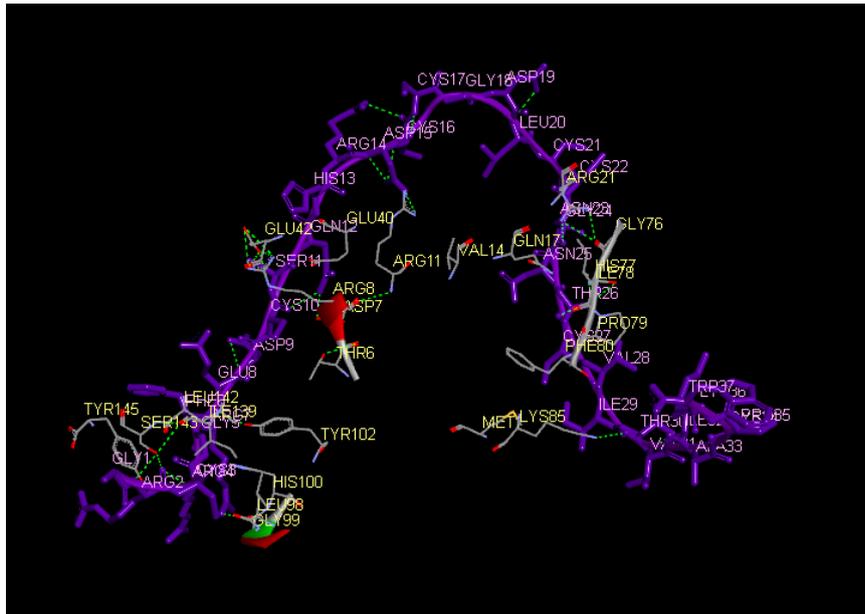


Figura 31: Lugar de unión de xm11a-ClpC1

En este caso vemos como el acoplamiento se sitúa en la zona lateral a las hélices alfa del receptor. La unión de los residuos se describe en la tabla siguiente.

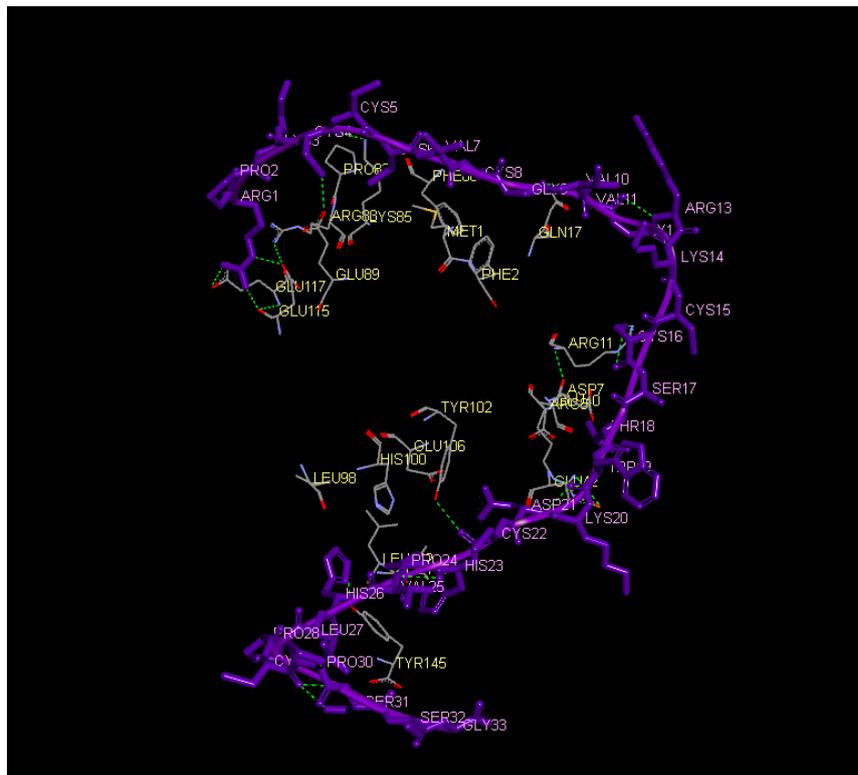
Residuos en ligando	Residuos en receptor
Arginina 2	Isoleucina 139
Arginina 2	Serina 143
Arginina 2	Tirosina 145
Cisteína 3	Isoleucina 139
Cisteína 3	Leucina 98
Arginina 4	Histidina 100
Glicina 5	Histidina 100
Fenilalanina 6	Tirosina 145
Fenilalanina 6	Tirosina 102
Arginina 7	Tirosina 102
Arginina 7	Histidina 100
Arginina 7	Glicina 99
Serina 11	Acido Glutámico 42
Glutamina 12	Acido Aspártico 7
Ácido Aspártico 15	Arginina 11
Glicina 24	Arginina 21
Asparagina 25	Ácido Glutámico 17
Treonina 26	Histidina 77
Cisteína 27	Metionina 1
Valina 28	Prolina 78
Valina 28	Fenilalanina 80
Isoleucina 29	Lisina 85
Treonina 30	Lisina 85

- **Cal29b:**

Para el acoplamiento de esta conotoxina se ha obtenido el siguiente resultado:



*Figura 32: Acoplamiento cal29b-ClpC1*



*Figura 33: Lugar de unión cal29b-ClpC1*

Este acoplamiento se sitúa también en la zona lateral del receptor. Los aminoácidos involucrados en el enlace son los siguientes:

Residuos en ligando	Residuos en receptor
Arginina 1	Ácido Glutámico 115
Arginina 1	Ácido Glutámico 117
Arginina1	Arginina 83
Arginina 1	Lisina 85
Lisina 3	Prolina 82
Cisteína 4	Ácido Glutámico 89
Glicina 4	Lisina 85
Cisteína 6	Lisina 85
Cisteína 6	Metionina 1
Cisteína 8	Fenilalanina 80
Arginina 7	Histidina 100
Arginina 7	Glicina 99
Cisteína 16	Arginina 11
Triptófano 19	Ácido Aspártico 7
Cistina 22	Tirosina 102
Histidina 23	Leucina 141
Prolina 24	Leucina 142
Prolina 24	Tirosina 145
Histidina 26	Leucina 98

- **Cal29a:**

En el caso de esta conotoxina se ha obtenido el siguiente resultado:



Figura 34: Acoplamiento cal29a-ClpC1

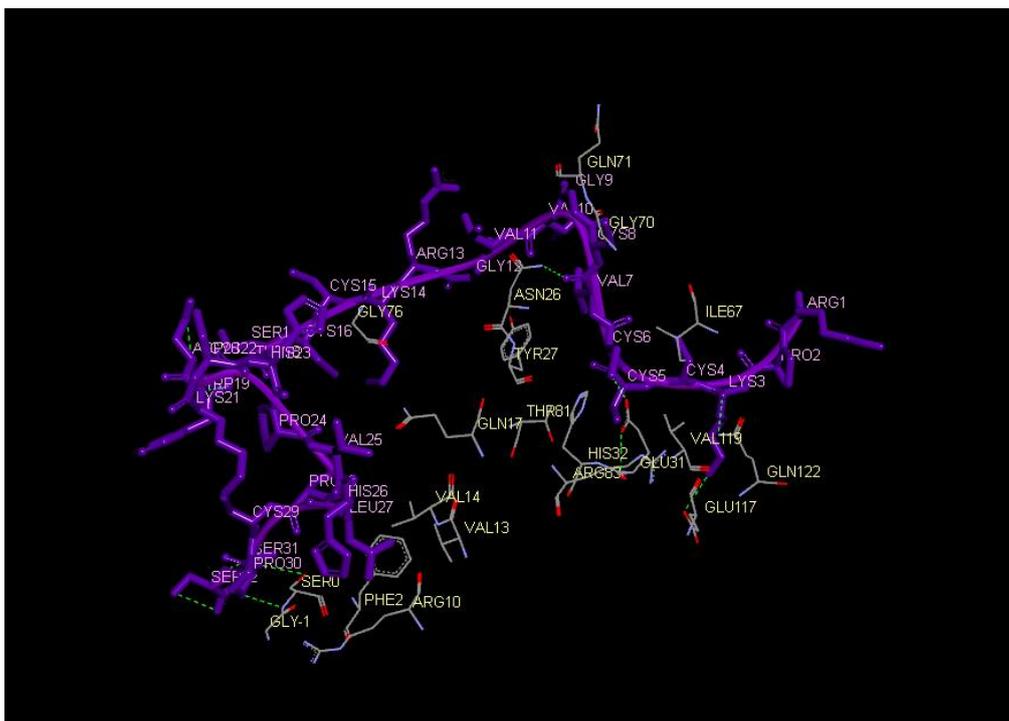


Figura 35: Lugar de unión cal29a-ClpC1

En este acoplamiento la conotoxina se sitúa en la parte superior de la diana. Los aminoácidos que se unen al receptor son los siguientes:

Residuos en ligando	Residuos en receptor
Lisina 3	Glutamina 122
Lisina 3	Ácido Glutámico 117
Cisteína 5	Valina 119
Cisteína 5	Ácido Glutámico 31
Cisteína 6	Ácido Glutámico 31
Cisteína 6	Histidina 32
Cisteína 6	Isoleucina 67
Cisteína 6	Asparagina 26
Valina 7	Tirosina 27
Lisina 14	Prolina 79
Histidina 26	Valina 14
Histidina 26	Arginina 10
Leucina 27	Arginina 10
Leucina 27	Valina 13
Leucina 27	Fenilalanina 2
Serina 31	Serina 0

Los estudios con lasomicina [67] muestran que este péptido se une al receptor a través de los aminoácidos de ClpC1 Arginina 22, Acido Glutámico 37 y Prolina 78. Estos aminoácidos también están implicados en la unión de xm11a a esta diana y podrían ser importantes en una posible modulación de este receptor por parte de la conotoxina.

También se ha destacado en los estudios con ciclomarina A [68] la unión de este péptido al receptor mediante los residuos Fenilalanina 80, Lisina 85 o Acido Glutámico 89. Estos residuos también están implicados en la unión al receptor por parte del cal29b y xm11a.

Si se analizan los acoplamientos para este receptor podemos ver que existen ciertas diferencias conformacionales entre los péptidos. Para estudiarlas se ha realizado una superposición de los tres péptidos para ver las diferencias entre ambos.

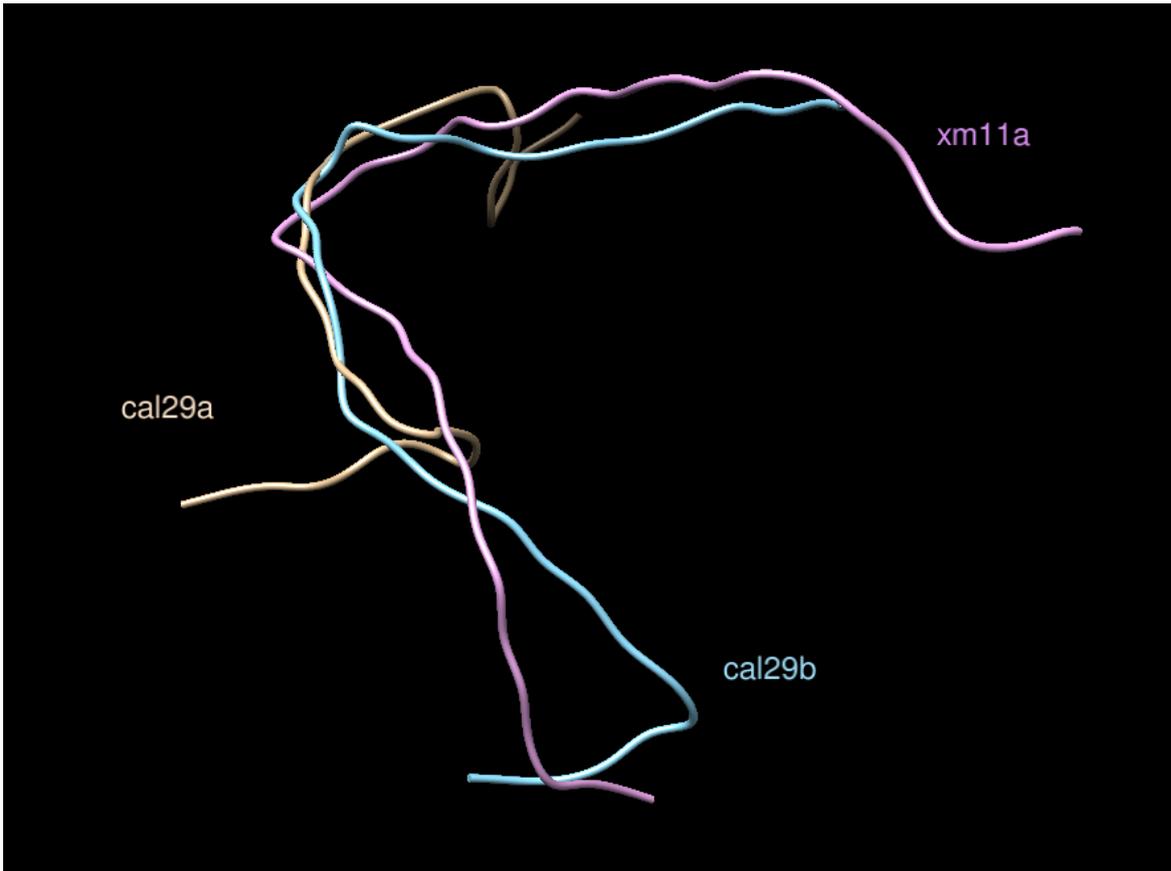


Figura 36: Superposición de las tres conformaciones para ClpC1

Tras la superposición de las conformaciones vemos como tanto cal29b y xm11a adoptan una conformación similar en su unión al receptor mientras que cal29a tiene una conformación notablemente diferente.

*RMSD of cal29a.pdb, chain B with cal29b.pdb, chain B: 3.778*

*RMSD of cal29a.pdb, chain B with xm11a.pdb, chain B: 4.817*

***RMSD of cal29b.pdb, chain B with xm11a.pdb, chain B: 2.947***

El parámetro RMSD para las estructuras antimicobacterianas es relativamente mejor que para cal29a.

### 3.5.3 Acoplamiento conotoxina-DprE1 (oxidorreductase):

Para esta conotoxina se han obtenido los mejores resultados para las dos conotoxinas con actividad antimicobacteriana, por lo que se ha estudiado el acoplamiento.

- **xm11a:**



*Figura 37: Acoplamiento entre xm11a y oxidorreductase*

En este acoplamiento el ligando se une al receptor en la cavidad principal del modelo.

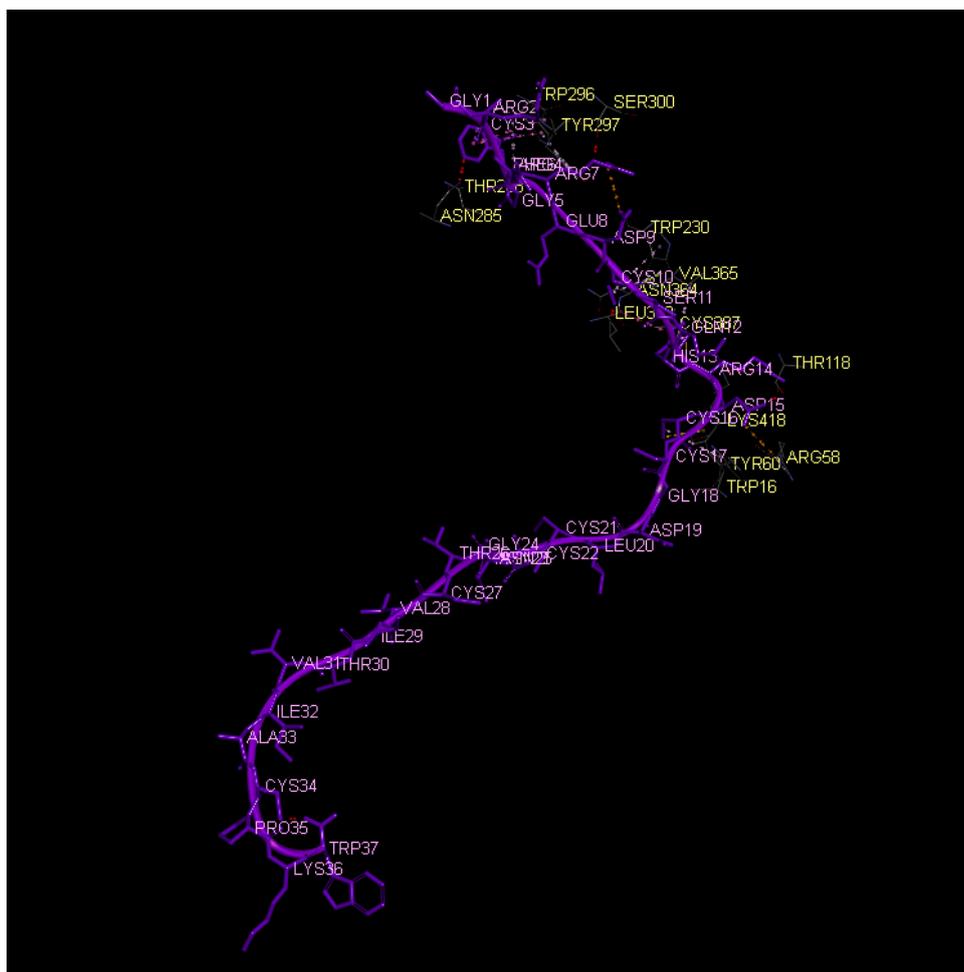


Figura 38: Lugar de unión entre xm11a (violeta) y oxidorreductase

Las interacciones entre los residuos son las siguientes:

Residuos en ligando	Residuos en receptor
Cisteína 3	Triptófano 296
Fenilalanina 6	Triptófano 296
Fenilalanina 6	Asparagina 295
Arginina 7	Tirosina 297
Cisteína 10	Triptófano 230
Cisteína 10	Leucina 363
Histidina 13	Valina 365
Histidina 13	Cisteína 387
Arginina 14	Lisina 418
Ácido Aspártico 15	Treonina 118
Ácido Aspártico 15	Arginina 58
Cisteína 16	Tirosina 60

- cal29b:

Igual que en el caso anterior el péptido se une en la cavidad principal del receptor.



Figura 39: Acoplamiento cal29b-DprE1

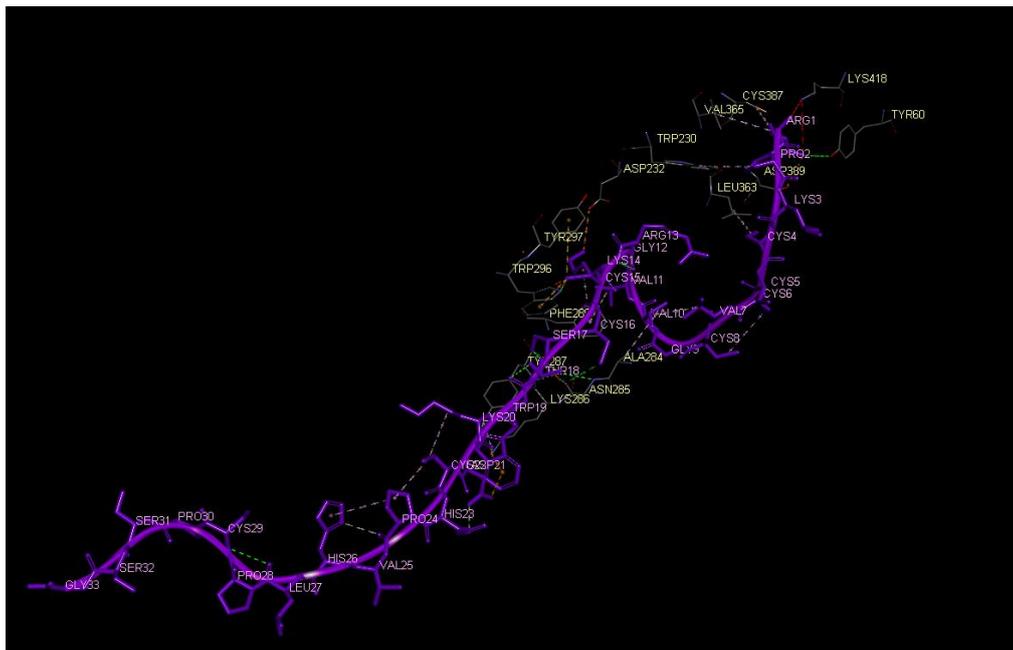


Figura 40: Lugar de unión cal29b y DprE1

Los residuos implicados en la unión entre ambas moléculas son los siguientes:

Residuos en ligando	Residuos en receptor
Arginina 1	Lisina 418
Arginina 1	Tirosina 60
Arginina 1	Acido Aspártico 389
Arginina 7	Cisteína 387
Prolina 2	Triptófano 230
Cisteína 4	Leucina 363
Valina 10	Alanina 284
Valina 11	Fenilalanina 289
Lisina 14	Acido Aspártico 232
Cisteína 15	Tirosina 297
Cisteína 15	Triptófano 296
Cisteína 16	Asparagina 285
Serina 17	Asparagina 285
Triptófano 19	Tirosina 287

Las conformaciones y lugar de unión de ambos péptidos antibacterianos son similares para ambos casos.

- **cal29a:**

En este acoplamiento se ha observado que el péptido no se une a través de la cavidad principal y se sitúa en la parte superior al mismo.



*Figura 41: Acoplamiento cal29a-DprE1*

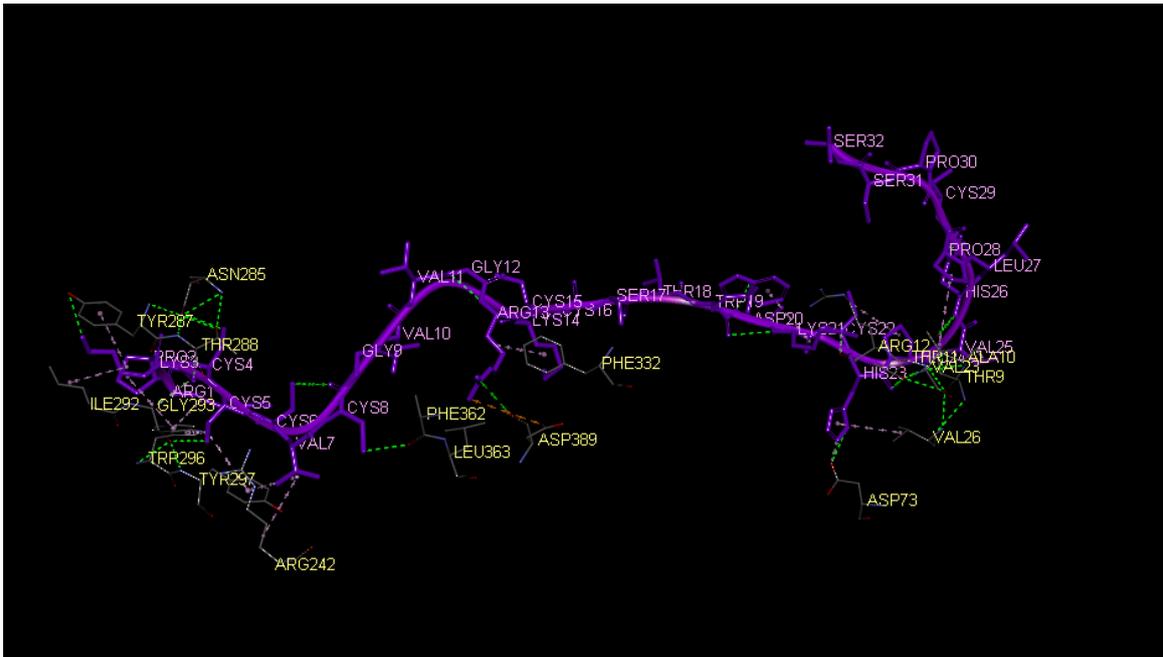


Figura 42: Lugar de unión cal29a-DprE1

En este caso el ligando se une a ambos laterales de la diana.

Residuos en ligando	Residuos en receptor
Arginina 1	Triptófano 296
Prolina 2	Triptófano 296
Lisina 3	Tirosina 287
Lisina 3	Isoleucina 292
Cisteína 4	Asparagina 285
Cisteína 4	Treonina 288
Cisteína 4	Glicina 293
Cisteína 5	Triptófano 296
Cisteína 5	Glicina 293
Cisteína 5	Tirosina 297
Valina 7	Tirosina 297
Valina 7	Arginina 242
Cisteína 8	Fenilalanina 362
Arginina 13	Fenilalanina 332
Arginina 13	Asparagina 389
Histidina 23	Valina26
Histidina 23	Acido Aspártico 73
Prolina 24	Treonina 11
Valina 25	Treonina 9

Estudios muestran que el residuo Cisteína 387 del receptor podría ser clave en su inhibición [63]. Tanto para cal29b como para xm11a se produce la unión con este residuo de la diana terapéutica, lo cual podría justificar la acción antimicrobiana de estos péptidos y necesita ser estudiado en mayor profundidad.

En este caso también se ha realizado una superposición de las 3 conformaciones. Como resultado se puede observar como las conformaciones de cal29b y xm11a tienen ciertas características en común, mientras que la conformación de cal29a se diferencia de las anteriores en sus extremos.

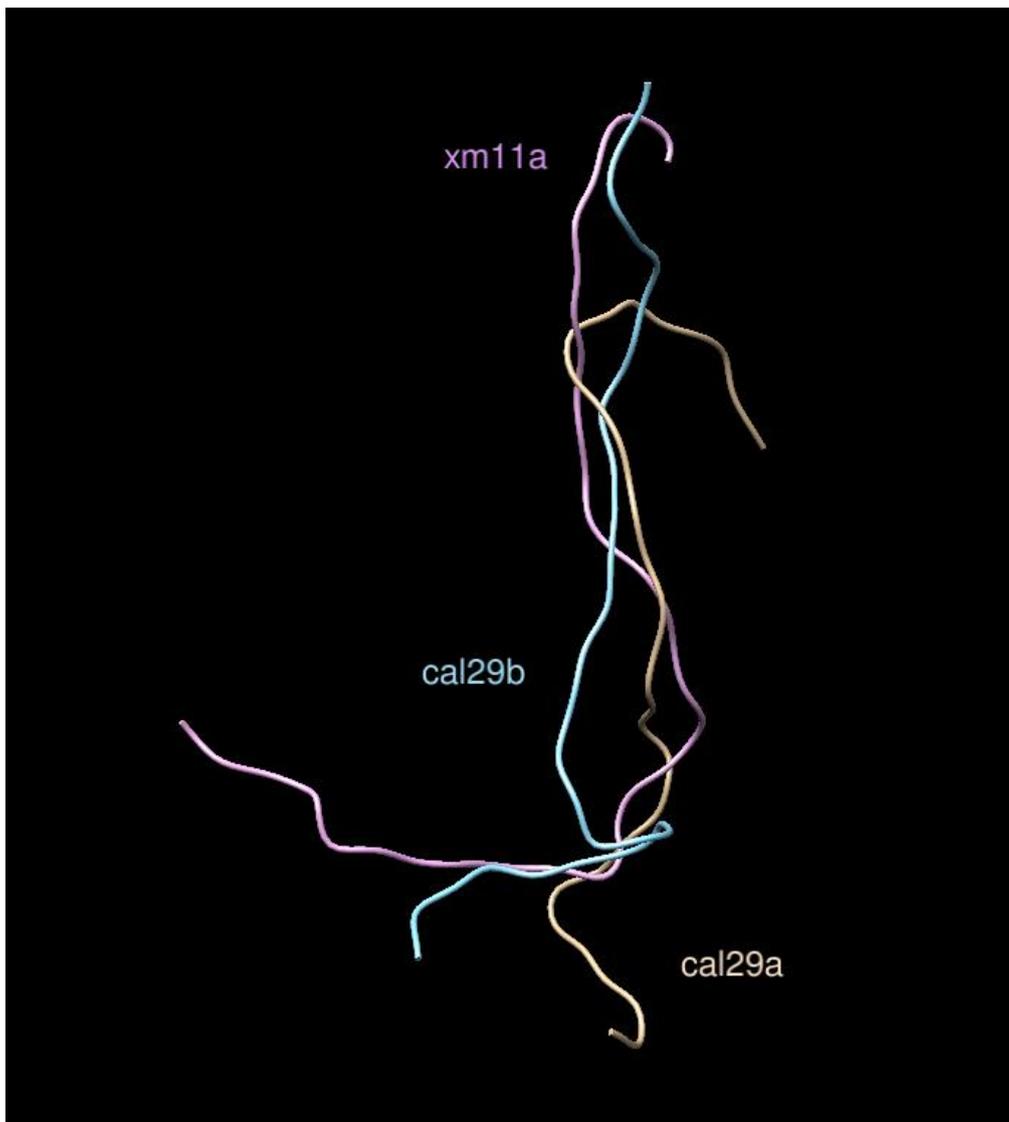


Figura 43: Superposición de las tres conformaciones para DprE1

*RMSD of cal29a.pdb, chain B with cal29b.pdb, chain B: 3.582*  
*RMSD of cal29a.pdb, chain B with xm11a.pdb, chain B: 3.481*  
***RMSD of cal29b.pdb, chain B with xm11a.pdb, chain B: 2.840***

En este caso los resultados de RMSD vuelven a mostrar un mejor alineamiento entre las conformaciones bioactivas de los péptidos antibacterianos.

## 4. Conclusiones

### 4.1 Conclusiones generales:

Como resultado del trabajo se ha propuesto una caracterización estructural para describir estos péptidos. Los modelos generados poseen las características propias de las estructuras de conotoxinas y comparten características vistas en los péptidos antibacterianos. Sería necesario un mayor estudio de estos y el descubrimiento de otros péptidos con características similares para poder establecer la estructura, en solución, de estas moléculas.

Las características de los péptidos antibacterianos hacen que puedan tener actividad en la membrana celular o sobre los distintos procesos celulares al entrar en la célula. Esto dificulta la selección de dianas terapéuticas. Sin embargo, los resultados del acoplamiento conotoxina-receptor muestran varias posibles dianas que podrían explicar la actividad antimicobacteriana de estos péptidos.

En este caso se han obtenido resultados relevantes para GlgE con la conotoxina cal29b y para los receptores ClpC1 y DprE1, con cal29b y xm11a. En las publicaciones sobre estas dianas encontramos que sus principales inhibidores estudiados se unen a ciertos residuos que coinciden con los acoplamientos propuestos en este trabajo, indicando una posible relación con la actividad antibacteriana para las moléculas estudiadas que debe ser estudiada en profundidad. Por tanto, estas dianas pueden ser la base para futuros estudios de diseño de fármacos basados en este tipo de péptidos para el tratamiento de la tuberculosis.

### 4.2 Conclusiones de los objetivos.

En cuanto a los objetivos planeados para elaborar el trabajo podemos decir que se han cumplido, aunque los resultados solamente constituyan una parte preliminar de estudios de investigación.

En primer lugar, se han seleccionado las conotoxinas a estudiar, partiendo de su potencial terapéutico en el tratamiento de la tuberculosis. Los estudios seleccionados son muy recientes y muestran conotoxinas que serán estudiadas próximamente para su posible empleo en la enfermedad.

Además, se ha propuesto una caracterización estructural para estos péptidos para explicar su acción antibacteriana, aunque no se han encontrado suficientes diferencias entre las conotoxinas cal29a y cal29b a nivel estructural que justifiquen la diferente

actividad farmacológica. En cuanto a xm11a, pese a estar alejada de los péptidos anteriores, muestra cierta similitud estructural con ambas y el modelo generado respeta el patrón estructural de cisteína.

En cuanto a la selección de receptores farmacológicos se han escogido las dianas más relevantes en la investigación actual para valorar los posibles mecanismos de acción de estos péptidos. Los resultados del acoplamiento muestran tres posibles dianas antimicobacterianas, pero es necesario una mayor profundización en estos enlaces.

### **4.3 Conclusiones de la planificación**

La planificación de este trabajo ha sufrido varios cambios desde el inicio. Aunque el trabajo se planteó desde el comienzo como una caracterización estructural de conotoxinas se han revisado múltiples estudios para encontrar una conotoxina con suficiente interés terapéutico, pero sin caracterizar estructuralmente y que tuviese la posibilidad de ser contrastada con una conotoxina similar.

Los objetivos del trabajo se han modificado ligeramente durante el desarrollo. Los estudios sobre estas conotoxinas son recientes y esto implica que no haya prácticamente datos experimentales sobre su actividad farmacológica, novedosa para este tipo de conotoxinas, por lo que no disponemos de estructuras referencia las conotoxinas cal29b y cal29a para analizarlas en profundidad. Además, la selección de dianas terapéuticas se ha ampliado para estudiar su posible actividad en diferentes mecanismos celulares.

La metodología del trabajo ha sido la adecuada para la naturaleza de este trabajo y el punto de partida de este, aunque una mejor distribución de las tareas hubiese sido necesaria. Los plazos del trabajo no se han cumplido en varias ocasiones y a lo largo del desarrollo de este se han tenido que corregir a medida que se avanzaba.

### **4.4 Líneas futuras de trabajo.**

Las conotoxinas son moléculas con gran potencial terapéutico y a medida que se descubren nuevas especies y péptidos va aumentando el conocimiento sobre las mismas. Para determinar su potencial antimicobacteriano es necesaria una caracterización estructural que permita determinar su relación estructura-actividad para determinar las dianas terapéuticas y ofrecer nuevas vías para el tratamiento de esta enfermedad.

Las líneas futuras para este tipo de moléculas pasan por la caracterización de nuevos péptidos con patrones estructurales similares. Actualmente solamente cal29a y cal29b presentan un patrón de cisteína, pero a medida que se caractericen nuevas moléculas y se encuentre nuevamente esta distribución de cisteínas se podrán realizar estudios más relevantes.

La conotoxina xm11a probablemente será caracterizada estructuralmente en los próximos meses, ya que su patrón estructural está estudiado y cuando se publique su estructura se podrá analizar mejor su actividad terapéutica.

Con estos avances se podrá estudiar en profundidad su enlace a estas dianas terapéuticas propuestas y analizar su mecanismo de acción, para luego valorar si pueden tener utilidad terapéutica.

Los estudios de estos péptidos aumentan año a año y ofrecen un gran interés experimental, ya sea directamente como tratamiento terapéutico o como herramienta de estudio farmacológico sobre los receptores.

## 5. Glosario

*cadd*: *Computer-aided drug design*.

*Docking*: Acomplamiento ligando-receptor.

PDB: Protein Data Bank

sOPEP: Valor de energía para el modelo obtenido en PEP-FOLD.

tm: Valor de energía TMscore para el modelo obtenido en PEP-FOLD.

RSMD: *root-mean-square deviation of atomic positions*. Medida de la distancia entre los átomos para dos modelos.

Q-score: Puntuación otorgada para el alineamiento entre modelos en Chimera que va desde 0 (baja correspondencia) a 1 (total correspondencia).

## 6. Bibliografía

- [1] David J Newman, Gordon M Cragg and Christopher N Battershill. Therapeutic agents from the sea: biodiversity, chemo-evolutionary insight and advances to the end of Darwin's 200th year. *Diving and Hyperbaric Medicine* December 2009; 39 (4): 216-25
- [2] Lindequist U. (2016). Marine-Derived Pharmaceuticals - Challenges and Opportunities. *Biomolecules & therapeutics*, 24(6), 561–571. doi:10.4062/biomolther.2016.181
- [3] McDowell, G. C., 2nd, & Pope, J. E. (2016). Intrathecal Ziconotide: Dosing and Administration Strategies in Patients With Refractory Chronic Pain. *Neuromodulation : journal of the International Neuromodulation Society*, 19(5), 522–532. doi:10.1111/ner.12392
- [4] Eccles, R., Meier, C., Jawad, M., Weinmüllner, R., Grassauer, A., & Prieschl-Grassauer, E. (2010). Efficacy and safety of an antiviral Iota-Carrageenan nasal spray: a randomized, double-blind, placebo-controlled exploratory study in volunteers with early symptoms of the common cold. *Respiratory research*, 11(1), 108. doi:10.1186/1465-9921-11-108
- [5] Gordon, E. M., Sankhala, K. K., Chawla, N., & Chawla, S. P. (2016). Trabectedin for Soft Tissue Sarcoma: Current Status and Future Perspectives. *Advances in therapy*, 33(7), 1055–1071. doi:10.1007/s12325-016-0344-3.
- [6] Página web [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2004/21-060\\_Prialt.cfm](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2004/21-060_Prialt.cfm) Consultada el día 1 de Junio de 2019
- [7] Página web <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/prialt> Consultada el día 1 de Junio de 2019
- [8] Molinski, T. F., Dalisay, D. S., Lievens, S. L., & Saludes, J. P. (2009). Drug development from marine natural products. *Nature reviews Drug discovery*, 8(1), 69.
- [9] Endean R, Parrish G, Gyr, P. Pharmacology of the venom of *Conus geographus*. *Toxicon* 1974; 12: 131
- [10] Lewis RJ, Dutertre S, Vetter I, and MacDonald JC. *Conus Venom Peptide Pharmacology* *Pharmacol Rev* 2012; 64:259-298
- [11] Jasmine D., Alun J., Lewis RJ. Remarkable inter- and intra-species complexity of conotoxins revealed by LC/MS. *Peptides* 2009; 30(7): 1222–1227

- [12] Hui Ding, En-Ze Deng, Lu-Feng Yuan, et al., "iCTX-Type: A Sequence-Based Predictor for Identifying the Types of Conotoxins in Targeting Ion Channels," *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 286419, 10 pages, 2014.  
<https://doi.org/10.1155/2014/286419>.
- [13] CONOPEPTIDE PHARMACOLOGY Richard J. Lewis, Sébastien Dutertre, Irina Vetter and MacDonald J. Christie *Pharmacological Reviews* April 1, 2012, 64 (2) 259-298; DOI:  
<https://doi.org/10.1124/pr.111.005322>
- [14] Lewis, R. J. (2004), Conotoxins as selective inhibitors of neuronal ion channels, receptors and transporters. *IUBMB Life*, 56: 89-93. doi:10.1080/15216540410001668055
- [15] England, L. J., Imperial, J., Jacobsen, R., Craig, A. G., Gulyas, J., Akhtar, M., ... & Olivera, B. M. (1998). Inactivation of a serotonin-gated ion channel by a polypeptide toxin from marine snails. *Science*, 281(5376), 575-578.
- [16] Essack, M., Bajic, V. B., & Archer, J. A. (2012). Conotoxins that confer therapeutic possibilities. *Marine drugs*, 10(6), 1244-1265.
- [17] Terpinskaya TI, Osipov AV, Kuznetsova TE, Ryzhkovskaya EL, Ulaschik VS, Ivanov IA, Tsetlin VI, Utkin YN.  $\alpha$ -conotoxins revealed different roles of nicotinic cholinergic receptor subtypes in oncogenesis of Ehrlich tumor and in the associated inflammation. *Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology* 2015; 463(1): 216-219
- [18] Mei D, Lin Z, Fu J, He B, Gao W, Ma L, Dai W, Zhang H, Wang X, Wang J, Zhang X, Lu W, Zhou D, Zhang Q. The use of  $\alpha$ -conotoxin lml to actualize the targeted delivery of paclitaxel micelles to  $\alpha 7$  nAChR-overexpressing breast cancer. *Biomaterials* 201; 42:52-65
- [19] Bernáldez-Sarabia, J., Figueroa-Montiel, A., Dueñas, S., Cervantes-Luévano, K., Beltrán, J. A., Ortiz, E., ... Licea-Navarro, A. (2019). The Diversified O-Superfamily in *Californiconus californicus* Presents a Conotoxin with Antimycobacterial Activity. *Toxins*, 11(2), 128. doi:10.3390/toxins11020128
- [20] Página web <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>  
Consultada el día 1 de Junio de 2019.
- [21] Zhang, Y., & Yew, W. W. (2015). Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update 2015. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 19(11), 1276-1289.
- [22] Jarlier, V., & Nikaido, H. (1994). Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS microbiology letters*, 123(1-2), 11-18.

- [23] World Health Organization. (2016). WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis. World Health Organization.
- [24] Base de datos web <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>.
- [25] Página web <https://scholar.google.es/> Consultada el 31 de Mayo de 2019
- [26] Kaas Q, Yu R, Jin AH, Dutertre S and Craik DJ. ConoServer: updated content, knowledge, and discovery tools in the conopeptide database. *Nucleic Acids Research* (2012) 40(Database issue):D325-30
- [27] Revista online: <https://www.mdpi.com/journal/marinedrugs>
- [28] Herramienta online: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- [29] Fábio Madeira, Young mi Park, Joon Lee, Nicola Buso, Tamer Gur, Nandana Madhusoodanan, Prasad Basutkar, Adrian R N Tivey, Simon C Potter, Robert D Finn, Rodrigo Lopez, The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019, *Nucleic Acids Research*, , gkz268, <https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>
- [30] Herramienta online: [https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss\\_pepstats/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_pepstats/)
- [31] Lamiable A, Thévenet P, Rey J, Vavrusa M, Derreumaux P, Tufféry P. PEP-FOLD3: faster de novo structure prediction for linear peptides in solution and in complex. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jul 8;44(W1):W449-54.
- [32] Shen Y, Maupetit J, Derreumaux P, Tufféry P. Improved PEP-FOLD approach for peptide and miniprotein structure prediction *J. Chem. Theor. Comput.* 2014; 10:4745-4758
- [33] Thévenet P, Shen Y, Maupetit J, Guyon F, Derreumaux P, Tufféry P. PEP-FOLD: an updated de novo structure prediction server for both linear and disulfide bonded cyclic peptides. *Nucleic Acids Res.* 2012. 40, W288-293.
- [34] Dong Xu and Yang Zhang. Improving the Physical Realism and Structural Accuracy of Protein Models by a Two-step Atomic-level Energy Minimization. *Biophysical Journal*, vol 101, 2525-2534 (2011).
- [35] Chen et al. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica D*66:12-21.
- [36] Stephen K Burley, Helen M. Berman, et al. RCSB Protein Data Bank: biological macromolecular structures enabling research and education in fundamental biology,

- biomedicine, biotechnology and energy (2019) *Nucleic Acids Research* 47: D464–D474. doi: 10.1093/nar/gky1004.
- [37] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne.(2000) *The Protein Data Bank Nucleic Acids Research*, 28: 235-242.
- [38]Zhou P, Jin B, Li H, Huang S-Y.\* HPEPDOCK: a web server for blind peptide-protein docking based on a hierarchical algorithm. *Nucleic Acids Research*, doi: 10.1093/nar/gky357, 2018.
- [39]Zhou P, Li B, Yan Y, Jin B, Wang L, Huang S-Y.\* Hierarchical Flexible Peptide Docking by Conformer Generation and Ensemble Docking of Peptides. *Journal of Chemical Information and Modeling*, doi: 10.1021/acs.jcim.8b00142, 2018.
- [40]Yan Y, Zhang D, Huang S-Y.\* Efficient conformational ensemble generation of protein-bound peptides. *J Cheminform.* 2017;9(1):59.
- [41]Huang S-Y, Zou X. An iterative knowledge-based scoring function for protein-protein recognition. *Proteins* 2008;72:557-579.
- [42]Huang SY, Zou X. Ensemble docking of multiple protein structures: considering protein structural variations in molecular docking. *Proteins.* 2007;66:399-421.
- [43]UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. *J Comput Chem.* 2004 Oct;25(13):1605-12.
- [44] Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Visualizer, v 19.1.0.18287, San Diego: Dassault Systèmes, 2019.
- [45]Biggs, J. S., Watkins, M., Puillandre, N., Ownby, J. P., Lopez-Vera, E., Christensen, S., ... & Olivera, B. M. (2010). Evolution of Conus peptide toxins: analysis of *Conus californicus* Reeve, 1844. *Molecular phylogenetics and evolution*, 56(1), 1-12.
- [46]Figueroa-Montiel, A., Bernáldez, J., Jiménez, S., Ueberhide, B., González, L. J., & Licea-Navarro, A. (2018). Antimycobacterial Activity: A New Pharmacological Target for Conotoxins Found in the First Reported Conotoxin from *Conasprella ximenes*. *Toxins*, 10(2), 51. doi:10.3390/toxins10020051
- [47] AlMatar, M., Makky, E. A., Yakıcı, G., Var, I., Kayar, B., & Köksal, F. (2018). Antimicrobial peptides as an alternative to anti-tuberculosis drugs. *Pharmacological research*, 128, 288-305.
- [48]Quentin Kaas, Jan-Christoph Westermann, David J. Craik, Conopeptide characterization and classifications: An analysis using ConoServer, *Toxicon*, Volume 55, Issue 8, 2010, Pages 1491-1509, ISSN 0041-0101, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.002>.

- [49] Jimenez, E. C., Shetty, R. P., Lirazan, M., Rivier, J., Walker, C., Abogadie, F. C., Yoshikami, D., Cruz, L. J. and Olivera, B. M. (2003), Novel excitatory Conus peptides define a new conotoxin superfamily. *Journal of Neurochemistry*, 85: 610-621. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01685.x
- [50] Buczek, O., Wei, D., Babon, J. J., Yang, X., Fiedler, B., Chen, P., ... Norton, R. S. (2007). Structure and sodium channel activity of an excitatory I1-superfamily conotoxin. *Biochemistry*, 46(35), 9929–9940. doi:10.1021/bi700797f
- [51] Mdluli, K., Kaneko, T., & Upton, A. (2015). The tuberculosis drug discovery and development pipeline and emerging drug targets. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(6), a021154.
- [52] Lou, Z., & Zhang, X. (2010). Protein targets for structure-based anti-Mycobacterium tuberculosis drug discovery. *Protein & cell*, 1(5), 435-442.
- [53] Chen, H., Nyantakyi, S. A., Li, M., Gopal, P., Aziz, D. B., Yang, T., ... & Go, M. L. (2018). The mycobacterial membrane: a novel target space for anti-tubercular drugs. *Frontiers in microbiology*, 9.
- [54] Wisedchaisri, G., Chou, C. J., Wu, M., Roach, C., Rice, A. E., Holmes, R. K., ... & Hol, W. G. (2007). Crystal structures, metal activation, and DNA-binding properties of two-domain IdeR from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*, 46(2), 436-447.
- [55] Zhang, B., Li, J., Yang, X., Wu, L., Zhang, J., Yang, Y., ... & Cheng, X. (2019). Crystal Structures of Membrane Transporter MmpL3, an Anti-TB Drug Target. *Cell*, 176(3), 636-648.
- [56] Steinbacher, S., Bass, R., Strop, P., & Rees, D. C. (2007). Structures of the prokaryotic mechanosensitive channels MscL and MscS. *Current topics in membranes*, 58, 1-24.
- [57] Yang, Y., Auguin, D., Delbecq, S., Dumas, E., Molle, G., Molle, V., ... & Saint, N. (2011). Structure of the *Mycobacterium tuberculosis* OmpATb protein: a model of an oligomeric channel in the mycobacterial cell wall. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 79(2), 645-661.
- [58] Ortiz-Lombardía, M., Pompeo, F., Boitel, B., & Alzari, P. M. (2003). Crystal structure of the catalytic domain of the PknB serine/threonine kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(15), 13094-13100.
- [59] Vasudevan, D., Rao, S. P., & Noble, C. G. (2013). Structural basis of mycobacterial inhibition by cyclomarin A. *Journal of Biological Chemistry*, 288(43), 30883-30891.
- [60] Vasudevan, D., Rao, S. P., & Noble, C. G. (2013). Structural basis of mycobacterial inhibition by cyclomarin A. *Journal of Biological Chemistry*, 288(43), 30883-30891.
- [61] Jirgis, E. N., Bashiri, G., Bulloch, E. M., Johnston, J. M., & Baker, E. N. (2016). Structural views along the *Mycobacterium tuberculosis* MenD reaction pathway illuminate key aspects of thiamin diphosphate-dependent enzyme mechanisms. *Structure*, 24(7), 1167-1177.

- [62] Wiseman, B., Nitharwal, R. G., Fedotovskaya, O., Schäfer, J., Guo, H., Kuang, Q., ... & Brzezinski, P. (2018). Structure of a functional obligate complex III 2 IV 2 respiratory supercomplex from *Mycobacterium smegmatis*. *Nature structural & molecular biology*, 25(12), 1128.
- [63] Batt, S. M., Jabeen, T., Bhowruth, V., Quill, L., Lund, P. A., Eggeling, L., ... & Besra, G. S. (2012). Structural basis of inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* DprE1 by benzothiazinone inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(28), 11354-11359.
- [64] Página web <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ziconotide> Consultada el día 2 de Junio de 2019.
- [65] Kleinnijenhuis, Johanneke & Oosting, Marije & Joosten, Leo & Netea, Mihai & Van Crevel, Reinout. (2011). Innate Immune Recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical & developmental immunology*. 2011. 405310. 10.1155/2011/405310.
- [66] Choules, M. P., Wolf, N. M., Lee, H., Anderson, J. R., Grzelak, E. M., Wang, Y., ... Cho, S. (2019). Rufomycin Targets ClpC1 Proteolysis in *Mycobacterium tuberculosis* and *M. abscessus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63(3), e02204-18. doi:10.1128/AAC.02204-18
- [67] Gavrish, E., Sit, C. S., Cao, S., Kandror, O., Spoering, A., Peoples, A., ... Lewis, K. (2014). Lassomycin, a ribosomally synthesized cyclic peptide, kills *mycobacterium tuberculosis* by targeting the ATP-dependent protease ClpC1P1P2. *Chemistry & biology*, 21(4), 509–518. doi:10.1016/j.chembiol.2014.01.014
- [68] Vasudevan, D., Rao, S. P., & Noble, C. G. (2013). Structural basis of mycobacterial inhibition by cyclomarin A. *The Journal of biological chemistry*, 288(43), 30883–30891. doi:10.1074/jbc.M113.493767