



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

ESTUDIO ESTRUCTURAL DE TOXINAS BLOQUEADORAS DE
CANALES DE POTASIO

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

ALMA LETICIA SAUCEDO YÁÑEZ

Director de Tesis
Dr. José Federico del Río Portilla

“Por mi raza hablará el espíritu”
Ciudad Universitaria, mayo de 2012.



DOCTORADO
en
CIENCIAS
BIOMÉDICAS





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

*A Rodrigo y Ángel
y
Olga y Adalberto*

Comité Tutor:

Dr. José Federico del Río Portilla
Instituto de Química, UNAM

Dra. Adela Rodríguez Romero
Instituto de Química, UNAM

Dr. Froylán Gómez Lagunas
Facultad de Medicina, UNAM

Este trabajo fue desarrollado en el Instituto de Química de la UNAM.

El financiamiento del proyecto de investigación se obtuvo a través de la *Dirección General de Apoyo al Personal Académico* (IN205110) y del *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* (59297, 166472).

El Comité Académico del Doctorado en Ciencias Biomédicas, en su reunión 295 del 15 de febrero de 2012, designó el siguiente jurado para examen de grado.

Presidente: Dr. Manuel Benigno Aguilar

Secretario: Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco

Vocal: Dr. Enrique García Hernández

Vocal: Dr. León David Islas Suarez

Vocal: Dra. Adela Rodríguez Romero

El Comité Académico aprobó la integración del jurado en apego a la nueva normatividad, acojiéndose al artículo Quinto Transitorio, con base a lo establecido en el Artículo 31 del Reglamento General de Estudios de Posgrado.

CONTENIDO

	<i>Página</i>
ABSTRACT	<i>vi</i>
RESUMEN	<i>vii</i>
Listado de Abreviaturas	<i>ix</i>
Índice de Tablas y Figuras	<i>x</i>
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Toxinas peptídicas aisladas del veneno de animales	1
1.2 La función de los canales Kv en el potencial de acción	2
1.3 Toxinas peptídicas aisladas del veneno de animales	5
1.4 Características estructurales de las toxinas peptídicas de origen animal	6
1.5 Mecanismos de interacción del complejo toxina-canal	9
1.6 El veneno del alacrán <i>Tityus trivittatus</i>	10
1.6.1 Descubrimiento de la toxina Tx1	11
1.7 Determinación de la estructura tridimensional de biomoléculas en disolución	12
1.7.1 RMN y estructura de proteínas	12
1.7.2 Efecto Nuclear Overhauser	13
1.7.3 Constantes de acoplamiento escalar	14
1.7.4 Esquema general de la RMN bidimensional	14
1.7.5 Asignación secuencial de las señales	15
1.7.6 Distancias ^1H - ^1H en la estructura secundaria de las proteínas	19
1.7.7 Cálculo de la estructura	20
2. OBJETIVO GENERAL	23
2.1 Objetivos Particulares	23
3. HIPÓTESIS	23
4. MÉTODOS	24
4.1 Diseño y clonación del gen	24
4.2 Expresión de la proteína recombinante	24
4.3 Purificación de la proteína recombinante	25
4.4 Caracterización de la proteína recombinante	26
4.4.1 Determinación de la masa molecular	26
4.4.2 Determinación del coeficiente de extinción molar	26
4.4.3 Evaluación electrofisiológica	26
4.4.4 Evaluación citotóxica	27
4.5 Determinación de la estructura tridimensional mediante Resonancia Magnética Nuclear	27
4.5.1 Preparación de la muestra	27
4.5.2 Adquisición de los espectros de RMN	27
4.5.3 Procesamiento y análisis de datos	28

4.5.4	Afinamiento de la estructura con dinámica molecular	28
5.	RESULTADOS	29
5.1	Obtención del plásmido pET31mod-gsTx1	29
5.2	Expresión de la proteína de fusión	29
5.3	Purificación de la proteína de fusión	31
5.4	Corte enzimático de la proteína de fusión	33
5.5	Purificación de la toxina rTx1	34
5.5.1	rTx1 obtenida en <i>E. coli</i> Rosseta-gami	35
5.5.2	rTx1 obtenida en <i>E. coli</i> Tuner	37
5.6	Caracterización de las proteínas recombinantes obtenidas en <i>E. coli</i> Tuner	39
5.6.1	Espectrometría de Masas	39
5.6.2	Determinación del coeficiente de extinción mola	39
5.6.3	Evaluación de la actividad biológica	41
5.6.3.1	Evaluación en los canales <i>Shaker</i> , hKv1.2 y hKv1.3	41
5.6.3.2	Evaluación citotóxica en la línea celular J774	42
5.7	Determinación de la estructura tridimensional en disolución	43
5.7.1	Preparación de la muestra	43
5.7.2	Conversión y procesamiento de los espectros de RMN	43
5.7.3	Análisis e interpretación de los espectros	44
5.7.4	Predicción de la estructura secundaria	53
5.7.5	Determinación de la conectividad entre cisteínas de la toxina rTx1p1	54
5.7.6	Estructura tridimensional de la toxina rTx1p1	57
5.7.7	Determinación de la conectividad entre cisteínas de la toxina rTx1p2	61
5.7.8	Estructura tridimensional de la toxina rTx1p2	62
5.7.9	Las toxinas relacionadas con Tx1	66
5.7.10	Determinación de la estructura tridimensional de la toxina recombinante Ts16	66
6.	DISCUSIÓN	71
6.1	Un nuevo motivo de plegamiento para toxinas del veneno de alacrán	71
6.1.1	Comparación con la familia de toxinas CS α / α .	71
6.1.2	Comparación con la familia de toxinas CS α / β .	73
6.2	Las características estructurales de κ -BUTX-Tt-2b y su actividad biológica	76
6.3	¿Por qué rTxp2 también actúa como toxina?	77
6.4	Clasificación de la toxina Tx1	79
7.	CONCLUSIONES	80
8.	REFERENCIAS	82
9.	ANEXOS	89
10.	PUBLICACIONES	102

ABSTRACT

Potassium-channel-blocking toxins, isolated from scorpion venom (KTx), are peptides of 22 to 75 amino acids stabilized by 2 to 4 disulfide bridges. Their secondary structure displays one or more alpha-helix (CSalpha/alpha motif), either one or more beta-strands (CSbeta/beta motif), or both arrangements (CSalpha/beta motif); being the last one the most common folding pattern.

Recently, a 28 residues toxin was isolated from the venom of the South American scorpion *T. trivittatus*. This toxin keeps an identity lower than 40% compared to most known KTx toxins. Further, it was named kappa-BUTX-Tt-2b (Tt2b). By performing the analytical assays for disulfide bridge connectivity, it was found preliminary evidence of an unusual cysteine-pattern. The interest in confirming the connectivity between cysteines, establishing the biological function and determining the tridimensional solution structure of a toxin with a low preserved amino acid sequence originated the actual research work.

Tx1 toxin was produced by *E. coli* heterologous expression, using a system that generates it as a thioredoxin fusion protein, so further enzymatic hydrolysis reaction and several steps of chromatographic purification were required. Spectroscopic characterization allowed confirming the presence of the native folding in the recombinant protein (rTx1p1); in addition, the identification of a biosynthesis sub-product was done, an rTx1p1 isomer denominated rTx1p2. Biological activity of both molecules was tested by electrophysiological assays. It was found that rTx1p1 200 μ M decreases the potassium channel currents of *Shaker*, hKv1.2 and hKv1.3 channels 89%, 75% and 82% respectively; at the same condition rTx1p2 did not cause any effect. Citotoxic evaluation using a 50 μ M solution induces the complete inhibition of cellular growth when murine macrophages are in contact with an rTx1p1 solution; a 41.5% inhibition is triggered by rTx1p2. Data required for tridimensional structure determination were acquired by solution Nuclear Magnetic Resonance (NMR). NMR restrictions were used to feed dynamic torsion angle calculations in order to obtain the structure.

It was found that Tt2b exhibits a very unusual folding, for the first time identified in potassium channels blocking toxins of scorpion venom; it adopts a CSalpha/alpha motif stabilized by three disulfide bridges with unique cysteine connectivity. This pattern only has been identified in an anemone toxin. Structural similarity between Tt2b and the CSalpha/beta family reveals an unexpected structural versatility for these molecules. In addition, structural analysis of rTx1p2 isomer and its comparison with Tt2b allowed bringing forward that Tt2b region related with the Kv channels interaction is located in the second alpha helix and the C-terminal end.

RESUMEN

Las toxinas bloqueadoras de canales de potasio aisladas del veneno de alacrán (KTx), son péptidos de 22 a 75 aminoácidos estabilizados por la presencia de 2 a 4 puentes disulfuro, cuya estructura secundaria puede presentar una o más hélices alfa (motivo CSalfa/alfa), así como una o más hebras beta (motivo CSbeta/beta), o bien, la combinación de ambos elementos (motivo CSalfa/beta), siendo este último el patrón de plegamiento más frecuente.

Recientemente fue purificada del veneno del alacrán sudamericano *T. trivittatus*, una toxina de 28 aminoácidos que posee una secuencia de aminoácidos que guarda una identidad menor al 40% respecto a la mayoría de las toxinas KTx conocidas; esta toxina fue posteriormente clasificada como kappa-BUTX-Tt-2b (Tt2b). Al realizar los ensayos analíticos para la determinación de los puentes disulfuro se encontró evidencia preliminar de que la conectividad entre cisteínas también era inusual. El interés por confirmar la conectividad entre las cisteínas, establecer la función biológica y determinar la estructura tridimensional en disolución de una toxina con una secuencia poco conservada, fue lo que dio origen al presente trabajo de investigación.

La toxina Tt2b fue obtenida mediante expresión heteróloga en *E. coli*, empleando un sistema que la produce como una proteína de fusión a tiorredoxina, por lo que posteriormente fue sometida a una reacción de hidrólisis enzimática y varias etapas de purificación cromatográfica. La caracterización espectroscópica permitió confirmar la obtención de la toxina recombinante con el plegamiento nativo (rTxp1), así como la identificación de un subproducto de la biosíntesis, isómero de rTxp1, que se denominó rTx1p2. Al realizar los estudios de la actividad biológica de ambas moléculas mediante ensayos de electrofisiología se encontró que, a una concentración de 200 μ M, la toxina rTxp1 disminuye las corrientes de los canales de potasio *Shaker*, hKv1.2 y hKv1.3 en 89%, 75% y 82%, respectivamente; mientras que a la misma concentración rTx1p2 no causa ningún efecto. La evaluación citotóxica, empleando una disolución de 50 μ M, reportó la inhibición completa del crecimiento celular de macrófagos murinos ante la presencia de rTxp1 y del 41.5% al utilizar rTx1p2. Los datos necesarios para la determinación de la estructura tridimensional de ambas moléculas fueron obtenidos empleando Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en disolución. Las restricciones derivadas de la RMN fueron utilizadas para determinar la estructura mediante cálculos dinámicos de ángulos de torsión.

Se encontró que la toxina Tt2b adopta un plegamiento inusual, identificado por primera vez en toxinas bloqueadoras de canales de potasio producidas en el veneno de alacrán.

Esta toxina forma un motivo CSalfa/alfa estabilizado por tres puentes disulfuro con conectividades entre cisteínas, que únicamente se habían encontrado en toxinas del veneno de anémona. La similitud estructural de Tt2b con toxinas de la familia CSalfa/beta revela una versatilidad estructural inesperada en estas moléculas. Adicionalmente, la determinación de la estructura del isómero rTx1p2 y su comparación con Tt2b, permitió proponer que en la región conformada por la segunda hélice alfa y el extremo C-terminal de la toxina Tt2b está ubicado el sitio de interacción con los canales Kv.

LISTADO DE ABREVIATURAS

BMRB	BioMolecular Resonance Bank
CAMQ	Cromatografía de Afinidad Metal Quelato
CLAR	Cromatografía de Líquido de Alta Resolución
COSY	Correlation SpectroscopY
CSI	Chemical Shift Index
DO	Densidad Óptica
EM	Espectrometría de Masas
ESI	Ionización por Electro-Spray
FID	Free Induction Decay
FR-C18	Fase Reversa con Columna C18
ICC	Inhibición del Crecimiento Celular
ICK	Inhibitor cystine knot
IPTG	IsoPropil- β -d-1-TioGalactopiranosido
KTx	Toxinas bloqueadoras de canales de K ⁺
Kv	Canal de potasio dependiente de voltaje
LB	Luria-Bertani (Medio de Cultivo)
MALDI	Matrix Assisted Lasser Desorption Ionization
MS	Mass Spectroscopy
m/z	Relación masa/carga
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
PA	Potencial de Acción
PF	Proteína de Fusión
PDB	Protein Data Bank
PDS	Puentes DiSulfuro
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMSD	Root Mean Square Deviation
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SRB	Sulfo-Rodamina B
TEV	Two Electrode Voltage
TFA	TriFluoroacetic Acid
TOCSY	Total Correlation SpectroscopY
TOF	Time Of Flight

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

		<i>Página</i>
Tabla 1.1	Concentraciones iónicas y potenciales de equilibrio (E_{eq}) en células de músculo esquelético de mamífero.	4
Tabla 1.2	Péptidos identificados en el veneno de <i>T. trivittatus</i> .	10
Tabla 1.3	Distancias interatómicas de corto y medio alcance que identifican los distintos elementos de estructura secundaria de las proteínas.	20
Tabla 5.1	Selección de condiciones de expresión.	30
Tabla 5.2	Rendimiento de la proteína de fusión obtenida en tres cultivos de 1 L de medio LB.	33
Tabla 5.3	Relación m/z de los valores calculados para la toxina rTx1 y los valores obtenidos en las fracciones I y II.	36
Tabla 5.4	Relación m/z de cada una de las fracciones obtenidas analizadas por MS-MALDI-TOF.	39
Tabla 5.5	Determinación del coeficiente de extensión molar a 280 nm de la toxina rTx1.	41
Tabla 5.6	Porcentaje de inhibición del crecimiento celular (%ICC) en la línea celular J774	43
Tabla 5.7	Valores de desplazamiento químico de los protones de las toxinas nativa y recombinantes.	50
Tabla 5.8	Relación del número de restricciones de distancia utilizadas en el cálculo de la estructura de la toxina rTx1p1.	56
Tabla 5.9.	Conectividad entre cisteínas en rTx1p1.	56
Tabla 5.10	Relación de restricciones de distancia utilizadas en el cálculo de la estructura de la toxina rTx1p2.	62
Tabla 5.11	Relación del número de restricciones de distancia utilizadas en el cálculo de la estructura de la toxina rTs16.	67
Tabla 5.12	Conectividad entre cisteínas en Ts16.	68
Tabla 6.1	Comparación de secuencias y porcentaje de bloqueo sobre canales Kv de los miembros representativos de las κ -toxinas y la Tx1.	71
Tabla 6.2	Resultados del alineamiento estructural con FATCAT-flexible de la toxina rTx1 con algunos miembros de la familia κ -KTx.	72
Tabla 6.3	Alineamiento de la secuencia de Tx1 con miembros representativos de la familia α -KTx	75

FIGURAS

	<i>Página</i>	
Figura 1.1.	Representación esquemática de la subunidad α de un canal Kv con 6 STM.	3
Figura 2.2.	Estructura de los canales Kv.	3
Figura 1.3	Potencial de acción de células excitables.	5
Figura 1.4	Estructura tridimensional en la representación de listones de la maurotoxina, HsTx1, ShK y AOSK1.	7
Figura 1.5.	Representación de listones de la cadena principal de los diversos motivos de plegamiento reportados para toxinas peptídicas.	8
Figura 1.6	Esquema general del procedimiento de la obtención de la estructura de una proteína a partir de datos de RMN	13
Figura 1.7	Secuencias de pulsos de los experimentos COSY, TOCSY y NOESY.	15
Figura 1.8	Sistema de espín de la valina	17
Figura 1.9	Ejemplos de algunas de las correlaciones que se observan entre vecinos secuenciales.	17
Figura 1.10	Espectro NOESY de una proteína de 30 aminoácidos.	18
Figura 1.11	Contactos interatómicos que se observan en los distintos elementos de estructura secundaria.	19
Figura 5.1.	Representación esquemática de la construcción del gen pET32mod-gsTx1.	29
Figura 5.2.	Cinética de expresión.	31
Figura 5.3.	Gel SPS-PAGE al 12% de la purificación de la PF expresada por la cepa Rosseta-gami (A) y Tuner (B).	32
Figura 5.4.	Perfil cromatográfico de la proteína de fusión obtenida en la cepa Rosseta-gami.	32
Figura 5.5.	Seguimiento en gel SDS-PAGE al 12% de acrilamida de la hidrólisis enzimática de la proteína de fusión.	34
Figura 5.6.	Seguimiento en geles de Tris-Tricina de la purificación por CAMQ de la toxina rTx1 obtenida por Rosseta-gammi (A) y Tuner (B).	35
Figura 5.7.	Cromatograma de la separación de la la toxina rTx1 obtenida por <i>E. coli</i> Rosseta-gami.	36
Figura 5.8.	Espectros de EM-ESI de las fracciones colectadas por CLAR-FRC18.	37
Figura 5.9.	Perfil cromatográfico de la elución por CLAR-FRC18 de los productos de hidrólisis de la PF obtenida en <i>E. coli</i> Tuner que no fueron retenidos por la columna de afinidad.	38
Figura 5.10.	Espectros de MS-MALDI-TOF de las tres fracciones colectadas.	40
Figura 5.11.	Registro del efecto de la toxina rTx1 sobre los canales <i>Shaker</i> y hKv1.2 a 60 mV.	42
Figura 5.12.	Texto de procesamiento utilizado para los espectros bidimensionales COSY, TOCSY y NOESY.	44
Figura 5.13.	Espectros TOCSY de las toxinas recombinantes.	45

Figura 5.14.	Diferencia de desplazamiento químico ($\Delta\delta$) del protón de amida H_N de las toxinas recombinantes <i>vs.</i> la toxina nativa.	46
Figura 5.15	Franjas del espectros NOESY de la toxina recombinante rTx1p1.	47
Figura 5.16.	Gráficas de CSI de las toxinas Tx1 nativa y recombinantes.	53
Figura 5.17.	Región del espectro NOESY de la toxina rTx1p1 en dónde se observan las correlaciones entre los $H\beta$ - $H\beta$ de las Cys ⁷ -Cys ²⁰ .	55
Figura 5.18.	Gráficos de las estadísticas de la distribución de señales NOE de la toxina rTx1p1.	57
Figura 5.19.	Estructura de la toxina rTx1p1 (PDB: 2LI3).	59
Figura 5.20	Gráfico de Ramachandran del la toxina rTx1p1 generado en la aplicación PROCHECK del <i>Protein Data Bank</i> .	
Figura 5.21	Estructura de la toxina rTx1p2.	63
Figura 5.22	Gráfico de Ramachandran de la toxina rTx1p2.	64
Figura 5.23	Gráficas de la distribución de señales NOE del cálculo de estructura de rTx1p2 con los puentes C1-C6, C2-C5 y C3-C4.	65
Figura 5.24	Distribución de señales NOE del cálculo de la estructura de la toxina rTs16.	69
Figura 5.25	Estructura de la toxina rTs16.	70
Figura 6.1	Representación de listones de las estructuras tridimensionales de algunas toxinas de la familia κ -Ktx.	73
Figura 6.2	Alineamiento estructural de la toxina Tx1 con toxinas representativas de la familia $CS\alpha/\beta$.	74
Figura 6.3	Análisis de la estructura de la toxina Tx1.	76
Figura 6.4	Comparación estructural entre rTx1p1 (azul) y rTx1p2 (verde).	78

1. INTRODUCCIÓN

“Las palabras están ahí para explicar el significado de las cosas, de manera que el que las escucha, entienda dicho significado.”

Aldous Huxley

Los canales iónicos son proteínas de la membrana celular que regulan el flujo de iones a través de la misma, que se encuentran tanto en células procariontes como eucariontes. Algunas de las funciones conocidas de los canales incluyen el establecimiento del potencial de reposo de la membrana, el control del volumen celular y la regulación del flujo de iones. En las células excitables son responsables de la generación del potencial de acción, que tiene una relevancia notable para el control del metabolismo intracelular y la transducción de señales, la expresión de genes, la síntesis de proteínas y su degradación.

Los canales se clasifican de acuerdo con el tipo de cationes o aniones que pasan a través de sus compuertas (por ejemplo Na^+ , K^+ , Ca^+ , Cl^-), por el tipo de ligando al que se unen o porque son activados por un cambio de potencial en la membrana. Debido a la carga neta que presentan los iones, el paso de éstos a través de los canales genera corrientes eléctricas que inducen cambios en el potencial de membrana de las células excitables [Hille 2001]. Dada su relevancia en la regulación de procesos vitales, los canales iónicos son el blanco biológico de las toxinas que se encuentran en el veneno de distintas especies animales tales como arácnidos, reptiles y organismos marinos. En el caso particular de los alacranes, que tienen una historia evolutiva cercana a los 400 millones de años, el veneno que producen podría ser el responsable del éxito de su sobrevivencia, sin haber presentado cambios significativos en su apariencia. El veneno que los alacranes inyectan en sus presas o depredadores es una mezcla compleja que contiene sales, carbohidratos, enzimas y péptidos con actividad tóxica frente a varios tipos de canales iónicos [Jeyaprakash y Hoy 2009, Dutertre y Lewis 2010].

El efecto tóxico causado por el veneno se presenta cuando las toxinas de naturaleza proteica, selectivas para distintas especies animales, se unen al poro en la región externa del canal y lo ocluyen físicamente impidiendo la conducción de los iones; o cuando toxinas liposolubles modifican el mecanismo de apertura-cierre de la compuerta del canal (*gating*) al unirse preferentemente a sitios receptores transmembranales, en conformaciones específicas del canal que permite estabilizarlos en estados funcionales únicos a través de un mecanismo alostérico, lo que provoca una alteración de la cinética y la dependencia de voltaje de la activación y la inactivación e inclusive afecta, concurrentemente, la selectividad de los iones.

Evidentemente, en ambos casos la interacción con las toxinas provoca una modificación de las propiedades funcionales de los canales [Catterall *et al.* 2007].

1.1 Canales de potasio dependiente de voltaje

Los canales de potasio (K⁺) son los más heterogéneo y más distribuidos en los seres vivos. Por ejemplo, en el genoma humano se encontraron 78 genes relacionados con esta superfamilia de moléculas, que de acuerdo con sus características estructurales y los mecanismos de activación pueden ser divididos en cuatro grupos: canales rectificadores entrantes (K_{ir}) con dos segmentos transmembranales (STM), canales con dos poros y 4 STM (K_{2p}), canales activados por calcio con 6 ó 7 STM (K_{ca}) y canales dependientes de voltaje con 6 STM (K_v), esta última es la familia más grande [Wulff *et al.* 2009].

Los canales K_v, relacionados con el canal *Shaker* identificado en *Drosophila*, están constituidos por cuatro subunidades, cada una de ellas contiene seis segmentos helicoidales que cruzan la membrana celular (S1-S6) y una asa P (*loop P*) extracelular que posee una secuencia consenso de aminoácidos, TXXTXGYGD, en donde X representa cualquier otro aminoácido; la repetición de la secuencia TXGYGD en las cuatro subunidades genera el filtro de selectividad para el ión K⁺. La región que es sensible al voltaje está localizada en el S4, mientras que el poro del canal está formado por los segmentos S5-S6, el asa P ubicada entre S5 y S6 forma un vestíbulo extracelular que ha sido identificado como el sitio de interacción con las toxinas aisladas del veneno de alacranes, víboras y anémonas [Rodríguez de la Vega *et al.* 2003]. En la figura 1.1 se muestra una representación de la subunidad α de un canal K_v con 6 STM, la tetramerización une a las cuatro asas P para formar una boquilla exterior y generar el filtro de selectividad de iones K⁺ en el poro, mientras que la estructura cristalográfica del canal K_v1.2, formado por las cuatro subunidades se muestra en la representación de listones en la figura 1.2 A. La interacción de una toxina (la α-KTx3.2, kaliotoxina) con el vestíbulo del canal *Shaker* se representa en la figura 1.2 B.

1.2 La función de los canales K_v en el potencial de acción

En las células se genera una diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana plasmática debido a la diferencia de concentración de los iones Na⁺, K⁺, Ca²⁺ y Cl⁻ en el interior de la célula y el exterior. En la tabla 1.1 se indica la concentración intracelular y extracelular de estos iones, así como el potencial de equilibrio calculado a 37°C empleando la ecuación de Nernst: .

$$E_{eq} = \frac{RT}{nF} \ln \left[\frac{\text{extracelular}}{\text{intracelular}} \right]$$

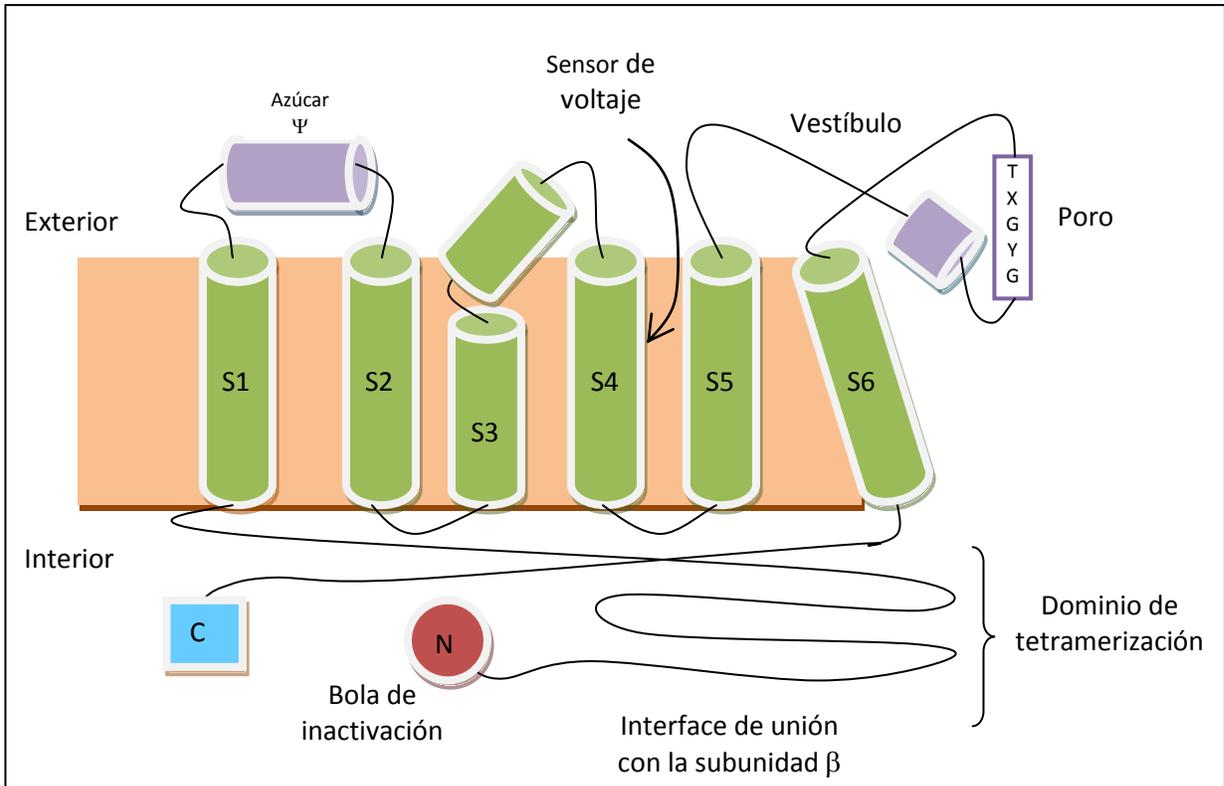


Figura 1.1. Representación esquemática de la subunidad α de un canal Kv con 6 STM.

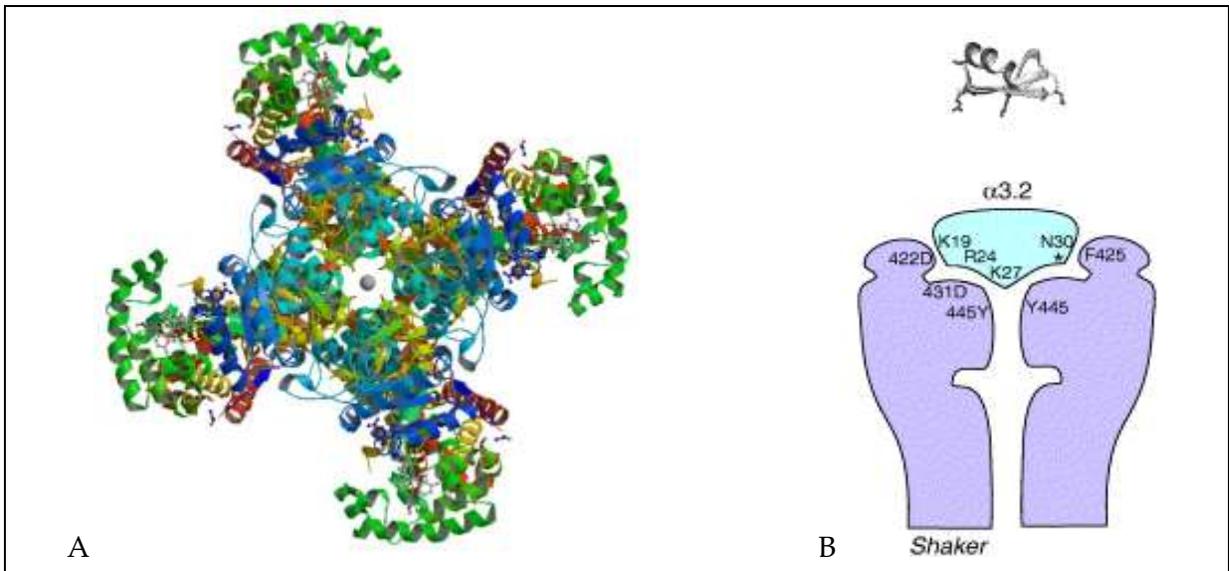


Figura 1.2. Estructura de los canales Kv. A. Vista superior de la estructura cristalográfica del canal Kv1.2 (PDB: 2A79), en donde se observa claramente el poro del canal, formado por la unión de la cuatro subunidades α . B. Representación gráfica de la interacción de la toxina α -KTx3.2 (Kaliotoxina) con el canal *Shaker*, en donde se indican los residuos involucrados en la interacción [Rodríguez de la Vega *et al.* 2003].

Tabla 1.1. Concentraciones iónicas y potenciales de equilibrio (E_{eq}) en células de músculo esquelético de mamífero [Hille 2001].

Ión	[Extracelular], mM	[Intracelular], mM	$E_{eq, 37^{\circ}C}$, mV
Na ⁺	145	12	67
K ⁺	4	155	-98
Ca ²⁺	1.5	0.1	129
Cl ⁻	123	4.2	-90

En las células excitables (aquellas que son sensibles a estímulos eléctricos como las neuronas, las células de músculo cardíaco y las de músculo esquelético) se mantiene un potencial de reposo de ~ -70 mV. Al dispararse el potencial de acción, la membrana se despolariza hacia potenciales positivos, ~ 50 mV, regresando posteriormente al estado de equilibrio.

Durante la despolarización se produce la apertura de los canales de sodio, permitiendo así su difusión al interior celular a favor del gradiente de concentración (ver Tabla 1.1), el aumento de la concentración de iones Na⁺ en el citosol modifica el potencial de membrana (~ 50 mV) acercándose al potencial de equilibrio para este ión (67 mV). En algunas células, el ascenso del potencial de acción puede estar complementado por la apertura de canales de calcio. El potencial se revierte por la acción tardía de canales de potasio dependiente de voltaje. Estos canales son activados por la despolarización de la membrana celular, por lo que al abrirse durante la activación de los canales de sodio y calcio, permiten el flujo de K⁺ hacia el exterior de la célula, induciendo así la repolarización de la membrana. De esta manera los canales Kv inducen una corriente saliente, hiperpolarizante, que neutraliza las corrientes entrantes de los canales de sodio y calcio, que son despolarizantes, figura 1.3 A.

El bloqueo selectivo de los canales de potasio, con diferentes tipos de iones y compuestos químicos, durante el curso del potencial de acción ha sido ampliamente estudiado [Hille 2001]. El descubrimiento de toxinas aisladas del veneno de diversos organismos (abejas, alacranes, anémonas) que bloquean tipos particulares de canales K⁺ permitió la identificación de diferentes canales a través de la inhibición selectiva de las corrientes. Adicionalmente, debido a su alta afinidad y selectividad, algunas toxinas fueron aplicadas como herramientas en la purificaciones de canales de K⁺. [Castle *et al.* 1989]. Tal es el caso de la caribdotoxina (ChTx, PDB: 2CRD), una toxina de 37 aminoácidos purificada del veneno del alacrán *Leiurus quinquestriatus hebraeus.*, que fue ampliamente utilizada para bloquear un subtipo de canal Kv dependiente de calcio, el BK [Miller *et al.* 1985]. El efecto electrofisiológico de la caribdotoxina a una concentración de 3 nM sobre las neuronas piramidales del hipocampo (células CA1), es la prolongación de la duración del potencial de

acción; confirmando la tesis de que los canales BK estaban involucrados en la repolarización [Storm 1987]. En la figura 1.3 B, se observa la recuperación lenta de la repolarización del potencial de acción registrada en células CA1 por el efecto de ChTx 30 nM.

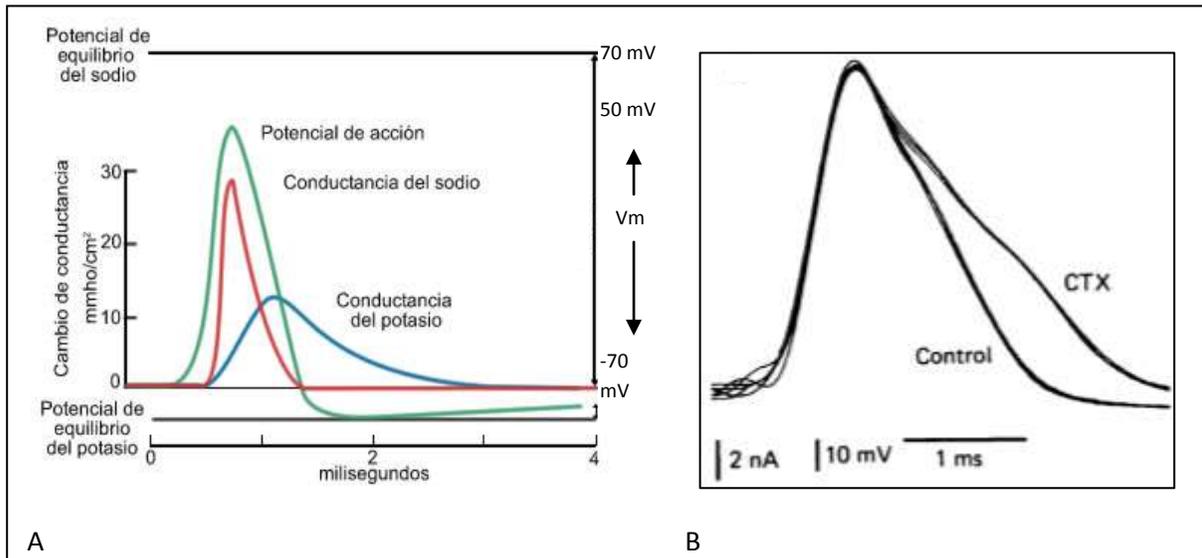


Figura 1.3. Potencial de acción de células excitables. A. Registro temporal de los principales componentes durante el potencial de acción. Se sobreponen las corrientes de Na^+ (rojo) y K^+ (azul) con el potencial de acción en propagación (verde). B. La presencia de ChTx, bloqueador selectivo de canales Kv dependientes de calcio, hace lenta la repolarización del potencial de acción en neuronas del hipocampo.

1.3 Toxinas peptídicas aisladas del veneno de animales

Una estrategia evolutiva muy importante para la sobrevivencia de distintas especies animales es la producción de veneno, que es utilizado como sistema de defensa o de depredación [Favreau y Stöcklin 2009]. Las toxinas se producen y almacenan en glándulas de veneno como péptidos precursores y con frecuencia el veneno que contiene a las toxinas se libera al ser inyectado en la presa. La inyección del veneno en la presa provoca en primera instancia la inmovilización de la misma; esta rigidez es ocasionada por el efecto de toxinas de naturaleza proteica sobre los canales iónicos a los que son afines [Calvete *et al.* 2009]. La inmovilización está relacionada con el bloqueo de las corrientes de potasio, que impiden la repolarización de los impulsos nerviosos. Al efecto causado por las toxinas que actúan sobre canales de potasio se suma el efecto de las toxinas activas sobre canales de sodio, que en conjunto provocan la disfunción completa del impulso nervioso [Vassilevski *et al.* 2009]. De hecho, la acción combinada de estas toxinas afines a distintos tipos de receptores es también causante de una disminución en la liberación de neurotransmisores, y,

finalmente, el efecto de las toxinas bloqueadoras de canales de calcio produce la parálisis y eventualmente la muerte de la presa. La diversidad y la complementariedad entre las toxinas son responsables de que los venenos sean activos sobre un grupo muy amplio de organismos [Kastin 2006].

1.4 Características estructurales de las toxinas peptídicas de origen animal

Las toxinas bloqueadoras de canales iónicos son moléculas de peso molecular bajo, formadas por 22 a 75 aminoácidos y están altamente entrecruzadas por la presencia de varios puentes disulfuro. La formación de las uniones entre cisteínas contribuye a la estabilidad y rigidez de las toxinas, lo que les confiere una estructura tridimensional clave para la posición de las cadenas laterales y la interacción óptima de los ligantes con su receptor. La estructura tridimensional de muchas toxinas, entre ellas algunas que interaccionan con canales de potasio, ha sido determinante para elucidar las bases moleculares de la interacción [Garcia *et al.* 2001, MacKinnon 2003]. Por otra parte, el análisis termodinámico aplicado tanto a las toxinas como a los canales, ha servido como una herramienta para la identificación de las superficies de interacción [Tenenholz *et al.* 2000, Mouhat *et al.* 2005a, Verdier *et al.* 2005, Qiu *et al.* 2009].

La estructura de las toxinas puede presentar una o más hélices α así como una o más hebras β , o bien una combinación de ambos elementos. A pesar de la simplicidad relativa de la estructura aún no se conocen los elementos moleculares responsables del reconocimiento selectivo a los diferentes tipos de canales iónicos y sus subtipos, por lo que la identificación de estos elementos sigue siendo un reto para la investigación científica. De hecho, existen toxinas que muestran estructuras tridimensionales casi idénticas y que actúan sobre diferentes blancos [Fajloun *et al.* 2000, Regaya *et al.* 2004]. Este es el caso de la maurotoxina (PDB: 1TXM) [Rochat *et al.* 1998, Blanc *et al.* 1997] y la HsTx1 (PDB: 1QUZ) [Lebrun *et al.* 1997, Savarin *et al.* 1999], ambas toxinas pertenecen a la subfamilia α -KTx6. La maurotoxina modifica las corrientes de los canales de potasio dependientes de calcio de baja conductancia mientras que, la HsTx1 es un bloqueador potente de los canales Kv1.1 y Kv1.3. Por el contrario, estructuras tridimensionales de toxinas poco relacionadas entre sí pueden tener como blanco al mismo receptor, tal es el caso de las toxinas ShK (PDB: 1ROO) [Tudor *et al.* 1996] y AOSK1 (PDB: 2CK4) [Jaravine *et al.* 1997, Mouhat *et al.* 2005b] que bloquean la corriente de los canales Kv1.3.

En la figura 1.4, se muestran las estructuras tridimensionales de estas moléculas en la representación de listones, las líneas de color índigo indican la posición de los puentes disulfuro. Adicionalmente, la diversidad en el reconocimiento abre una puerta al estudio de la interacción toxina-canal, en donde la implementación de la ingeniería de proteínas ofrece

aplicaciones potenciales al tratamiento de enfermedades relacionadas con la disfunción de canales iónicos [Clark *et al.* 2005, Foster 2009].

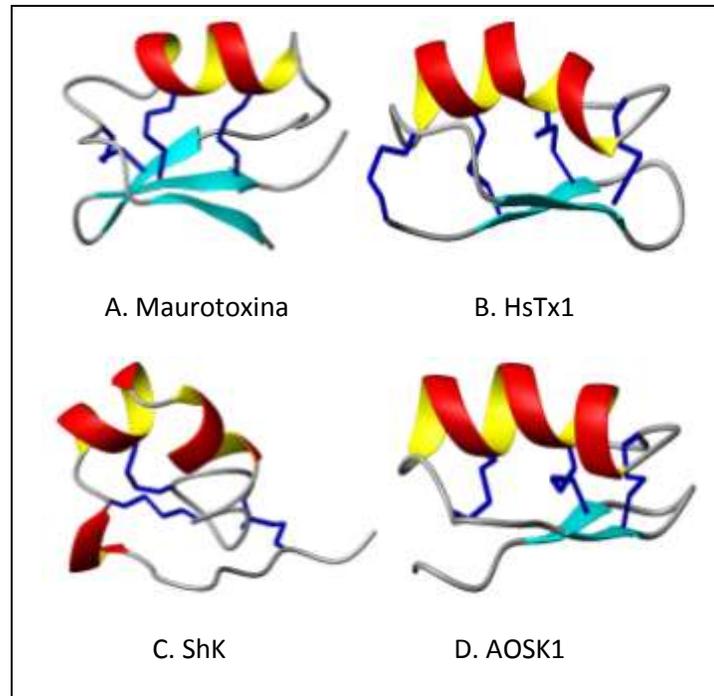


Figura 1.4. Estructura tridimensional en la representación de listones de la maurotoxina, HsTx1, ShK y AOSK1, los puentes disulfuro se indican en color índigo. A pesar de la similitud estructural entre la maurotoxina (A) y la HsTx1 (B), éstas no se unen al mismo receptor. Por el contrario, a pesar de las diferencias estructurales entre las toxinas ShK (C) y la AOSK1 (D) son capaces de unirse al mismo blanco, el canal Kv 1.3.

El motivo de plegamiento más frecuente entre las toxinas de origen animal es originado por la combinación de hélices α y hebras β estabilizadas por la formación de puentes disulfuro ; a esta combinación se le denomina motivo $CS\alpha\beta$, ya que está estabilizada por cisteínas [Kastin 2006]. En este motivo de plegamiento, aproximadamente el 80% de los residuos están expuestos al disolvente. Las secuencias de estructura secundaria que se han reportado son: $\alpha_{3,10}\beta\beta$ (hanatoxina-1, de araña, PDB: 1D1H) [Takahashi *et al.* 2000], $\alpha_{3,10}\beta\beta\alpha$ (dendrotoxina-I, de serpiente, PDB: 1DTX) [Berndt *et al.* 1993], $\alpha\beta\beta$ (maurotoxina, de alacrán, PDB:1TXM) [Blanc *et al.* 1997] y $\beta\alpha\beta\beta$ (caribdotoxina, de alacrán, PDB: 2CRD) [Bontems *et al.* 1992]. El plegamiento $CS\alpha\beta$ es extremadamente versátil en la naturaleza, ya que también ha sido identificado en péptidos con capacidad edulcorante como la brazzeina (PDB: 2BRZ) [Caldwell *et al.* 1998] y en péptidos antimicrobianos como las defensinas (PDB: 1BK8) [Fant *et al.* 1999].

El motivo estructural $\beta\beta\beta$ ($CS\beta\beta\beta$) está constituido por tres hebras β antiparalelas y ha sido reportado ampliamente para toxinas de arañas y animales marinos tales como los caracoles (κ -PVIIA, PDB: 1KCP) [Savarin *et al.* 1998] y las anémonas (BDS-I, PDB: 2BDS y APETx1, PDB: 1WQK) [Clore *et al.* 1989, Chagot *et al.* 2005a y 2005b]. Se han identificado diversas arquitecturas que en conjunto son denominadas como ICK (*inhibitor cystine knot*), en las que un anillo de residuos básicos es estabilizado al menos por dos puentes disulfuro y es atravesado por un tercer puente para formar un nudo de cisteínas. El centro hidrofóbico formado por las hebras β es particularmente un glóbulo compacto muy estable. La identificación de este motivo de plegamiento en distintas especies ha demostrado la evolución convergente que ocurre entre diferentes grupos de organismos [Zhu *et al.* 2003].

El motivo estructural $\alpha\alpha$ ($CS\alpha\alpha$) es muy poco frecuente entre toxinas de origen animal que actúan sobre canales iónicos. A la fecha se han identificado tres tipos de variaciones estructurales: a. Hélices antiparalelas (κ -hefutoxina 1, PDB: 1HP9, OmTx, toxinas de alacrán) [Srinivasan *et al.* 2002, Chagot 2005c], b. Hélices perpendiculares (BgK, toxina de anemona, PDB: 1BGK) [Dauplais *et al.* 1997] y c. Hélices sobrepuestas (ShK, toxina de anemona, PDB: 1ROO) [Castañeda *et al.* 1995]. Las toxinas $CS\alpha\alpha$ con frecuencia tienen como blanco a la familia de canales de potasio dependientes de voltaje.

En la figura 1,5, se observa un ejemplo de cada uno de los motivos de plegamiento que se mencionaron anteriormente y que han sido reportados para toxinas peptídicas aisladas del veneno de distintos organismos ponzoñosos.

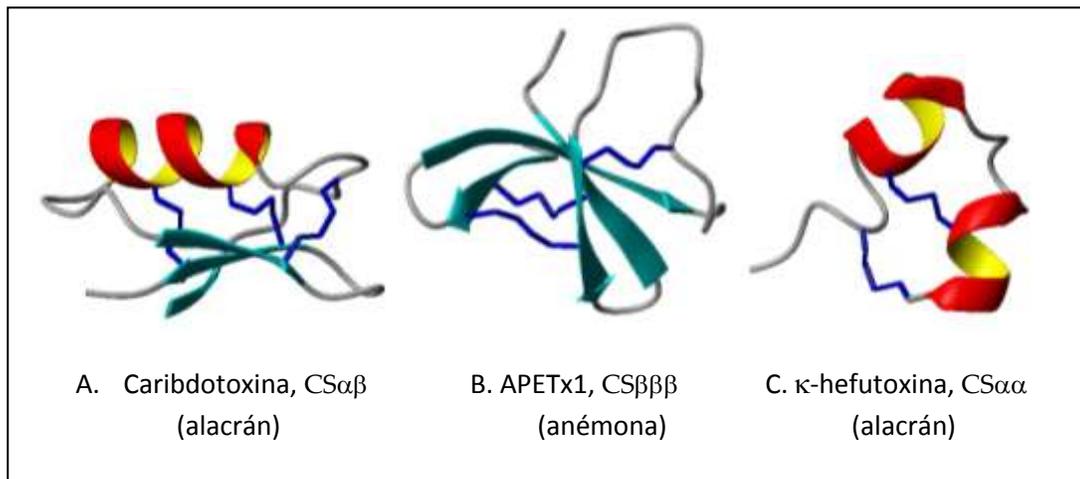


Figura 1.5. Representación de listones de la cadena principal de los diversos motivos de plegamiento reportados para toxinas peptídicas, los puentes disulfuro están indicados en azul. A) Caribdotoxina, $CS\alpha\beta$. B) APETx1, $CS\beta\beta\beta$. C) κ -hefutoxina $CS\alpha\alpha$. Los puentes disulfuro están indicados en color índigo.

1.5 Mecanismos de interacción del complejo toxina-canal

Se han propuesto diversos modos para la interacción de las toxinas y los canales iónicos. En primera instancia se han encontrado toxinas que se unen en los segmentos transmembranales S3 y S4, que corresponden al sensor de voltaje, provocando una modificación del mecanismo de apertura y cierre de la compuerta del canal (*gating*). Estas toxinas, que han sido aisladas del veneno de arañas y son activas frente a canales de las familias Kv2 y Kv4, son capaces de penetrar parcialmente la bicapa lipídica de la membrana celular y estabilizarse en la región en donde se ubica el sensor del potencial electrostático [Milescu *et al.* 2007]. La interacción se explica por la presencia de una superficie no polar que permite la estabilización con las cadenas hidrofóbicas y un anillo de residuos polares que interactúan con el canal. La hanatoxina 1 (PDB: 1D1H) [Lee 2003] y la SGTx1 (PDB: 1LA4) [Wang *et al.* 2004] presentan este mecanismo frente a canales Kv2.1.

Un segundo mecanismo de interacción ocurre entre la hélice α de las toxinas y la región del vestíbulo o torreta del canal, el cual está localizado en una zona extracelular en el asa conectora del segmento transmembranal S5 y el filtro de selectividad. Esta interacción ha sido demostrada tanto para toxinas de alacrán como de anémone [Xu *et al.* 2003]. La ergtoxina (PDB: 1PX9), aislada del veneno del alacrán *Centruroides noxius Hoffman*, es un péptido de 42 aminoácidos estabilizado por cuatro puentes disulfuro que se une en la región del vestíbulo del canal *HERG* (*human ether-a-go-go related*) en una posición muy distante del poro [Pardo-López *et al.* 2002, Frénel *et al.* 2004].

El tercer mecanismo de interacción que se ha propuesto es el más frecuente para toxinas que se unen a canales de potasio, y consiste en una oclusión física del poro del canal a través de un residuo básico (frecuentemente lisina) presente en la región de la hoja β de las toxinas con estructura $CS\alpha\beta$, representado en la figura 1.2 B. A las toxinas de esta categoría se les denomina bloqueadores del poro y suelen tener como blanco de interacción a canales de la familia Kv1.x. El ejemplo clásico de esta interacción está dado por la agitoxina 2 (PDB: 1AGT) y el canal *Shaker* K⁺ [Krezel *et al.* 1995, Gross y MacKinnon 1996]. Hace poco más de una década, se propuso que estas toxinas poseen un par de residuos —un residuo aromático (Tyr, Phe o Trp) y un residuo básico (Arg o Lys)— a los que se les ha llamado la díada funcional, y que son la llave molecular para la formación del complejo toxina-canal [Mouhat *et al.* 2004a]. Las díadas han sido identificadas en toxinas de diversas especies animales independientemente del tipo de plegamiento y del patrón de apareamiento de las cisteínas [Dauplais *et al.* 1997, Mouhat *et al.* 2008]. Un hecho relevante es que las díadas de las toxinas que interactúan con canales de la familia Kv1 se superponen espacialmente; sin embargo, la existencia de toxinas (P1, PDB: 1N8M y OmTx3, PDB: 1QWE) que no poseen la díada, indica que deben existir otros determinantes moleculares que son necesarios para la

interacción y que ésta es más bien el resultado de una interacción multipuntual [Mouhat *et al.* 2004b, Chagot 2005a]. Otra evidencia de este hecho es la demostración de que la interacción es mediada a través de una región de la toxina con marcada carga positiva. Este mecanismo fue identificado en la toxina *pl14a*, aislada del veneno del caracol *Conus planorbis* [Imperial *et al.* 2006], en donde se sugiere que la unión entre la toxina y el canal Kv1.6 está favorecida por la presencia de un anillo de residuos básicos, en donde también la toxina cubre a manera de una tapa el poro del canal [Mondal *et al.* 2007].

1.6 El veneno del alacrán *Tityus trivittatus*

A la fecha han sido clasificadas alrededor de 1500 especies de alacranes; sin embargo, solamente la picadura de cerca de 25 de ellas puede ser considerada peligrosa para los humanos. En el continente americano las especies de alacranes que son un problema de salud pública pertenecen a la familia *Buthidae*; dentro de ellas resaltan las del género *Centruroides* (Norteamérica) y *Tityus* (Sudamérica). En este último destacan las especies *Tityus serrulatus* y *Tityus trivittatus*, ampliamente distribuidas en Brazil y Argentina, respectivamente. De la picadura de *T. trivittatus* se han reportado casos de intoxicación severa e inclusive letal [Cologna *et al.* 2009, De Roodt *et al.* 2010].

Si bien desde hace varios años comenzó a estudiarse el veneno de *T. trivittatus*, es muy poco lo que se conoce de sus componentes [De Roodt *et al.* 2003]. A la fecha solamente se han reportado cuatro secuencias de péptidos aislados del veneno de este alacrán, las cuales se indican en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2. Péptidos identificados en el veneno de *T. trivittatus*. Se incluye el código de acceso en la base de datos UNIPROT y la secuencia de aminoácidos, resaltando la posición de las cisteínas.

Nombre	Código	Secuencia
Potassium channel toxin α -KTx 20.1	P0C183	GCTPEY C SMW CKVKVSQNY C VKN C K C PGR
Potassium channel toxin α -KTx 12.2	P0C168	WCST C LDL A C GASRE C YD F C FKA F G R A H G K CMNN K C R C Y T
Potassium channel toxin Ttr- β -KTx	Q0GY46	MERKWALLLF LGMVTLV S C G LREK H VQ K LV ALIPNDTVRS ILKAVV H KAA KTQ F G C PAYE GY C NN H C Q D I KR K D G E C H G F K C K C A K D
Potassium channel toxin TtrKIK	Q0GY45	MVATNR C C VF ALLFALLLV H SLTEAG K G K E VLG K IK D KL I EAK D IK S GW ERL T SQ S EY A C PAIE K F C ED H CAAK K AV G K C DD F K C N C IK L

La toxina α -KTx 20.1 es un péptido de 29 aminoácidos que presenta una identidad baja en la secuencia con respecto a las familias conocidas, menor al 40%. Por esta razón fue

identificada como el primer miembro de la subfamilia KTx20. Para esta toxina los puentes disulfuro no fueron determinados experimentalmente, sin embargo, la presencia de seis cisteínas en la secuencia permitió asumir que la toxina adoptaba el plegamiento CS $\alpha\beta$ con la conectividad clásica entre cisteínas: C1-C4, C2-C5 y C3-C6. Por otra parte, al estudiar su actividad frente a canales de potasio se encontró que bloquea preferencialmente las corrientes de canales de potasio dependientes de voltaje, específicamente el Kv1.3, obteniéndose una EC50 = 7.9 \pm 1.4 nM [Abdel-Mottaleb *et al.* 2006].

La toxina α -KTx12.2, también conocida como butantoxina, es un péptido de 40 aminoácidos cuya secuencia es idéntica a los péptidos 12.1 y 12.4 que fueron aislados de veneno de los alacranes brasileños *T. serrulatus* y *T. stigmurus*. Es una proteína CS $\alpha\beta$ estabilizada por cuatro puentes disulfuro con conectividades C1-C2, C3-C6, C4-C7 y C5-C8, conformada por dos hebras beta y un hélice alfa, cuya estructura fue determinada en disolución mediante datos de RMN (PDB 1C55). La toxina alfa-KTx12.1 bloquea reversiblemente al canal Kv *Shaker* con una Kd aproximada de 660 nM e inhibe la proliferación de las células T, así como la producción de la citocina interleucina-2 [Holaday *et al.* 2000].

Las toxinas Ttr- β -KTx y TtrKIK son péptidos relacionados con la familia de las escorpinas, que dada su similitud secuencial con la toxina BmTxK β fueron clasificadas como miembros de la familia de toxinas β -KTx, por lo que probablemente son bloqueadores de las corrientes de canales de potasio que adoptan la estructura CS $\alpha\beta$. Hasta el momento, su función no ha sido identificada; sin embargo, su amplia distribución en los alacranes de la familia *Buthidae* sugiere que deben de tener un papel relevante en la biología del veneno [Diego-García *et al.* 2007].

1.6.1 Descubrimiento de la toxina Tx1

Además de las toxinas indicadas en la Tabla 1.1, en el grupo de investigación del Dr. Lourival D. Possani (Instituto de Biotecnología, UNAM) se aisló del veneno de *T. trivittatus* una toxina peptídica de 28 aminoácidos, cuya secuencia guarda una identidad del 65% con la toxina KTx 20.1 y a la que informalmente se le denominó Tx1:



Al realizar los ensayos analíticos para la determinación de los puentes disulfuro en la Tx1 mediante hidrólisis enzimática, se encontraron evidencias de la formación de un puente disulfuro entre las cisteínas C1 y C5; sin embargo, no fue posible establecer la conectividad entre las otras cistinas. La formación del puente C1-C5 es completamente inusitada para

toxinas de alacrán, ya que para las toxinas conocidas con seis cisteínas el patrón de apareamiento es C1-C4, C2-C5 y C3-C6. Más aún, la conectividad C1-C5 es extremadamente poco frecuente, ya que solamente ha sido identificado en una toxina de anémoma, la BDS-I (PDB: 2BDS), que tiene una estructura tridimensional conformada por tres hebras beta antiparalelas y que actúa como un modificador de la corriente del canal Kv 3.4 [Driscoll *et al.* 1989].

Debido al interés por confirmar la conectividad completa entre cisteínas y determinar la estructura tridimensional en disolución, se obtuvieron los espectros de resonancia magnética protónica necesarios para ello: COSY, TOCSY y NOESY. Sin embargo, debido a la escasa cantidad de toxina aislada del veneno del alacrán, los espectros obtenidos carecían de señales suficientes que permitieran establecer la secuencia entre residuos. Adicionalmente, estudios preliminares de electrofisiología, indicaron que la toxina Tx1 bloquea preferencialmente al canal de potasio Kv1.2, a una concentración de magnitud nanomolar. A razón de la insuficiencia de la toxina nativa tampoco fue posible completar la evaluación de la actividad frente a este canal.

Fue así como se planeó la obtención recombinante de la toxina Tx1, para determinar su estructura tridimensional en disolución y establecer su acción frente a canales de potasio, lo que dio origen al presente trabajo de investigación.

1.7 Determinación de la estructura tridimensional de biomoléculas en disolución

Durante los últimos 20 años, la espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) aplicada al estudio de macromoléculas biológicas en disolución ha demostrado su potencial de aplicación para realizar estudios de estructura y función a nivel atómico [Wüthrich 2003]. A finales del año 2011, se habían registrado poco más de 9100 estructuras resueltas mediante métodos de RMN en el *Protein Data Bank* [Berman *et al.* 2000], que corresponden al 12% de las moléculas depositadas. Además, la RMN ha contribuido significativamente al estudio de las ciencias biológicas no solamente en el área de la caracterización estructural de biomoléculas [Ferentz y Wagner 2000] sino también en el conocimiento de las interacciones dinámicas entre ellas [Mittermaier y Kay 2006].

1.7.1 RMN y estructura de proteínas

La determinación de la estructura de proteínas a partir de datos de RMN está basada en el método desarrollado por Kurt Wüthrich [1986], que a la postre lo haría merecedor del Premio Nobel de Química en 2002 "*for the development of methods for identification and structure analyses of biological macromolecules*". Los datos de RMN necesarios para la determinación de la estructura tridimensional de una proteína están basados en la medición

del efecto nuclear Overhauser (NOE) y de las constantes de acoplamiento escalar y dipolar. Para ello, es necesario identificar sin ambigüedad los desplazamientos químicos de los átomos, lo que implica que para el análisis de una proteína empleando ^1H -RMN bidimensional, es indispensable asignar las señales originadas por cada uno de los átomos de hidrógeno presentes en la molécula.

De forma esquemática, la ruta de análisis implementada para la determinación de la estructura 3D en disolución de una proteína está indicada en la figura 1.6.

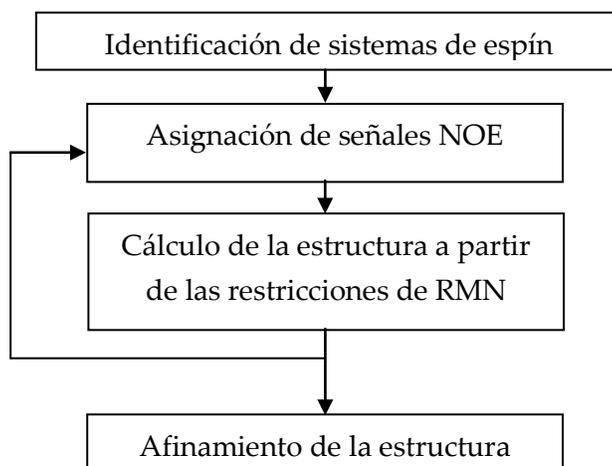


Figura 1.6. Esquema general del procedimiento para la obtención de la estructura de una proteína a partir de los datos de RMN. Un sistema de espín es un grupo de espines conectados por acoplamiento escalar.

1.7.2 Efecto Nuclear Overhauser

Las restricciones de distancia derivadas del NOE son el parámetro más importante para establecer el arreglo espacial de la molécula, ya que son esenciales para definir la estructura secundaria y terciaria porque indican que los átomos de hidrógeno, que generan la correlación, están separados por una distancia menor a 5 Å. El NOE refleja los mecanismos de relajación entre espines que están acoplados por una interacción dipolo-dipolo. En el espectro NOESY, las señales que ahí se observan están derivadas del NOE, en donde el volumen (V) de la señal se relaciona con la distancia (r) que separa a los dos espines:

$$V \propto \langle r^{-6} \rangle f(\tau_c)$$

El valor promedio de la distancia (r), indica que la molécula tiene una flexibilidad intrínseca. Por otra parte, la dependencia de la transferencia de la magnetización debida al movimiento

de la molécula queda incluida como función del tiempo de correlación (τ_c). Dado que las moléculas globulares son relativamente rígidas, se asume que existe una conformación compatible entre las señales NOE, por lo que el volumen de las mismas es proporcional en todos los átomos de la molécula. Durante el cálculo de la estructura las restricciones derivadas del NOE son consideradas como las distancias interatómicas máximas que separan a dos átomos [Cavanagh *et al.* 2007].

1.7.3 Constantes de acoplamiento escalar

La segunda fuente de información estructural se deriva del acoplamiento escalar entre átomos que están separados por tres enlaces covalentes, 3J . Las 3J están relacionadas con el ángulo diedro θ , a través de las ecuaciones de Karplus. Las relaciones más utilizadas son:

$$^3J_{HNHa} = 6.4 \cos^2 \theta - 1.4 \cos \theta + 1.9$$

$$^3J_{HaHb} = 9.5 \cos^2 \theta - 1.6 \cos \theta + 1.8$$

La $^3J_{HNHa}$ denota la constante de acoplamiento escalar entre el protón de amida de la cadena principal y el protón alfa, $^3J_{HaHb}$ es el acoplamiento entre los protones alfa y beta de la cadena lateral. Estas constantes proporcionan información únicamente de la conformación local de la cadena, por lo que son utilizadas para obtener la asignación estereoespecífica de protones diastereotópicos (H_β) y determinar los ángulos diedros, χ_1 . Una variación del experimento COSY, el e-COSY (*e, exclusive*), usualmente es utilizada para hacer estas mediciones, ya que debido a sus características, las constantes de acoplamiento pueden ser medidas con precisión [Cavanagh *et al.* 2007].

1.7.4 Esquema general de la RMN bidimensional

Un experimento de RMN en dos dimensionales está constituido por cuatro etapas sucesivas: preparación, evolución, mezclado y detección. El periodo de preparación, normalmente está conformado por un tiempo de espera (t_a), durante el cual se alcanza el equilibrio térmico, seguido por uno o varios pulsos de radiofrecuencia que generan la *coherencia* (que corresponde a la magnetización transversal que genera las transiciones entre los espines). Durante la evolución, la coherencia se modifica (evoluciona) y al final de este intervalo el sistema asume un estado específico que depende del tiempo t_1 . La etapa de mezclado, τ_m , incluye uno o varios pulsos de radiofrecuencia e intervalos de espera, en este periodo la coherencia es transferida entre los espines. Durante la detección el sistema evoluciona y se registra el decaimiento libre de la inducción (*fid, free induction decay*). En un espectro en 2D, las frecuencias de precesión durante la evolución y la detección determinan las coordenadas de las señales (ω_1, ω_2) [Wüthrich, 1986].

En el experimento COSY (que fue el prototipo de los experimentos bidimensionales y a la fecha todavía es ampliamente utilizado), la magnetización es transferida a través del acoplamiento escalar y solamente los protones que están unidos hasta a tres enlaces covalentes de distancia generan señales fuera de la diagonal. En el experimento TOCSY, la magnetización es transferida a través del sistema de espín de un aminoácido vía el acoplamiento escalar sucesivo, permitiendo la correlación de todos los protones del sistema y generando los patrones característicos del mismo. En el experimento NOESY, se registra la interacción dipolar entre espines debida al efecto NOE, por lo que la correlación entre dos átomos depende de la distancia espacial entre ellos; normalmente las señales se generan cuando la distancia es $\leq 5 \text{ \AA}$ [Keeler 2002]. En la figura 1.7, se muestran las secuencias de pulsos de los espectros COSY, TOCSY y NOESY.

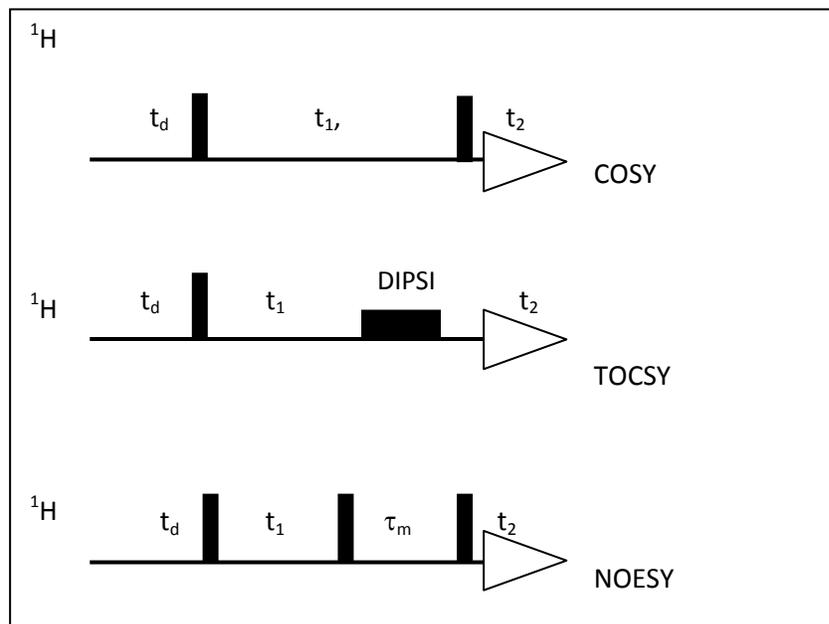


Figura 1.7. Secuencias de pulsos de los experimentos COSY, TOCSY y NOESY. Las barras verticales indican la aplicación de un pulso de 90° , el triángulo indica la adquisición del *fid*. DIPSI es el acrónimo de *Decoupling In the Presence of Scalar Interactions* o desacoplamiento en presencia de interacciones escalares; representa un conjunto de pulsos específicamente diseñado para realizar el mezclado isotrópico [Keeler 2002].

1.7.5 Asignación secuencial de las señales

A la identificación de las señales de ^1H -RMN de los sistemas de espín de aminoácidos vecinos, a través de las correlaciones debidas al acoplamiento escalar (COSY, TOCSY) o al acoplamiento dipolar (NOESY), se le llama asignación secuencial. Una descripción del procedimiento de interpretación de espectros de RMN de proteínas fue reportada previamente por Vera [2002] y Saucedo [2003].

El patrón de las señales de resonancia generado en los espectros COSY y TOCSY permite la identificación parcial de los sistemas de espín. Existen aminoácidos, como la Gly (AX), Ala (A₃X) y Val (A₃B₃MX) cuyas señales son distintivas y fácilmente distinguibles, sin embargo, los sistemas de espín de Asp, Asn, Cys, Ser, His, Phe, Trp y Tyr (todos AMX) generan patrones de señales muy similares entre sí. En total los veinte aminoácidos más comunes generan diez tipos de patrones distintos entre los protones alifáticos (ver Anexo A.1). Es por ello que para realizar la asignación es indispensable conocer la secuencia primaria de los aminoácidos. Como ejemplo de la asignación de un sistema de espín, en la figura 1.8, se muestran las señales COSY (A, rojo) y TOCSY (B, rojo y verde) esperadas para la valina, además de la identificación de estas señales en un espectro TOCSY real, en donde la distorsión de algunas señales se debe al traslape con otros sistemas de espín. En la sección de anexos se incluyen los patrones de las señales COSY y TOCSY de cada uno de los veinte aminoácidos más comunes.

La información necesaria para obtener las conectividades secuenciales entre sistemas de espín vecinos es conseguida a través del análisis de la región de los H_N, en el intervalo comprendido entre 6.0 y 11.0 ppm del espectro NOESY. Ya que es esta región en donde aparecen fuera de la diagonal las correlaciones H_N-H_α, H_N-H_N y H_N-H_β (que generan respectivamente las restricciones de distancia d_{αN}, d_{NN}, d_{Nβ}), aunque en la práctica es necesaria la visualización simultánea de los espectros COSY, TOCSY junto con el NOESY para identificar sin ambigüedad estas correlaciones.

Debido a que el efecto NOE es una función de la distancia interatómica, que no depende del acoplamiento escalar, es posible ligar sistemas de espín de residuos adyacentes en la secuencia, y también de sistemas de espín que espacialmente se encuentran próximos entre sí, aunque secuencialmente se encuentren muy distantes. Las correlaciones NOE se denotan utilizando la nomenclatura d_{AB}(i,j), por ejemplo d_{βN}(i,i+1) o d_{NN}(i,i+3). En la figura 1.9, se muestran algunas de las correlaciones que se presentan entre los átomos de residuos que son vecinos secuenciales. La asignación de señales obtenida de esta forma no permite realizar asignaciones estereoespecíficas para los protones de un grupo metileno, o de los metilos en los fragmentos isopropilo de la valina o leucina; para obtener estas asignaciones es necesario adquirir espectros heteronucleares con las proteínas enriquecidas isotópicamente con ¹³C y/o ¹⁵N [Wüthrich, 1986].

Para ilustrar las correlaciones derivadas del NOE que deben ser asignadas, en la figura 1.10, se muestra el espectro NOESY de una toxina peptídica de 30 aminoácidos. En la región de los protones de amida (zona ampliada) son distinguibles las correlaciones H_N-H_N entre vecinos secuenciales (i, i+1) y (i, i+2).

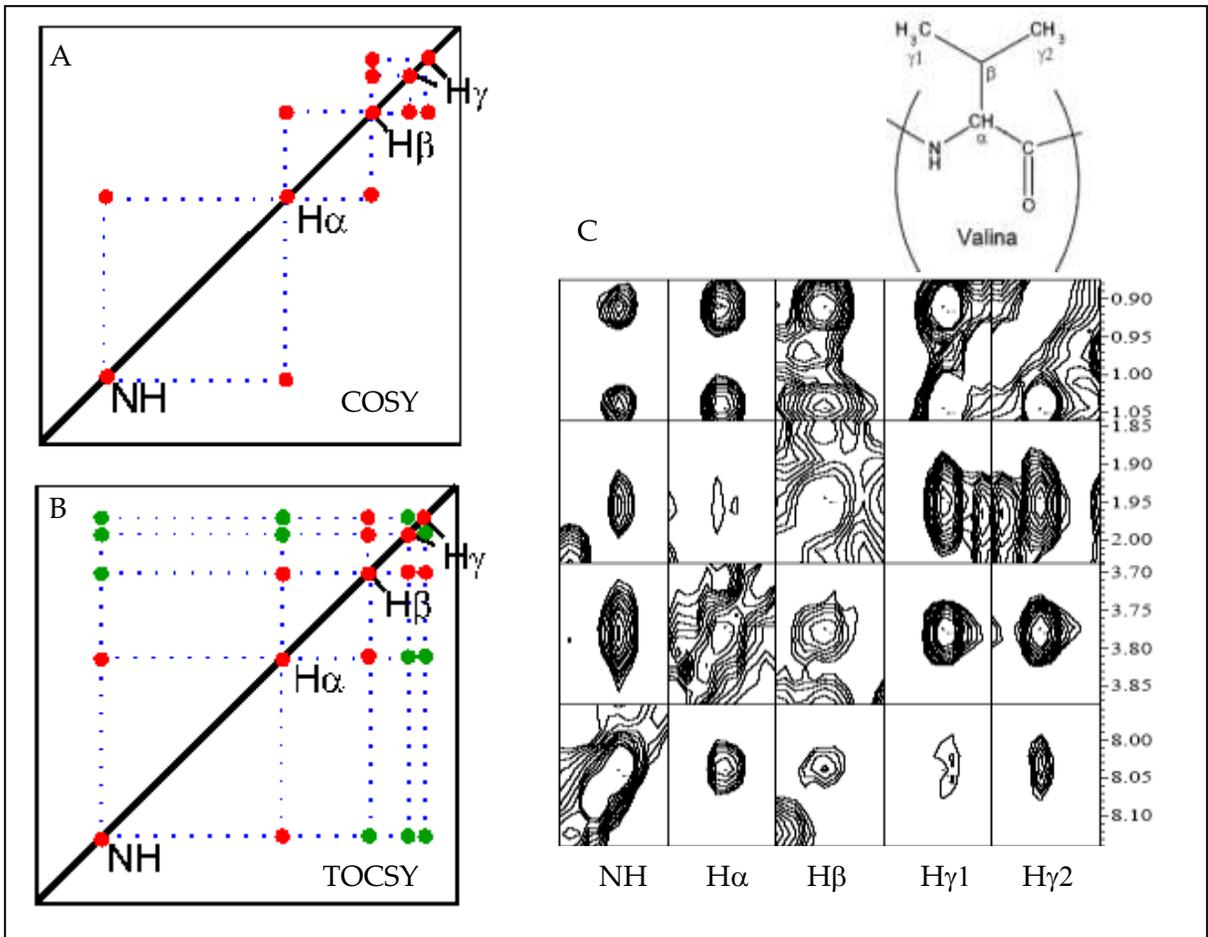


Figura 1.8. Sistema de espín de la valina. Señales esperadas para los espectros COSY (A) y TOCSY (B). La identificación de las señales de la valina en un espectro TOCSY se indica en (C).

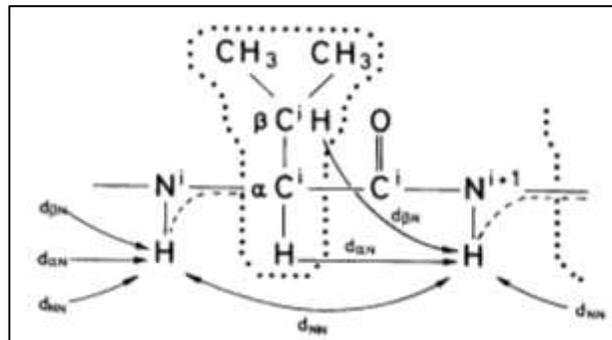


Figura 1.9. Ejemplos de algunas de las correlaciones que se observan entre vecinos secuenciales. Estas correlaciones trazan la ruta de la asignación de señales de una cadena proteínica [Wüthrich 1986].

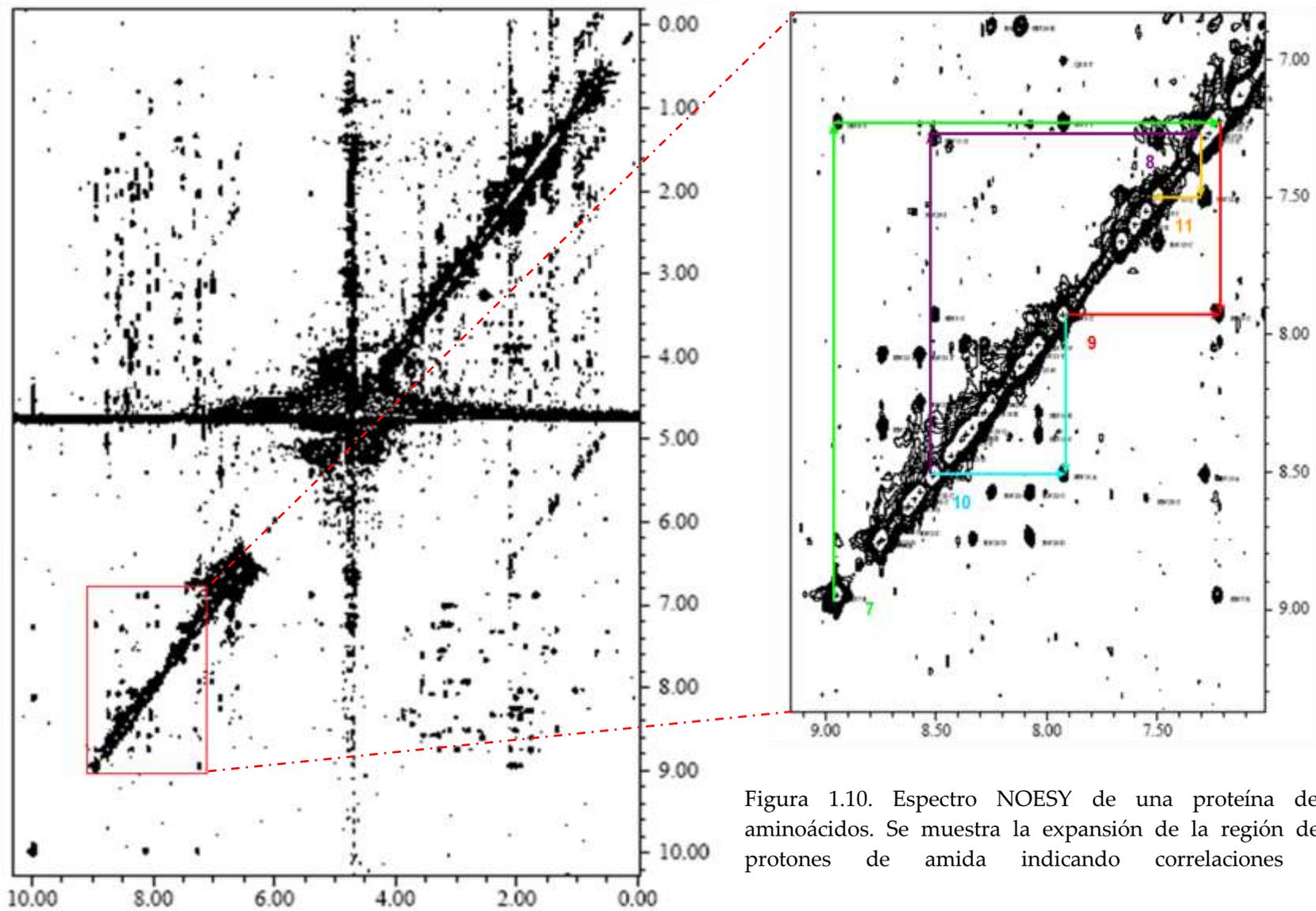


Figura 1.10. Espectro NOESY de una proteína de 30 aminoácidos. Se muestra la expansión de la región de los protones de amida indicando correlaciones dNN.

1.7.6 Distancias ^1H - ^1H en la estructura secundaria de las proteínas

La formación de elementos de estructura secundaria en un polipéptido define una variedad de correlaciones NOE de medio y largo alcance. La hélice alfa se caracteriza por presentar contactos H_N - H_N entre los residuos i e $(i+3)$ y entre los residuos i e $(i+4)$. En la hélice 3_{10} se establecen contactos entre i e $(i+2)$, así como también i e $(i+3)$. En los giros se observan contactos entre los residuos i e $(i+2)$. En las hebras beta, se forman segmentos de cadenas extendidas, lo cual excluye los contactos de corto alcance entre protones de amida, sin embargo, se observa la interacción H_N - H_N entre las hebras vecinas i y j . Tanto en las hélices como en las hebras los contactos de corto alcance, H_N - H_α , H_α - H_α , forman una densa red de contactos que define los elementos regulares de estructura secundaria [Wüthrich 1986]. En la figura 1.11, se señalan los contactos interatómicos que se presentan en los distintos elementos de estructura secundaria, mientras que en la tabla 1.3, se indican las distancias observadas en estas estructuras.

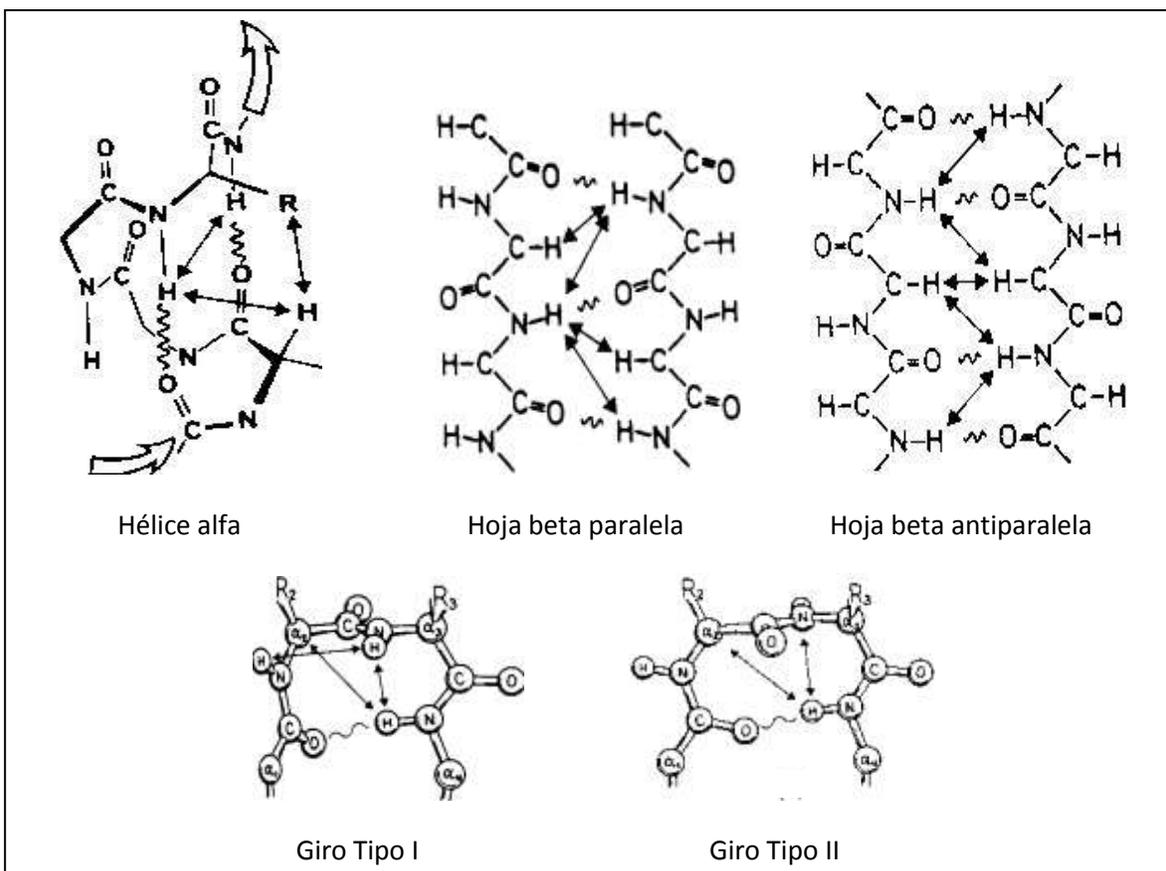


Figura 1.11. Contactos interatómicos que se observan en los distintos elementos de estructura secundaria. Las flechas indican distancias secuenciales ^1H - ^1H de corto y medio alcance [Wüthrich K, 1986].

Tabla 1.3. Distancias interatómicas de corto y medio alcance que identifican a los distintos elementos de estructura secundaria de las proteínas [Wüthrich 1986].

Distancia (Å)	Hélice α	Hélice 3_{10}	Hebra β antiparalela	Hebra β paralela	Giro Tipo I	Giro Tipo II
$d_{\alpha N}(i,i)$	2.7	2.7	2.8	2.8	2.8	2.7
$d_{\alpha\beta}(i,i)$	2.2-2.9	2.2-2.9	2.2-2.9	2.2-2.9	2.2-2.9	2.2-2.9
$d_{\beta N}(i,i)$	2.0-3.4	2.0-3.4	2.4-3.7	2.6-3.8	2.0-3.5	2.0-3.4
$d_{\alpha N}(i,i+1)$	3.5	3.4	2.2	2.2	3.4	2.2
$d_{NN}(i,i+1)$	2.8	2.6	4.3	4.2	2.6	4.5
$d_{\beta N}(i,i+1)$	2.5-3.8	2.9-3.0	3.2-4.2	3.7-4.4	2.9-4.1	2.6-4.4
$d_{\alpha N}(i,i+2)$	4.4	3.8			3.6	3.3
$d_{NN}(i,i+2)$	4.2	4.1			3.8	4.3
$d_{\alpha N}(i,i+3)$	3.4	3.3			3.1-4.2	3.8-4.7
$d_{\alpha\beta}(i,i+3)$	2.5-4.4	3.1-5.1				
$d_{\alpha N}(i,i+4)$	4.2					
$d_{\alpha N}(i,j)$			3.2	3.0		
$d_{\alpha N}(i,j)$			3.3	4.0		
$d_{\alpha\alpha N}(i,j)$			2.3	4.8		

1.7.7 Cálculo de la estructura

En los últimos años, el programa CYANA ha sido ampliamente utilizado para hacer la asignación automática del espectro NOESY y el cálculo de la estructura, una vez que se proporcionan los datos de la secuencia de aminoácidos y los desplazamientos químicos de los sistemas de espín. CYANA utiliza un algoritmo de función objetivo variable, en el que el ajuste gradual de las restricciones de RMN a través de varios ciclos de cálculo usando dinámicas de ángulo de torsión, proporciona un conjunto de estructuras de baja energía. En este programa, el módulo CANDID, realiza la asignación automática de espectro NOESY, empleando los siguientes pasos [Güntert 2004]:

1. Lectura de datos experimentales. Incluye la secuencia de aminoácidos, la lista de desplazamientos químicos, las posiciones de los picos fuera de la diagonal del espectro NOESY y el volumen de los mismos. Adicionalmente se pueden incluir las restricciones conformacionales derivadas de la medición de constantes de acoplamiento escalar.
2. Generación de las asignaciones iniciales. Se crea una lista que incluye los desplazamientos químicos proporcionados dentro de un intervalo de tolerancia.

3. Clasificación de las asignaciones iniciales. Para cada señal NOESY ubicada fuera de la diagonal, la asignación es ponderada por lo que se descartan las asignaciones iniciales que no cumplen los requisitos de auto-consistencia.
4. Calibración de las restricciones de distancia. El volumen de los picos del espectro NOESY es clasificado de acuerdo a la magnitud de su valor; de esta manera se obtienen señales NOE de corto, medio y largo alcance. A la par se descartan las restricciones ambiguas.
5. Eliminación de señales espurias. Se conservan únicamente aquellas asignaciones que son utilizadas al menos una vez en el anclaje de la red de restricciones y que son compatibles con la estructura a lo largo de los diversos ciclos de cálculo.
6. Combinación de restricciones. En los primeros ciclos se combinan restricciones experimentales de largo alcance con restricciones virtuales generadas a partir de las restricciones originales.
7. Cálculo de la estructura. Utilizando dinámicas de ángulo de torsión, la estructura 3D de la proteína es incluida como archivo de entrada para el siguiente ciclo. Entre los ciclos subsecuentes la información es transferida a través de la generación de "intermediarios" de estructura, en donde las señales que no se utilizan son temporalmente descartadas. El cálculo típico está conformado por siete ciclos.

Debido a la complejidad del problema, en donde la solución debe de satisfacer a las restricciones generadas por todos los átomos de la molécula, CYANA utiliza como parámetro de medición una función objetivo que mide la concordancia entre la estructura y las restricciones utilizadas. Esta función tiene un valor de cero únicamente cuando todas las restricciones experimentales se satisfacen y los pares de átomos no enlazados no presentan traslape estérico.

El algoritmo de minimización de CYANA está basado en un procedimiento de recocido simulado (*simulated annealing*) a través de la dinámica de ángulos de torsión. Inicialmente se hace una minimización que reduce la energía de las interacciones, posteriormente se alcanza una fase de alta temperatura, seguida por un enfriamiento lento y una minimización final. La estructura calculada se representa como un conjunto constituido por 20-40 conformeros sobrepuestos que tienen un valor relativamente bajo de RMSD (*Root mean square deviation* o desviación de la raíz cuadrada de la media cuadrática es una medida de la distancia promedio entre los átomos de proteínas sobrepuestas), ordenados de acuerdo a su energía.

Los criterios generales de evaluación de las estructuras obtenidas utilizando CYANA son:

- a) Obtener un valor de función objetivo menor a 250 \AA^2 en el ciclo 1.
- b) Obtener un valor de función objetivo final menor a 10 \AA^2 .

- c) Obtener menos del 20% de señales NOE sin asignar.
- d) Obtener menos del 20% de señales NOE de largo alcance sin descartar.
- e) Que el ensamble de estructuras del primer ciclo tenga un valor de RMSD menor a 3 Å, lo que implica que la diferencia de RMSD entre el primer y último ciclo sea menor a 3 Å para los átomos de la cadena principal.

2. OBJETIVO GENERAL

Determinar la estructura tridimensional en disolución de la toxina Tx1, una toxina con una secuencia poco conservada y características únicas, para establecer espectroscópicamente la conectividad entre las cisteínas e identificar los sitios de interacción con su receptor.

2.1 Objetivos particulares.

1. Establecer las condiciones óptimas para la expresión heteróloga en *E. coli* de la toxina Tx1, con el fin de obtenerla en cantidad suficiente para realizar estudios espectroscópicos y fisiológicos.
2. Purificar y realizar la caracterización espectroscópica de la toxina recombinante Tx1.
3. Realizar estudios de la actividad biológica de la toxina recombinante.
4. Obtener los espectros de 2D-¹H-RMN necesarios para la elucidación estructural.
5. Realizar el afinamiento de la estructura obtenida con datos de RMN empleando dinámica molecular.
6. Interpretar y analizar los espectros de 2D-¹H-RMN de la toxina nativa.
7. Comparar las estructuras entre las toxinas nativa y recombinante.

3. HIPÓTESIS

La toxina Tx1 posee una secuencia de aminoácidos poco conservada por lo que su estructura tridimensional exhibe características distintas a los motivos de plegamiento conocidos para este tipo de moléculas.

4. MÉTODOS

"Me lo contaron y lo olvidé; lo vi y lo entendí; lo hice y lo aprendí."

Confucio

4.1 Expresión de la proteína recombinante

La estrategia general para el diseño y clonación del gen de la toxina Tx1 fue un trabajo realizado en colaboración con el Dr. Luis Brieba de Castro (Laboratorio de Genómica para la Biodiversidad, CINVESTAV Unidad Irapuato), que se basó en la producción heteróloga de proteínas utilizando como sistema de expresión a *E. coli*.

El diseño del gen codificante de la Tx1 se hizo con base en la secuencia de aminoácidos de la toxina determinada mediante la degradación de Edman, seleccionando los codones apropiados para la expresión en *E. coli*. Para la construcción del inserto se sintetizaron dos oligonucleótidos de 76 pares de bases cada uno, que tienen 33 bases que son complementarias. El gen codificante de la toxina Tx1 diseñado con los codones optimizados tiene la secuencia 5'-GGTTGTATGCCAGAGTACTGTGCAGGTCAATGTCTG-TGGCAAGGTGAGCCAGGATTATGCCTGAAGAACTGCCGTTGCATCCGT-3', y fue clonado en un vector derivado del pET32b- (Novagen) entre los sitios de restricción Kpn I y Hind III. Al plásmido resultante que expresa a la toxina Tx1 como una fusión a tiorredoxina se le denominó pET32mod-Tx1.

El vector pET32b fue modificado para eliminar el sitio de enterocinasa e incluir un sitio de reconocimiento para trombina (5'-CTGGTGCCACGCGTTCT-3'). Bajo este diseño, la proteína recombinante, rTx1, tendrá dos residuos extra en el extremo N-terminal, Gly y Ser, como consecuencia de haber elegido a la trombina para la realización del corte enzimático.

4.2 Expresión de la proteína recombinante

La proteína recombinante producida por el plásmido pET32mod-Tx1 fue sobreexpresada en células de *E. coli* BL21, Rosseta-gami y Tuner (Novagen). Para la transformación de las células se siguió el protocolo estándar por choque térmico. Posteriormente, una alícuota de un cultivo de 14-16 horas de crecimiento a 37°C fue utilizada para inocular un litro de medio LB fresco con ampicilina a una concentración de 100 µg/mL (cultivos de BL21 y Tuner). El

vector pET32mod-Tx1 confiere resistencia a ampicilina, por lo que las cepas transformadas de BL21 y Tuner sólo fueron cultivadas con este antibiótico. La cepa Rosseta-gami es resistente a kanamicina, cloramfenicol y tetraciclina, por lo que los medios de cultivo incluyeron también estos antibióticos. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica (DO_{600}) entre 0.6-0.8 unidades de absorbancia, la expresión de la proteína de fusión fue inducida con isopropil-tio- β -galacto-piranósido (IPTG). Las condiciones óptimas para la inducción se ensayaron haciendo un barrido de la concentración final de IPTG entre 0.25 y 1.0 mM, de la temperatura entre los 25 y 37°C, así como del tiempo de inducción (en algunos casos el monitoreo se llevó hasta las 48 horas). Una vez concluido el tiempo de inducción las células fueron recuperadas por centrifugación a 5000 x g por 20 minutos a 4°C.

4.3 Purificación de la proteína recombinante.

La pastilla celular obtenida por centrifugación se dispersó en una disolución amortiguadora de Tris/HCl pH=8, NaCl 150 mM y lisozima 0.1 mg/mL (disolución de lisis) para luego ser lisada utilizando un sonicador Misonix 3000. La fracción soluble fue separada por ultracentrifugación a 32000 x g durante 30 minutos a 4°C. La proteína de fusión, que incluye una etiqueta de histidinas, fue purificada por cromatografía de afinidad metal-quelato (CAMQ) utilizando una columna HiTrap equilibrada con iones de Ni^{2+} (GE Healthcare). Para eliminar a las proteínas que fueron débilmente retenidas se emplearon dos volúmenes de columna de una disolución de lisis. Finalmente la proteína de fusión fue eluida con 50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl y 500 mM imidazol (disolución de elución). Debido a que a esta concentración el imidazol es un inhibidor de la actividad catalítica de la trombina, éste fue eliminado por intercambio con una disolución de Tris/HCl pH 8 50 mM y $CaCl_2$ 10 mM (disolución de corte) mediante ultrafiltración (Unidad de filtración Ultracel con membrana de 10 kDa, Millipore). Para la reacción con trombina se ajustó la concentración de la enzima a 0.5 mg/mL aproximadamente. Las condiciones de reacción utilizadas para la proteólisis fueron 6 horas a 18°C manteniendo una agitación suave. Posteriormente, la toxina recombinante debe ser purificada de los subproductos de la reacción de corte. Para ello se empleó un segundo paso de purificación por CAMQ, en el que la toxina rTx1 eluye libremente a través de la columna mientras que los subproductos de reacción que poseen la etiqueta de histidinas son retenidos. Finalmente, la toxina eluida es sometida a un último paso de purificación utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR, con un cromatógrafo Varian Pro Star acoplado a un detector de UV), empleando como fase estacionaria una columna Jupiter C18 de 250 mm x 4.6 mm (Phenomenex) y como fase móvil un gradiente lineal del 12 al 30% de agua-acetonitrilo al 0.05% de TFA, a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Los cromatogramas fueron obtenidos haciendo detecciones

independientes a 230 y 275 nm. Las proteínas purificadas por C18-CLAR fueron liofilizadas y conservadas a -20°C. Adicionalmente, cada etapa de la purificación fue monitoreada por SDS-PAGE (SDS-*PoliAcrylamide Gel Electrophoresis*).

4.4 Caracterización de las proteínas recombinantes

4.4.1 Determinación de la masa molecular.

Para la determinación de la masa molecular de las proteínas recombinantes se utilizaron independientemente dos técnicas de espectrometría de masas: ESI (ElectroSpray Ionization) y MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight).

Para el análisis por EM-ESI, se utilizó un equipo Bruker Esquire con inyección directa; las muestras fueron disueltas en una disolución acuosa al 1% de ácido fórmico.

El análisis por MALDI-TOF se hizo con un equipo Bruker Daltonics Microflex LT. Los datos fueron adquiridos en el intervalo de 2000-4000 de m/z (relación masa/carga) empleando la operación en el modo reflector y haciendo 150 disparos por blanco. Las muestras se prepararon usando como matriz el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en relación 1:10 al 1% de TFA [Gobom *et al.* 2001]. El cálculo teórico de la masa molecular se determinó utilizando la herramienta ProtParam de ExPASy [Gasteiger *et al.* 2005].

4.4.2 Determinación del coeficiente de extinción molar

Se hizo la determinación de la concentración de la proteína basada en el método de peso seco con la posterior determinación de la absorción a 280 nm [Nozaki 1986]. La proteína liofilizada fue secada hasta alcanzar un peso constante, posteriormente fue pesada por triplicado en una microbalanza Termo Orion Cahn C-33 y disuelta en agua desionizada. El registro de la absorción en el UV a 280 nm fue hecho en un espectrómetro UV-Visible Shimadzu U160, utilizando una microcelda de cuarzo de 60 μ L de capacidad.

4.4.3 Evaluación electrofisiológica

En colaboración con el grupo de investigación del Dr. Jesús García (Facultad de Química, UNAM) fue ensayada la actividad electrofisiológica de las toxinas recombinantes, empleando la técnica de fijación de voltaje con doble electrodo (*Two-electrode voltage-clamp*, TEV) en huevos de rana.

El cARN de los canales *Shaker*, hKv1.2 y hKv1.3 fue inyectado independientemente en ovocitos de *Xenopus laevis*. Las corrientes de potasio se registraron entre dos y cuatro días después de la inyección de cARN. Para registrar la medición de las corrientes se utilizó un

amplificador CA1B (Dagan Co.), un digitalizador (Digidata 1440) y el programa pClamp10 (Molecular Devices). Las corrientes fueron filtradas a 2 kHz. El volumen de la disolución de lavado fue cerca de veinte veces mayor que la cámara que contiene a los ovocitos. La inhibición de la corriente fue evaluada cada minuto hasta alcanzar el estado estacionario, entre 8 a 10 minutos.

4.4.4 Evaluación citotóxica

Las toxinas fueron evaluadas *in vitro* en la línea celular de macrófagos murinos J774. La citotoxicidad fue determinada al medir la inhibición del crecimiento celular en ensayos de microcultivo utilizando el colorante de unión a proteínas sulforodamina B (SRB) [Monks *et al.* 1991]. Los cultivos fueron expuestos a 50 μM de toxina durante 48 horas. Posteriormente, las células fueron fijadas en un sustrato plástico y teñidas con SRB al 0.4% w/v y enjuagadas con una disolución acuosa de ácido acético al 1% v/v. La densidad óptica fue determinada por duplicado en un equipo de lectura de placas Ultra Microplate Reader (Elx 808, BIO-TEK Instruments, Inc.) a una longitud de onda de 515 nm. El porcentaje de inhibición del crecimiento celular (%ICC) se calculó empleando la siguiente relación:

$$\% ICC = \left[1 - \left(\frac{DO_{\text{celulas+toxina}}}{DO_{\text{blanco}}} \right) \right] * 100$$

4.5 Determinación de la estructura tridimensional mediante Resonancia Magnética Nuclear

4.5.1 Preparación de la muestra

Se prepararon disoluciones de las toxinas nativa y recombinante en una mezcla de $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ al 5% v/v a partir de las muestras liofilizadas (D_2O , Cambridge Isotope Laboratories), dado que la concentración óptima de proteína para obtener los espectros de RMN está en el intervalo de 1 a 6 mM [Wüthrich 1990], el volumen máximo de disolvente utilizado fue de 750 μL . Debido a la solubilidad de las muestras no fue necesario añadir agentes amortiguadores ni sales.

4.5.2 Adquisición de los espectros de RMN

Para la toxina Tx1 nativa se obtuvieron los espectros bidimensionales TOCSY [Cavanagh *et al.* 1990] y NOESY [Anil-Kumar *et al.* 1982] en un espectrómetro Bruker Avance de 750 MHz adaptado con una criosonda (Laboratorio del Dr. G. Wagner, Escuela de Medicina de

Harvard, Boston, EUA). La adquisición de ambos espectros se hizo con 512 y 2049 puntos en w_1 y w_2 , respectivamente a 18°C. El experimento TOCSY fue programado con tiempos de mezclado isotrópico de 25 y 75 ms.

La adquisición de los espectros COSY, TOCSY y NOESY de las toxinas recombinantes se hizo en un espectrómetro Varian UnityInova de 800 MHz equipado con una sonda de detección indirecta HCN (*Biomolecular spectroscopy facility*, Universidad de California Irvine, EUA). Se obtuvieron espectros TOCSY a 20 y 75 ms de tiempo de mezclado isotrópico. Los espectros NOESY fueron adquiridos con tiempos de mezclado de 150 y 300 ms. En ambas secuencias de pulsos se empleó la secuencia WATERGATE [Piotto *et al.* 1992] para realizar la supresión de agua. Todos los experimentos fueron adquiridos a 25°C utilizando una matriz de 2048 x 1024 puntos.

4.5.3 Procesamiento y análisis de datos

El manejo de todos los datos de RMN fue hecho en una estación de trabajo con sistema operativo Ubuntu 9.0. Para el procesamiento de los archivos *fid* se utilizaron los programas NMRDraw y NMRPipe [Delaglio *et al.* 1995]. La interpretación completa de los espectros bidimensionales TOCSY y NOESY, es decir, la identificación de los sistemas de espín y la asignación de las señales NOE se hizo utilizando la aplicación NEASY [Bartels *et al.* 1995] del programa CARA1.5 [Keller 2004]. El programa *peakint* [Bartels *et al.* 1995] fue utilizado para hacer la integración de las señales NOE. La asignación semiautomática y los cálculos de estructura tridimensional basados en el método de geometría de distancias fueron realizados con el programa CYANA 2.1 [Güntert 2004].

4.5.4 Afinamiento de la estructura con dinámica molecular

Las estructuras de menor energía salidas de los cálculos de CYANA fueron sometidas a un proceso de afinamiento con el modelo de disolvente explícito, utilizando dinámica molecular (DM) a través de la suite de programas de AMBER 9 [Case *et al.* 2005]. Todas las minimizaciones se realizaron utilizando los parámetros del campo de fuerza AMBER-99SB. Las restricciones de distancia y de ángulos de torsión obtenidas con CYANA fueron utilizadas siguiendo el método de afinamiento propuesto por Xia *et al.* [2002]. La visualización de las estructuras y las imágenes de las mismas se obtuvieron a través del programa MOLMOL [Koradi 1996]. Finalmente, la calidad geométrica de las estructuras fue evaluada a través de la aplicación PRECHECK del *Validation Server of Protein Data Bank*.

5 RESULTADOS

"No importa si se avanza poco; lo importante es no parar"

Confucio

5.1 Obtención del plásmido pET32mod-gsTx1

El inserto con la secuencia codificante de la toxina rTx1 fue introducido entre los sitios de restricción *Kpn I* y *BamH I* del vector pET32a modificado. El producto de la reacción de ligación, el vector pET31mod-gsTx1, se utilizó para transformar células de *E. coli* DH5- α . Las células transformadas se sembraron en medio LB sólido con 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y se incubaron durante una noche a 37°C. Al día siguiente una de estas colonias fue utilizada para sembrar un cultivo de 5 mL de medio LB líquido, que se dejó crecer durante 12-14 horas a 37°C con una agitación constante de 240 rpm. Para la extracción del plásmido se utilizó una unidad de purificación Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen). La cuantificación de la concentración se hizo espectrofotométricamente (Eppendorf BioPhotometer Plus), midiendo la absorbancia a 260 nm. La secuenciación del plásmido fue solicitada a la Unidad de Servicios de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Bajo la condiciones de clonación seleccionadas, la expresión de proteína quedó regulada por el promotor T7 para ser inducida con IPTG. Adicionalmente, la toxina rTx1 se obtendrá como una fusión a tiorredoxina con una etiqueta de histidinas (His_6) y un sitio de corte para trombina ($\text{X}_3\text{X}_2\text{R/L-GS}$); el peso molecular teórico de esta proteína de fusión es de 21 kDa. En la Figura 5.1 se muestra esquemáticamente el diseño de la construcción del gen.

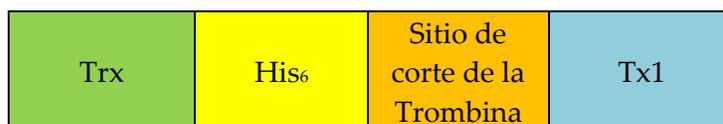


Figura 5.1. Representación esquemática de la construcción del gen pET32mod-gsTx1. La trombina reconoce la secuencia $\text{X}_3\text{X}_2\text{R/L-GS}$, por lo que la proteína recombinante se obtiene con dos residuos adicionales, GS, en el extremo N-terminal.

5.2 Expresión de la proteína de fusión

Una vez que la secuencia del vector pET32mod-gsTx1 fue confirmada, la expresión de la proteína recombinante fue evaluada en tres cepas distintas de *E. coli*: BL21, Rosseta-gami, y Tuner (Novagen). La justificación para la selección de estas cepas es la siguiente: a. BL21 es una cepa que se ha utilizado extensivamente para la expresión de proteínas recombinantes,

tanto para la expresión en citoplasma como en periplasma [Baneyx 1999]; en particular se ha utilizado para obtener proteínas enriquecidas isotópicamente para estudios de RMN. b. Rosseta-gami es una cepa diseñada especialmente para expresar en el citoplasma proteínas con puentes disulfuro; sin embargo, al ser una cepa auxótrofa de leucina no está recomendada para realizar marcaje isotópico [Berndt *et al.* 2008, Salinas *et al.* 2011]. c. Para la expresión de proteínas que resultan tóxicas para la célula o que tienden a formar cuerpos de inclusión, es recomendable utilizar una cepa como Tuner, derivada de BL21, ya que en ella la inducción es muy sensible a la concentración de IPTG en el medio de cultivo [Novagen Competent cells 2004].

Después de hacer la evaluación inicial de las cepas, se encontró que en BL21 la proteína de fusión (PF) producida tiene un peso molecular menor al esperado, por lo que inmediatamente se descartó su uso. De modo que el estudio cinético de expresión en función de la temperatura y la concentración de IPTG, solamente se realizó para Rosseta-gami y Tuner. En la Tabla 5.1 se resumen las condiciones de monitoreo para cada cepa. En ambas cepas se encontró que las condiciones óptimas para la expresión se tienen con una concentración de IPTG de 0.5 mM a 30°C. Es importante notar que el tiempo óptimo es significativamente distinto, ya que en Tuner la expresión máxima se alcanza después de 6 a 8 horas de haber realizado la inducción, mientras que en Rosseta-gami son necesarias entre 14 a 16 horas. Esta estimación se hizo tomando como criterio de normalización a la banda más intensa observada en el gel de electroforesis.

Tabla 5.1. Selección de condiciones de expresión, los valores marcados (*) indican la condiciones óptimas. T_{opt} es el tiempo en el que se alcanza el máximo de proteína expresada.

<i>E. coli</i>	[IPTG] mM	Temperatura, °C	T _{opt} , hrs
Rosseta-gami	0.25, 0.5*, 0.75, 1.0	30*, 37	12-20
Tuner	0.5*, 1.0	25, 30*, 37	6-8

En la figura 5.2 se muestran los geles de electroforesis al 12% de acrilamida del estudio cinético de la expresión de proteína de fusión en la cepa *E. coli* Rosseta-gami. En el panel A, se observa que bajo las concentraciones de IPTG ensayadas no hay variaciones apreciables, por lo que se decidió utilizar una concentración intermedia, es decir, 0.5 mM. En el panel B se muestra la cinética de expresión de proteína inducida con 0.5 mM de IPTG a 30°C. La proteína de fusión migra entre las bandas de los marcadores de 16.9 y 26.5 kDa.

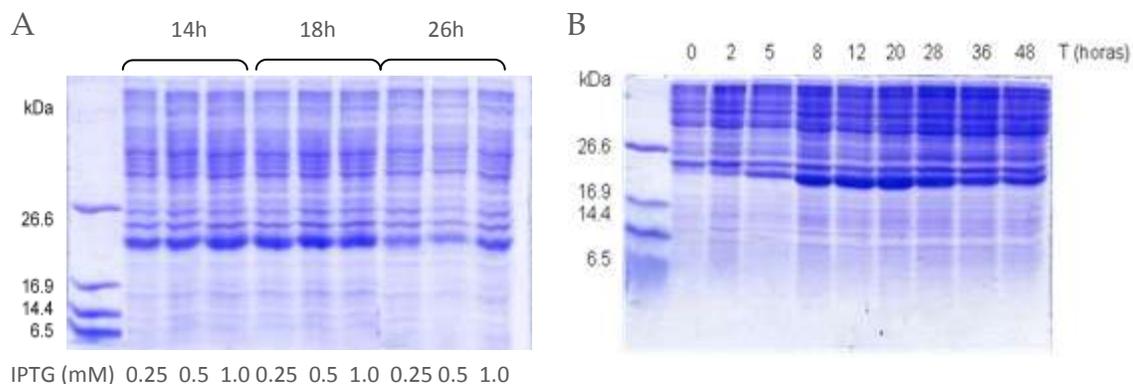


Figura 5.2. Cinética de expresión. Geles de SDS-PAGE al 12%, en dónde se muestra la sobreexpresión en *E. coli* Rosseta-gami de la proteína de fusión en función de la concentración de IPTG y del tiempo de inducción.

5.3 Purificación de la proteína de fusión

La proteína de fusión sobreexpresada es soluble por lo que puede ser recuperada en el sobrenante del lisado celular. Además, esta proteína es fuertemente retenida por la columna de afinidad metal-quelato, por lo que su purificación se ve favorecida al realizar lavados de la columna utilizando una disolución amortiguadora con una concentración baja de imidazol (10-30 mM). Independientemente de la cepa seleccionada para la expresión de la proteína de fusión, ésta fue purificada de la misma manera siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

En la figura 5.3 se muestra el seguimiento por SDS-PAGE de las distintas etapas de la purificación por CAMQ. La banda intensa que se observa entre las bandas de los marcadores de 16.9 y 26.6 kDa corresponde a la proteína de fusión. En el precipitado obtenido por la centrifugación del lisado celular, carril 3, no se observa la banda correspondiente a la PF, por lo que se concluye que bajo las condiciones de expresión seleccionadas, ésta se obtiene soluble sin dar lugar a la formación de cuerpos de inclusión. Por otra parte, la retención eficiente de la columna de CAMQ queda demostrada en la línea 4, en donde solamente se observa una banda muy tenue en el sitio de elución de la PF y en las líneas 5, 6 y 7 en donde los lavados con el agente de intercambio, imidazol hasta 50 mM, no desplazan a la PF. La elución con la disolución amortiguadora con 500 mM de imidazol permite la recuperación a totalidad de la PF, carriles 8 y 9. Finalmente la remoción del imidazol por el cambio a una disolución que favorezca el corte enzimático no modifica las propiedades electroforéticas de la PF.

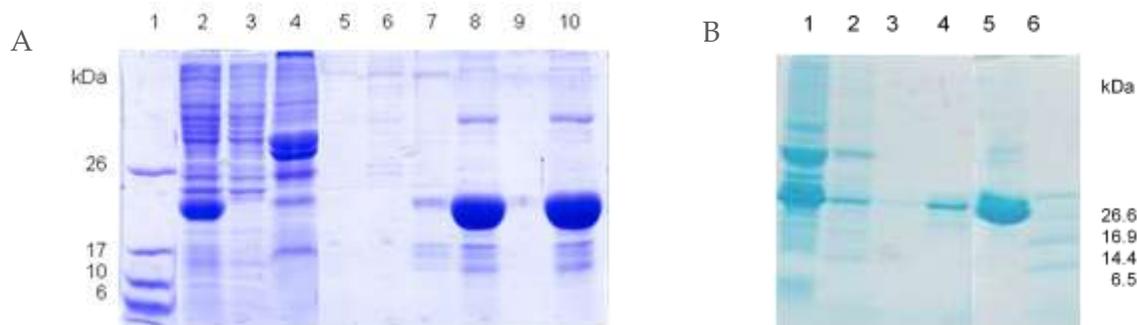


Figura 5.3. Gel SPS-PAGE al 12% de la purificación de la PF expresada por la cepa Rosseta-gami (A) y Tuner (B). Descripción de carriles: A. 1. Marcadores de PM, 2. Sobrenadante de la lisis celular, 3. Precipitado de la lisis celular, 4. Sobrenadante eluído por la columna de CAMQ, 5. Elución de lavado con la disolución de lisis, 6. Elución con disolución de lisis con imidazol 20 mM, 7. Elución con disolución de lisis con imidazol 50 mM, 8. Elución con disolución de lisis con imidazol 500 mM, 9. Lavado de la columna con EDTA, 10. Proteína de fusión en disolución libre de imidazol. B. 1. Sobrenadante de la lisis celular, 2. Sobrenadante eluído por la columna de CAMQ, 3. Elución de lavado con la disolución de lisis, 4. Elución con disolución de lisis con imidazol 50 mM, 5. Elución con disolución de lisis con imidazol 500 mM, 6. Marcadores de PM.

Adicionalmente se obtuvo el perfil cromatográfico de las PF obtenidas con ambas cepas, aplicando CLAR con una columna de FR-C18. La fase móvil utilizada fue una mezcla de agua-acetonitrilo en proporciones iguales que fue acidificada con TFA al 0.05% v/v. El registro de los cromatogramas se hizo con un detector de UV a 280 nm. En la figura 5.4 se muestra el perfil cromatográfico de la proteína de fusión obtenida en la cepa Rosseta-gami.

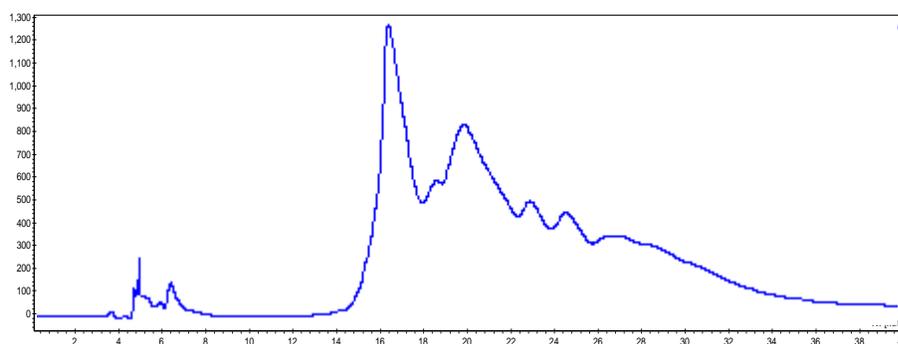


Figura 5.4. Perfil cromatográfico a 280 nm de la proteína de fusión obtenida en la cepa Rosseta-gami. Para la elución se utilizó una columna de fase reversa Jupiter C18 de 250 mm x 4.6 mm (Phenomenex).

El rendimiento de la expresión de la proteína de fusión en 1 L de medio de cultivo Luria-Broth fue evaluado siguiendo el método de Bradford. De forma consistente, el rendimiento

en *E. coli* Tuner es casi una cuarta parte de lo obtenido con *E. coli* Rosseta-gami. En la Tabla 5.2 se muestran los resultados de la cuantificación.

Tabla 5.2. Rendimiento de la proteína de fusión obtenida en tres cultivos de 1 L de medio LB.

<i>E. coli</i>	C1 (mg/L)	C2 (mg/L)	C3 (mg/L)	Rendimiento Promedio (mg/L)
Rosseta-gami	138	126	162	148
Tuner	43	35	28	36

5.4 Corte enzimático de la proteína de fusión.

La hidrólisis enzimática que permite liberar de la proteína de fusión a la toxina rTx1 fue hecha con trombina. La trombina reconoce la secuencia $X_3X_2R/L-GSX_1X_2$; es por ello que el producto de la reacción es la secuencia de la toxina Tx1 con dos residuos extra en el extremo amino. Estos residuos son glicina y serina.

El corte enzimático fue evaluado a través de un estudio cinético para establecer las condiciones óptimas de la reacción manteniendo la temperatura constante a 18°C. Inicialmente, las concentraciones de la proteína de fusión y de la enzima inmovilizada en agarosa (*slurry* al 50%) fueron establecidas siguiendo las recomendaciones del fabricante; sin embargo, se observó que debido a la eficiencia de la reacción es posible disminuir la cantidad de enzima utilizada. De modo que las disoluciones fueron preparadas considerando que 25 mg de proteína de fusión se cortan con 100 µl de trombina inmovilizada, con la ventaja adicional de que la enzima puede ser recuperada y reutilizada sin que su actividad catalítica disminuya significativamente. Con base en estos resultados, se estableció que el tiempo para la reacción de hidrólisis catalizada por trombina son 12 horas, independientemente de la cepa que se haya utilizado para obtener la PF. A este tiempo de reacción, la concentración de PF ha disminuido significativamente, y la banda correspondiente al subproducto de la reacción se ha incrementado (mayoritariamente constituido por la tiorredoxina y la etiqueta de histidinas). Adicionalmente se observan bandas que coelectroeluyen con el marcador de 14.4 kDa que son generadas por un segundo corte hecho por la trombina. Se observa que la intensidad de estas bandas incrementa significativamente conforme se prolonga el tiempo de reacción. En la figura 5.5 se muestran los geles de electroforesis obtenidos para el estudio cinético de la hidrólisis de la PF expresada tanto en *E. coli* Rosseta-gammi (A) como en *E. coli* Tuner (B).

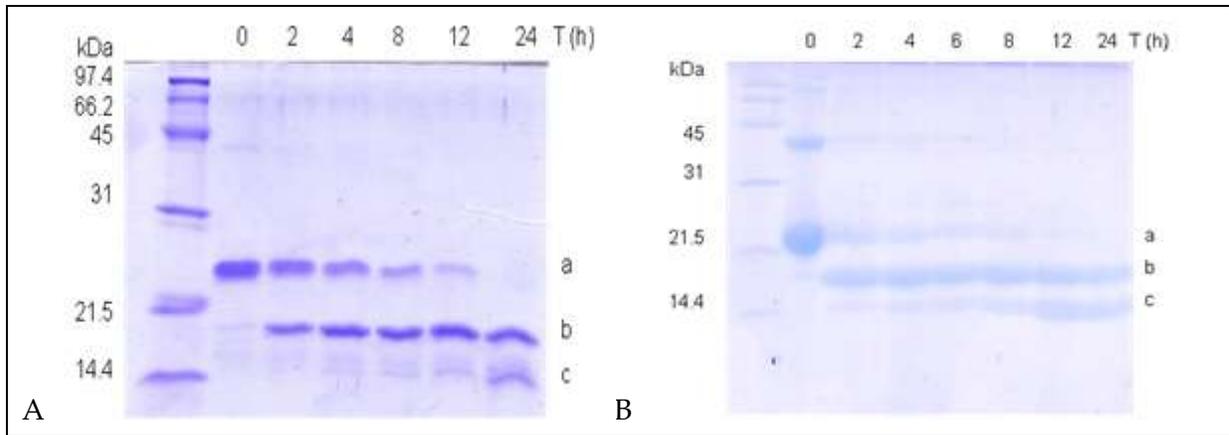


Figura 5.5. Seguimiento en gel SDS-PAGE al 12% de acrilamida de la hidrólisis enzimática de la proteína de fusión. A. Corte de la PF obtenida en *E. coli* Rosseta-gami. B. Corte de la PF obtenida en *E. coli* Tuner. En ambos gels, la banda a representa a la proteína de fusión íntegra. La banda b se obtiene después de que la trombina ha liberado a la toxina rTx1. La banda c aparece debido a un corte inespecífico de la trombina sobre el subproducto de reacción.

5.5 Purificación de la toxina rTx1

Una vez terminada la reacción de corte con trombina, la enzima inmovilizada se recuperó por centrifugación suave (5 min a 50 x g). El sobrenadante fue sometido a un segundo paso de purificación por CAMQ, en el que el subproducto de la reacción que contiene a la etiqueta de histidinas es retenido por la fase estacionaria, mientras que la toxina rTx1 eluye libremente. En la figura 5.6 se muestran los gels de electroforesis discontinua de SDS-Tris-Tricina, en donde además de observarse con claridad a la PF (carril 2) y al subproducto de reacción (carril 3), también aparecen bandas de baja intensidad que electroeluyen por debajo del marcador de 6 kDa (carriles 3 y 4 del panel B). Estas bandas corresponden a la fracción que contiene a la rTx1.

Las fracciones eluidas por CAMQ que contienen a la proteína rTx1 fueron sometidas a una última etapa de purificación por CLAR, con el fin de garantizar la pureza de las mismas. Debido a las diferencias en la separación de ambas fracciones los resultados obtenidos con cada una de ellas se presentarán de forma independiente.

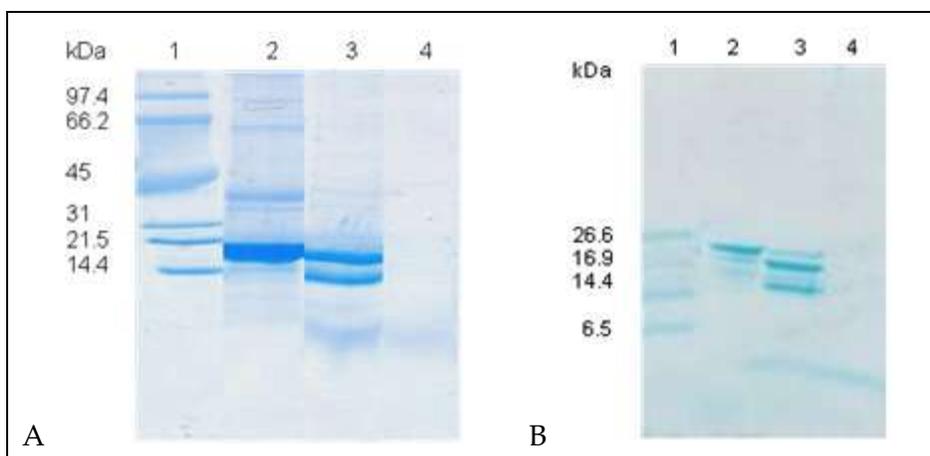


Figura 5.6. Seguimiento en geles de Tris-Tricina de la purificación por CAMQ de la toxina rTx1 obtenida por *E. coli* Rosseta-gammi (A) y *E. coli* Tuner (B). En ambos geles el carril 1 corresponde a los marcadores de peso molecular, el carril 2 contiene a la proteína de fusión antes del corte enzimático, el carril 3 es el producto de la reacción de corte enzimático y el carril 4 corresponde a la fracción purificada por CAMQ que contiene a la toxina recombinante.

5.5.1 rTx1 obtenida en *E. coli* Rosseta-gami

Para la separación por CLAR utilizando FR-C18 se utilizó un gradiente lineal de agua-acetonitrilo al 0.05% v/v de TFA con una pendiente de 0.43, en donde a los 5 minutos de iniciar la corrida cromatográfica el porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil es de 17%, mientras que a los 35 minutos ha alcanzado un contenido del 30%.

El perfil cromatográfico de la fracción eluida se muestra en la figura 5.7, realizando la detección a 230 nm. Debido a la amplia distribución de picos que fue no posible separar, se optó por hacer una colecta de tres fracciones que posteriormente sería analizada por EM-IES. La fracción I se colectó entre los 13 a los 18 minutos, la fracción II fue colectada entre los 18 y los 24 minutos y finalmente la fracción III fue colectada entre los 25 a los 30 minutos.

La masa molecular promedio de la toxina rTx1 con las cisteínas oxidadas por la formación de tres puentes disulfuro es 3323.9 Da, calculada con la aplicación ProtParam del servidor ExPASy Proteomics. Dado que la ionización por ESI da lugar a la formación de iones multicargados es posible estimar la relación m/z que tendrán estos iones. En la Tabla 5.3 se indica la relación m/z calculada de los iones esperados limitando a cinco protonaciones, adicionalmente se incluyen los valores experimentales obtenidos para las fracciones I y II. En las fracciones I y II hay tres iones que coinciden con los valores de m/z calculados para el péptido rTx1: 832(M+4H⁺), 1109 (M+3H⁺) y 1662 (M+2H⁺).

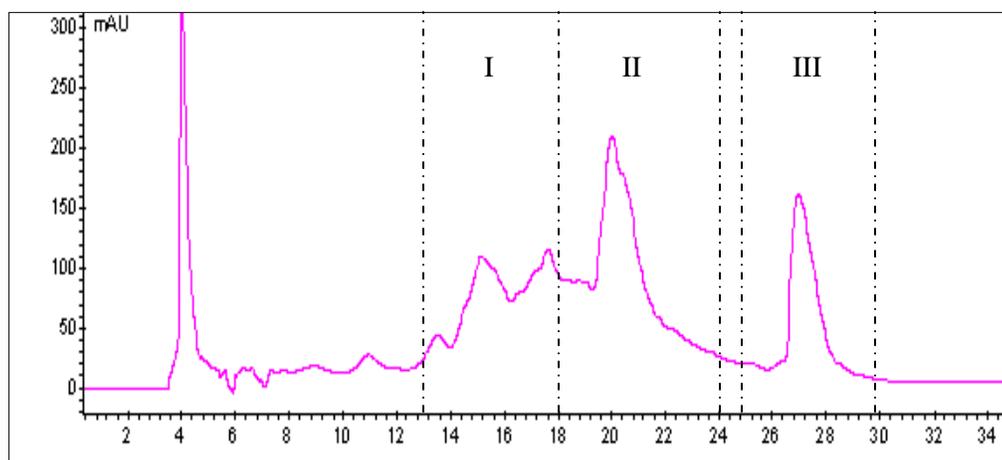


Figura 5.7. Cromatograma de la separación de la la toxina rTx1 obtenida por *E. coli* Rosseta-gami, utilizando una columna Jupiter C18 de 250 mm x 4.6 mm.

Tabla 5.3. Relación m/z de los valores calculados para la toxina rTx1 y los valores obtenidos en las fracciones I y II.

Carga	rTx1 (m/z)	Fracción I (m/z)	Fracción II (m/z)
1+	3324.9	-	-
2+	1662.9	1662.3	1662.0
3+	1108.9	1108.9	1108.9
4+	831.9	832.3	831.8
5+	665.8	-	665.2

Los espectros de EM-ESI de cada una de las fracciones se muestran en las figura 5.8. En la fracción I (panel A) los únicos iones que se observan coinciden completamente con los valores calculados para la rTx1, a pesar de que fueron generados por una serie de moléculas que eluyen con tiempos de retención distintos. Adicionalmente, en la fracción II (panel B) también los iones observados coinciden con los valores predichos, a pesar de que se aprecian algunas señales adicionales (en el intervalo 1200-1400 de m/z, destacando el ión con m/z igual a 1281.5).

Los resultados del análisis de las fracciones I y II sugieren que en el intervalo de elución comprendido entre los 13 y los 24 minutos fueron separados isómeros de la toxina rTx1. La fracción III (panel C) presenta dos iones con m/z de 1559.0 y 1040.6 que posiblemente son generados por un péptido con masa de 3117 ± 1 Da. Esta fragmentación es totalmente distinta a la obtenida para las fracciones anteriores, por lo que se descarta que este péptido corresponda al producto del gen de la toxina rTx1.

Debido a la formación de isómeros múltiples, que bajo las condiciones de separación utilizadas tienden a coeluir y a que no se observa que uno de ellos destaque como componente mayoritario, se descartó continuar con la biosíntesis de rTx1 utilizando la cepa de *E. coli* Rosseta-gami.

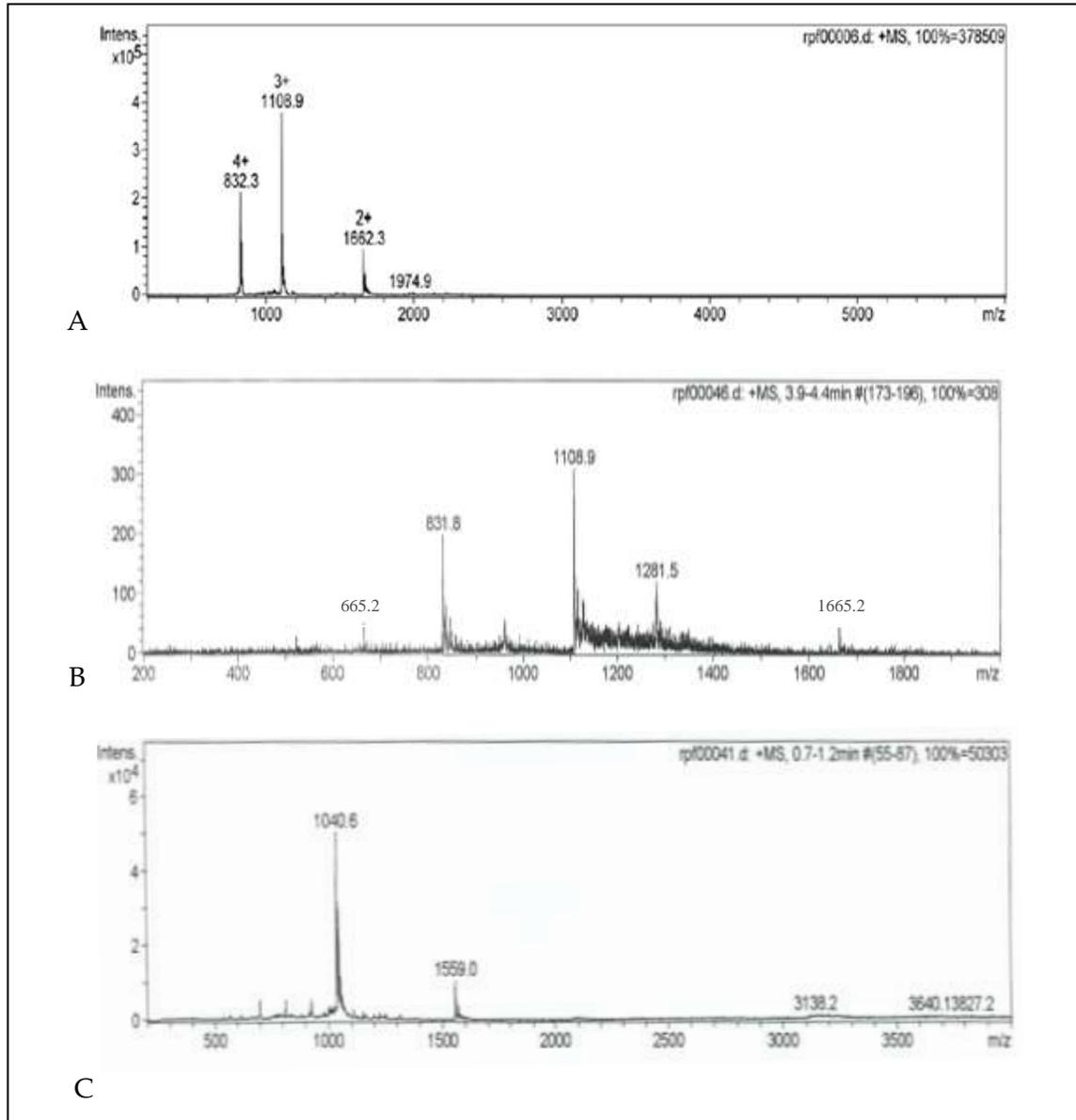


Figura 5.8. Espectros de EM-ESI de las fracciones colectadas por CLAR-FRC18. A. Fracción I, 13-18 min. B. Fracción II, 18-14 min. C. Fracción III, 25-30 min.

5.5.2 rTx1 obtenida en *E. coli* Tuner

La separación por CLAR-FRC18 de los productos de hidrólisis de la PF obtenida en *E. coli* Tuner, se hizo utilizando un gradiente lineal de agua-acetonitrilo (al 0.05% v/v de TFA)

durante 30 minutos, con una concentración inicial del 12% de agua y una pendiente de 1.4. El perfil cromatográfico de la fracción eluida, que es notablemente distinto al obtenido con *E. coli* Roseta-gami, se muestra en la figura 5.9 A. En este caso se observan claramente separados tres componentes mayoritarios. Cada una de estas fracciones fueron colectadas por separado y el disolvente fue eliminado mediante un proceso de liofilización. Posteriormente, cada fracción fue sometida a un nuevo proceso de CLAR-FRC18 para verificar su pureza, ver figura 5.9 pánels B-D.

Los rendimientos por litro de cultivo para cada fracción fueron 0.7 mg (1), 0.6 mg (2) y 0.8 mg (3).

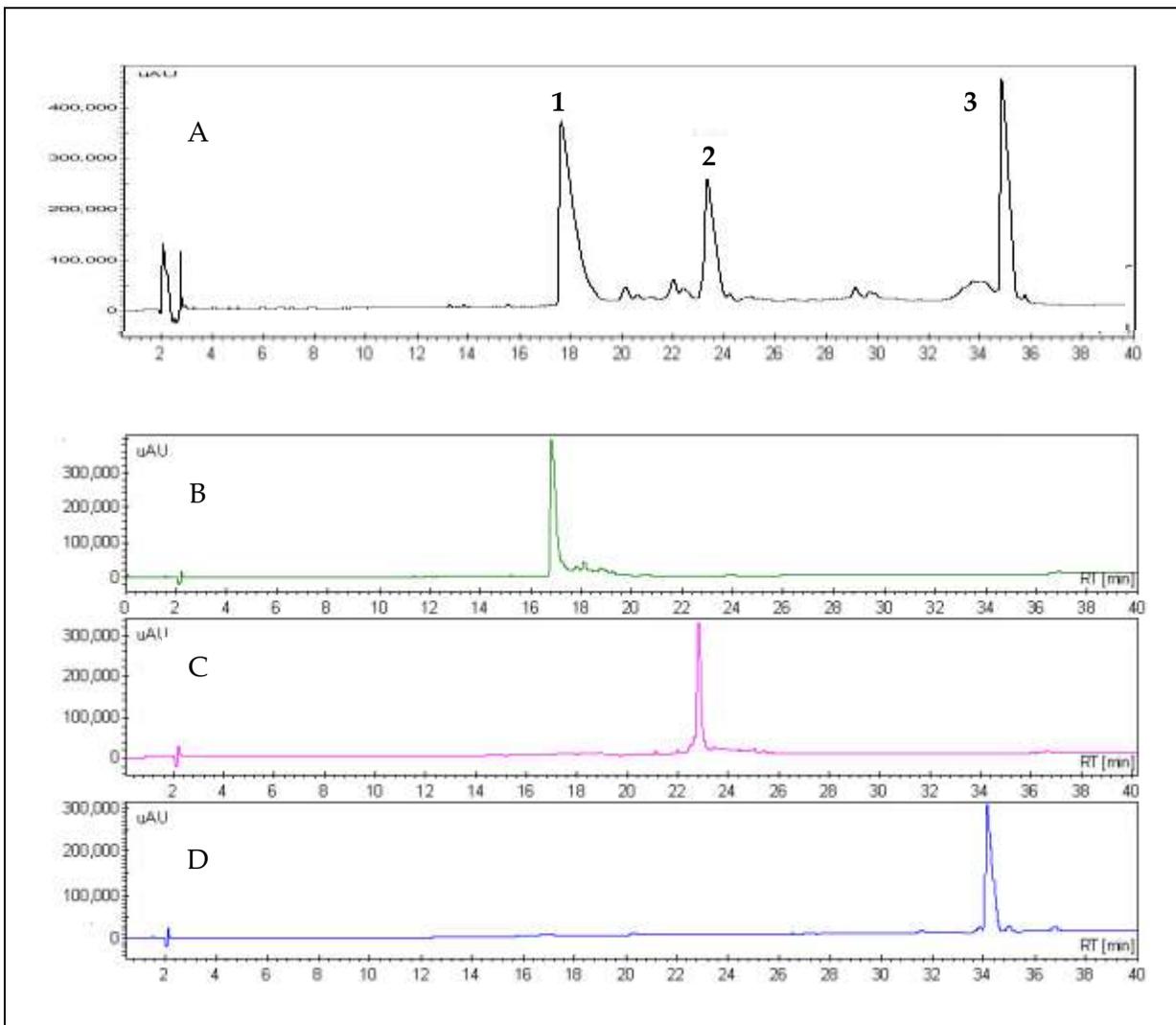


Figura 5.9. A. Perfil cromatográfico de la elución por CLAR-FRC18 de los productos de hidrólisis de la PF obtenida en *E. coli* Tuner que no fueron retenidos por la columna de afinidad. Posteriormente, cada fracción se sometió a un segundo paso de cromatografía para verificar su pureza: B. Fracción 1. C. Fracción 2 y D. Fracción 3.

5.6 Caracterización de las proteínas recombinantes obtenidas en *E. coli* Tuner

5.6.1 Espectrometría de Masas

La masa molecular determinada para cada una de las fracciones mediante la técnica de MALDI-TOF está indicada en la tabla 5.4, mientras que los espectros correspondientes se incluyen en la figura 5.10. La fracción **1** tiene la masa esperada para la toxina rTx1, 3323.9 Da, en la que las cisteínas están oxidadas por la formación de tres puentes disulfuro, y se le denominó rTx1p1. La fracción **2**, que aunque de forma consistente tiene casi una unidad de masa menos que la fracción 1, también corresponde a la toxina rTx1, por lo que se le llamó rTx1p2. La fracción **3** es de origen distinto ya que corresponde a un fragmento con masa de 3117.5 Da. Al analizar la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión se encontró que existe una cadena de 29 aminoácidos, ubicada entre la tioredoxina y la etiqueta de histidinas, que tiene esta masa. Se concluyó que la fracción **3** es producida por la hidrólisis con trombina en un sitio que había sido modificado para evitar el reconocimiento (GLVPH--SS). Este péptido también fue identificado en la expresión en Rosseta-gami, Fig. 5.8 C.

Tabla 5.4. Relación m/z de cada una de las fracciones obtenidas analizadas por MS-MALDI-TOF, el valor esperado para [M+H⁺] es 3324.9.

Fracción	1	2	3
[M+H ⁺], m/z	3325.0±0.1	3324.3±0.2	3118.5±0.2

5.6.2 Determinación del coeficiente de extinción molar

La determinación de las propiedades espectroscópicas de la toxina rTx1 son de interés primordial para su caracterización. Adicionalmente, la utilidad práctica de conocer el coeficiente de extinción molar para determinar la concentración de una disolución ofrece ventajas significativas con respecto a la cuantificación utilizando estándares externos.

En la Tabla 5.5, se indican las cantidades de toxina rTx1p1 utilizadas para hacer la determinación del coeficiente de extinción molar a 280 nm (ϵ_{0}^{280}), así como las concentraciones de las disoluciones preparadas y los valores de absorbancia registrados. Considerando la ecuación de Lambert-Beer fue calculado el valor de ϵ_0 a 280 nm, también se calculó la absorbancia a una concentración del 0.1% (Abs 0.1%), considerando una correlación lineal entre la absorbancia y la concentración de proteína.

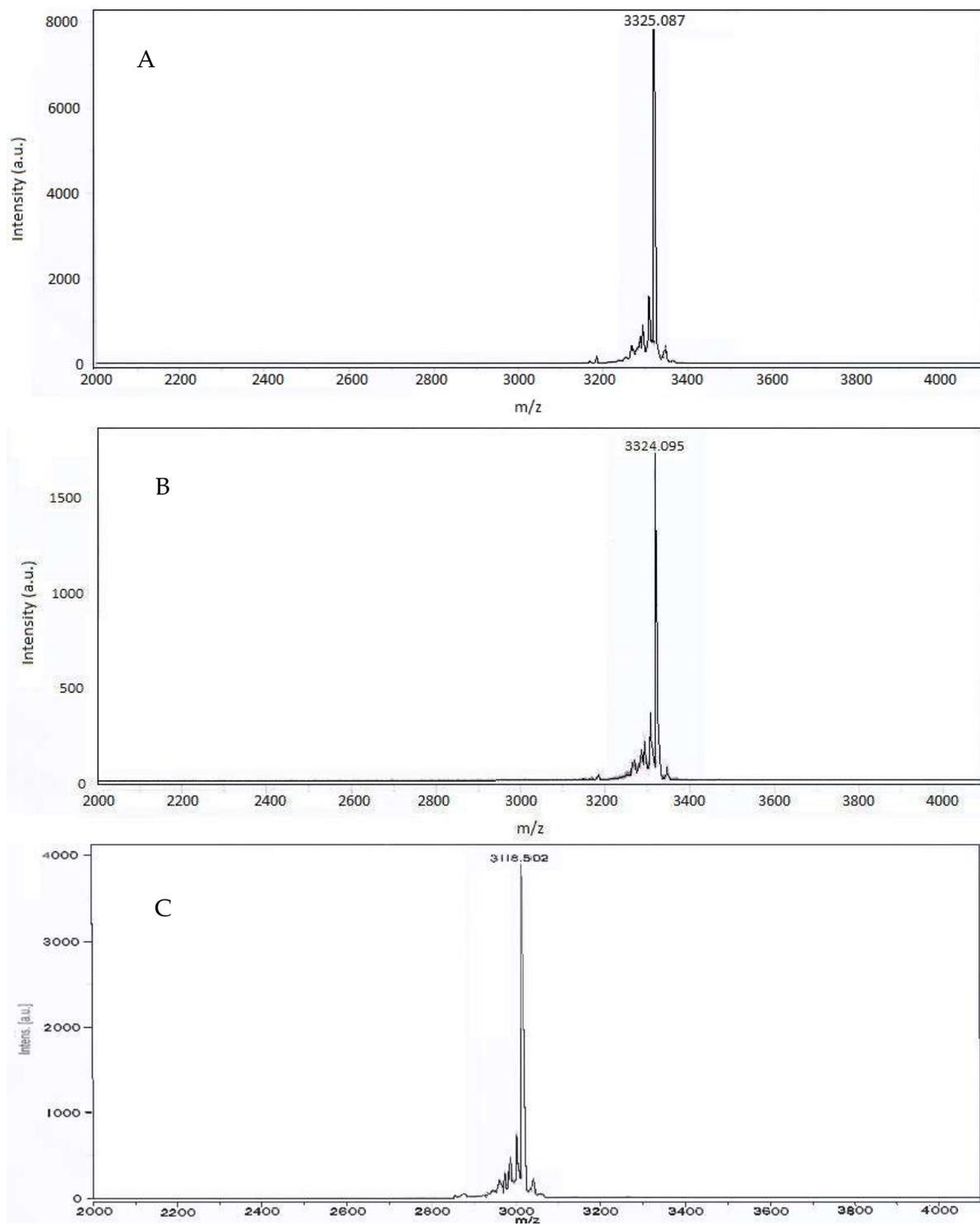


Figura 5.10. Espectros de MS-MALDI-TOF de las tres fracciones colectadas. La ventana de observación fue acotada en el intervalo de 2000 a 4000 m/z. A. rTx1p1. B. rTx1p2. C. Péptido “inespecífico”.

Tabla 5.5. Determinación del coeficiente de extinción molar a 280 nm de la toxina rTx1.

rTx1 (μg)	V _{dis} (μL)	[rTx1] (mg/mL)	[rTx1] (mM)	Abs 280 (nm)	Abs 0.1%	ϵ_0^{280} ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
69	86	0.80	0.24	0.765	0.953	3169.3
76	92	0.83	0.25	0.788	0.953	3170.6
81	98	0.83	0.25	0.793	0.959	3189.1

El valor promedio del coeficiente de extinción molar a 280 nm determinado experimentalmente para la toxina rTx1 es $3176 \pm 11 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A partir de este resultado se obtuvo la extrapolación de la absorbancia de una disolución de proteína al 0.1% (peso/volumen), para la cual se determinó un valor de 0.956 ± 0.003 unidades de absorbancia. El valor teórico del coeficiente de extinción molar a 280 nm es $3355 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, mientras que la absorbancia esperada para una disolución al 0.1% w/v es de 1.008 unidades, (estos valores fueron calculados con la herramienta ProtParam del servidor ExPASy, las propiedades fisicoquímica de la toxina Tx1 se incluyen en el Anexo A.2). El porcentaje de error experimental con respecto al valor teórico es de 5.3%.

Debido a que la determinación fue hecha con un solo punto, se sugiere que las cuantificaciones futuras se realicen ajustando la lectura de la absorbancia en el intervalo entre 0.76-0.79, ya que analíticamente la extrapolación a un valor de absorbancia de 0.95 no es confiable. Por otra parte, las mediciones con lecturas de absorbancia por debajo de 0.76 pueden ser utilizadas con reserva, siempre y cuando la disolución de concentración desconocida sea una mezcla binaria de proteína y agua.

5.6.3 Evaluación de la actividad biológica

La cantidad de toxina Tx1 nativa obtenida del veneno del *T. trivittatus* fue muy escasa, por lo que no fue posible realizar la caracterización de su efectividad contra canales iónicos. Sin embargo, dada su similitud con la toxina α -KTx20.1 que bloquea al canal Kv1.3 con una EC₅₀ de 7.9 nM, se le consideró como un bloqueador potencial de canales de potasio dependientes de voltaje. Con este antecedente, las toxinas recombinantes obtenidas fueron evaluadas en los canales de potasio dependientes de voltaje *Shaker*, hKv1.2 y hKv1.3.

5.6.3.1 Evaluación en los canales *Shaker*, hKv1.2 y hKv1.3.

Este estudio fue realizado por el grupo de investigación del Dr. Jesús García (Facultad de Química de la UNAM) empleando la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos (TEV). Se utilizaron ovocitos de *X. laevis* transfectados con el ARN de los canales *Shaker*, hKv1.2 y hKv1.3. Como experimento de control, la funcionalidad de los canales fue evaluada con

bloqueadores típicos de canales de potasio, tales como cloruro de tetraetilamonio (TEA) 10 mM, BaCl₂ 3 mM y 4-aminopiridina (4AP) 3 mM, ver Anexo A.3. En la figura 5.11 se observan los registros de las corrientes en ausencia y presencia de la toxina rTx1p1, en donde la adición a una concentración de 200 μM ocasiona un efecto de bloqueo del 88.7 % ± 9.9 en el canal *Shaker*, 74.9 % ± 7.1 en el canal hKv1.2 y 82.5 % ± 5.7 en el canal hKv1.3. En este caso la toxina rTxp2 también fue evaluada, alcanzándose concentraciones de prueba de 500 μM; sin embargo, no hubo afectación en la corriente en ninguno de los canales.

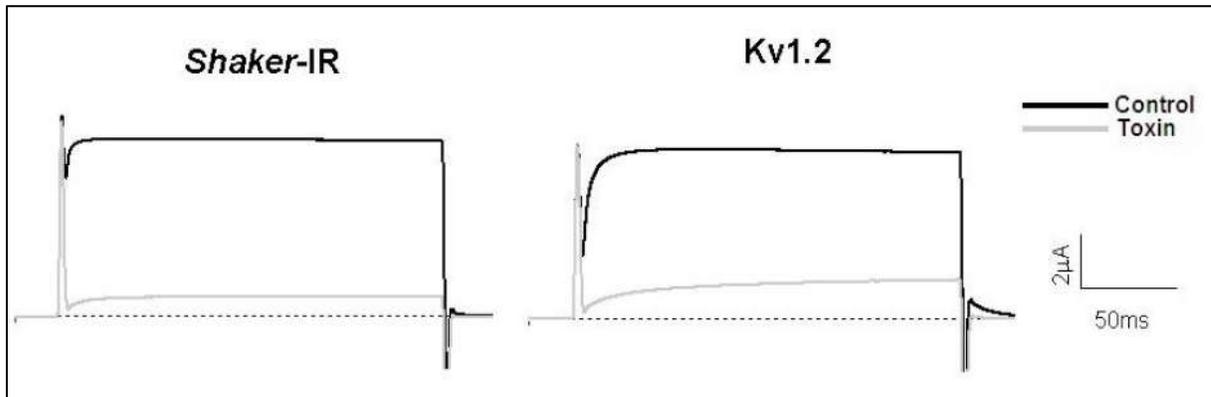


Figura 5.11. Registro del efecto de la toxina rTx1 sobre los canales *Shaker* y hKv1.2 de 60 mV. La línea negra representa la condición control en ausencia de la toxina. La línea gris muestra la disminución de la corriente después de ocho minutos de haber aplicado a la toxina rTx1p1 a concentración de 200 μM.

5.6.3.2 Evaluación citotóxica en la línea celular J774

Usualmente, la actividad electrofisiológica de las toxinas aisladas del veneno de alacrán es evaluada en una muestra diversa de canales [Abdel-Mottaleb *et al.* 2006]. Debido a la dificultad para realizar un estudio electrofisiológico completo de las toxinas en la familia de canales Kv1.x, por la falta de disposición de otros canales, se decidió evaluar su actividad tóxica a nivel celular empleando como modelo de estudio células cuyas corrientes de potasio sean bien conocidas. Este es el caso de los macrófagos, en los cuales se ha establecido que las corrientes de potasio dependientes de voltaje son atribuidas principalmente a la presencia de los canales Kv1.3 y Kv1.5, por lo que los macrófagos son sensibles a los bloqueadores de estos canales. [Randriamampita y Trautmann 1987, Vicente *et al.* 2006].

El análisis de la citotoxicidad fue realizado por la M. en C. Teresa Apan, en el Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química, UNAM, siguiendo el protocolo previamente reportado por [Monks *et al.* 1991]. Los resultados de la evaluación de las toxinas en la línea celular de macrófagos murinos J774 se resumen en la tabla 5.6. A la concentración ensayada ambas moléculas son capaces de inhibir el crecimiento celular, aunque es solamente rTx1p1

la que mostró un marcado efecto citotóxico. La identificación de los mecanismos mediante los cuales tiene lugar la inhibición es un tema de interés primordial dentro de esta línea de investigación, ya que a la fecha no han sido reportados datos de toxinas de alacrán capaces de causar este efecto en células del sistema inmune.

Tabla 5.6. Porcentaje de inhibición del crecimiento celular (%ICC) en la línea celular J774. Las determinaciones se hicieron por duplicado y se reporta el valor promedio con desviación estándar.

Toxina	Concentración, μM	% ICC
rTx1p1	50	100 \pm 0.00
rTx1p2	50	41.47 \pm 9.61

5.7 Determinación de la estructura tridimensional en disolución

5.7.1 Preparación de la muestra

En todos los casos las proteínas liofilizadas fueron disueltas en una mezcla de H₂O/D₂O 95:5. La disolución de la toxina nativa, Tx1, fue preparada a una concentración final de 0.08 mM; esta concentración es muy baja para experimentos de RMN que serán utilizados para determinar una estructura [Wüthrich 1990]. En cambio, con las toxinas recombinantes rTx1p1 y rTx1p2 se prepararon disoluciones a concentraciones 2.3 y 2.5 mM, respectivamente. Las disoluciones de las toxinas tuvieron un pH de 3.5 y en esta condición fueron obtenidos los espectros de RMN. Las toxinas son muy solubles y estables en agua, por lo que no fue necesario utilizar agentes amortiguadores para ajustar el pH ni sustancias que favorecieran cierta fuerza iónica. Al concluir los experimentos de RMN las proteínas fueron recuperadas y el disolvente fue eliminado por liofilización. La verificación del perfil iónico por MS-MALDI-TOF demostró la integridad de las muestras durante este proceso.

5.7.2 Conversión y procesamiento de los espectros de RMN

Los archivos FID generados durante la adquisición de los experimentos de RMN fueron convertidos y procesados con el programa NMRPipe, utilizando las aplicaciones *Conversion Utility* y *Process*. En la etapa de la conversión se genera el archivo *.fid que es el archivo de entrada para la realización del procesamiento. Posteriormente, los espectros bidimensionales COSY, TOCSY y NOESY se procesaron siguiendo las líneas de instrucción indicadas en la figura 5.12, en [Saucedo 2003] se encuentra una descripción de las funciones de procesamiento de *NMRpipe*. En la etapa final de procesamiento se genera el archivo *.ft, que es utilizado para crear los archivos *.3D. param y *.3D. 16, éste último es el que se visualiza con el programa XEASY para hacer la asignación de las señales.

```

nmrPipe -in /test.fid \
| nmrPipe -fn POLY -time \
| nmrPipe -fn SP -off 0.5 -end 0.98 -pow 2 -c 0.5 \
| nmrPipe -fn ZF -auto \
| nmrPipe -fn FT \
| nmrPipe -fn PS -p0 0.0 -p1 0.0 -di \
| nmrPipe -fn EXT \
| nmrPipe -fn TP \
| nmrPipe -fn SP -off 0.5 -end 0.98 -pow 1 -c 1.0 \
| nmrPipe -fn ZF -auto \
| nmrPipe -fn FT \
| nmrPipe -fn PS -p0 0.0 -p1 0.0 -di \
| nmrPipe -fn POLY -auto \
-verb -ov -out /test.ft2

```

Figura 5.12. Texto de procesamiento utilizado para los espectros bidimensionales COSY, TOCSY y NOESY. Los valores de p0 y p1, que permiten modificar la fase, fueron ajustados en ambas dimensiones para hacer la corrección de fase correspondiente.

5.7.3 Análisis e interpretación de los espectros.

El análisis preliminar de los espectros de RMN reveló que la toxina rTx1p1 mostraba señales dispersadas en la región de los protones de amida, H_N , en el intervalo comprendido entre 6.3-10.3 ppm ($\Delta\delta=4.0$ ppm), lo que sugiere que la toxina adopta una conformación tridimensional bien definida. Por otra parte, el espectro de la toxina rTx1p2 presentaba señales colapsadas con una estrecha dispersión de desplazamientos químicos de los H_N en el intervalo de 7.1-8.7 ppm ($\Delta\delta=1.6$ ppm), que se relaciona con una pérdida de estructura o con la formación de una conformación al azar (*random coil*). En la figura 5.13 se muestran los espectros TOCSY de ambas toxinas. Ambos espectros fueron obtenidos a concentraciones similares; sin embargo, es notable una disminución de señales en la región de protones de amida en el espectro NOESY de la toxina rTx1p2. Por otra parte, a pesar de la escasez de las señales en el espectro NOESY de la toxina nativa y la baja relación señal-ruido, es evidente que al igual que en el espectro TOCYS hay una mayor similitud entre los espectros de Tx1 y rTx1p1 que con respecto a rTx1p2. Estas evidencias espectroscópicas soportan la tesis de que la toxina rTx1p1 es el isómero que adoptó el plegamiento nativo, y explican la nula actividad de bloqueo de rTx1p2 frente a los canales *Shaker*, hKv1.2 y hKv1.3. Sin embargo, es interesante recordar que esta estructura que genera señales “colapsadas” es capaz de producir un efecto citotóxico en los macrófagos murinos.

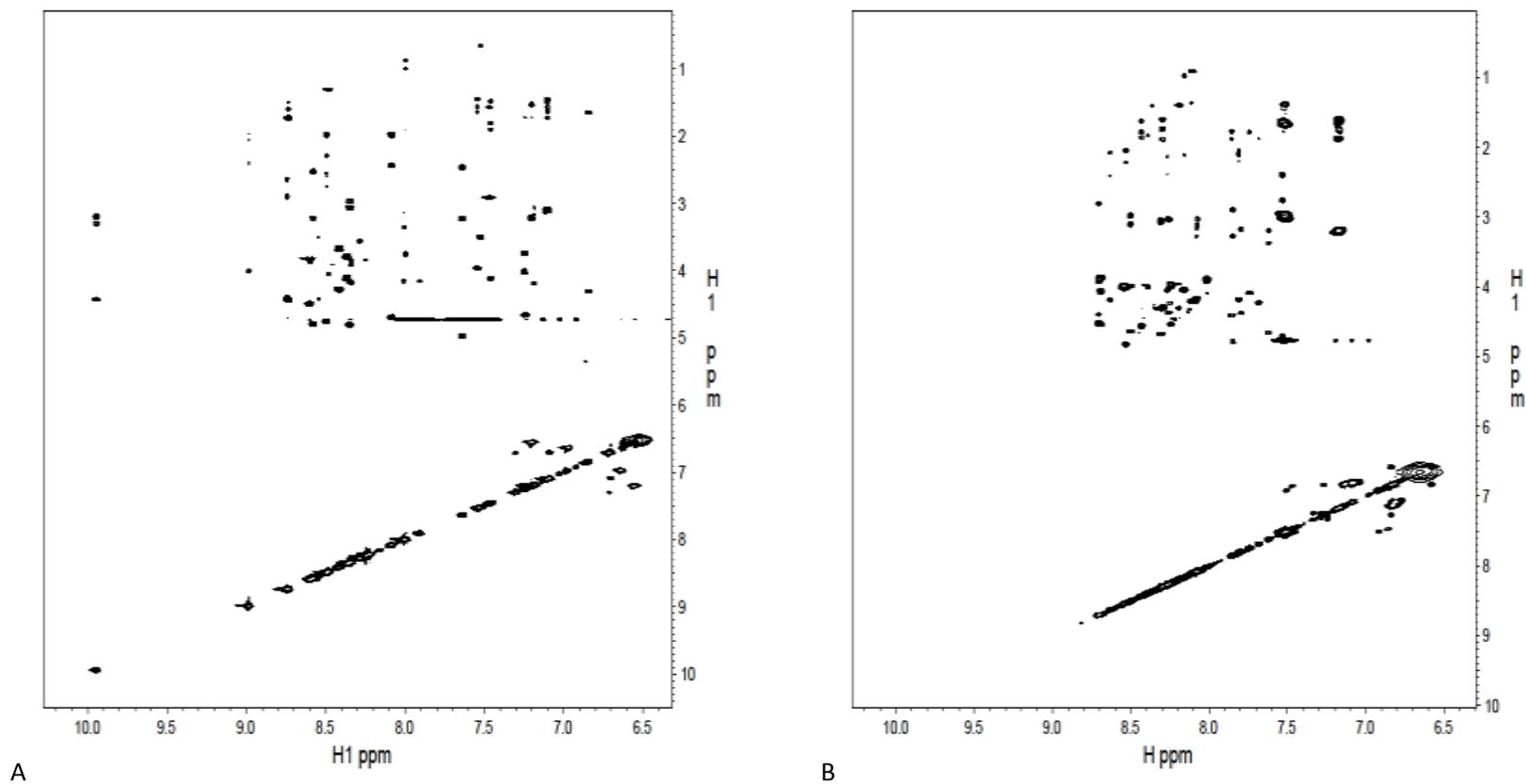


Figura 5.13. Espectros TOCSY de las toxinas recombinantes. rTx1p1, tiene una dispersión de señales más amplia (A) que rTx1p2 (B), lo que indica que ésta última tiene una estructura tridimensional menos definida.

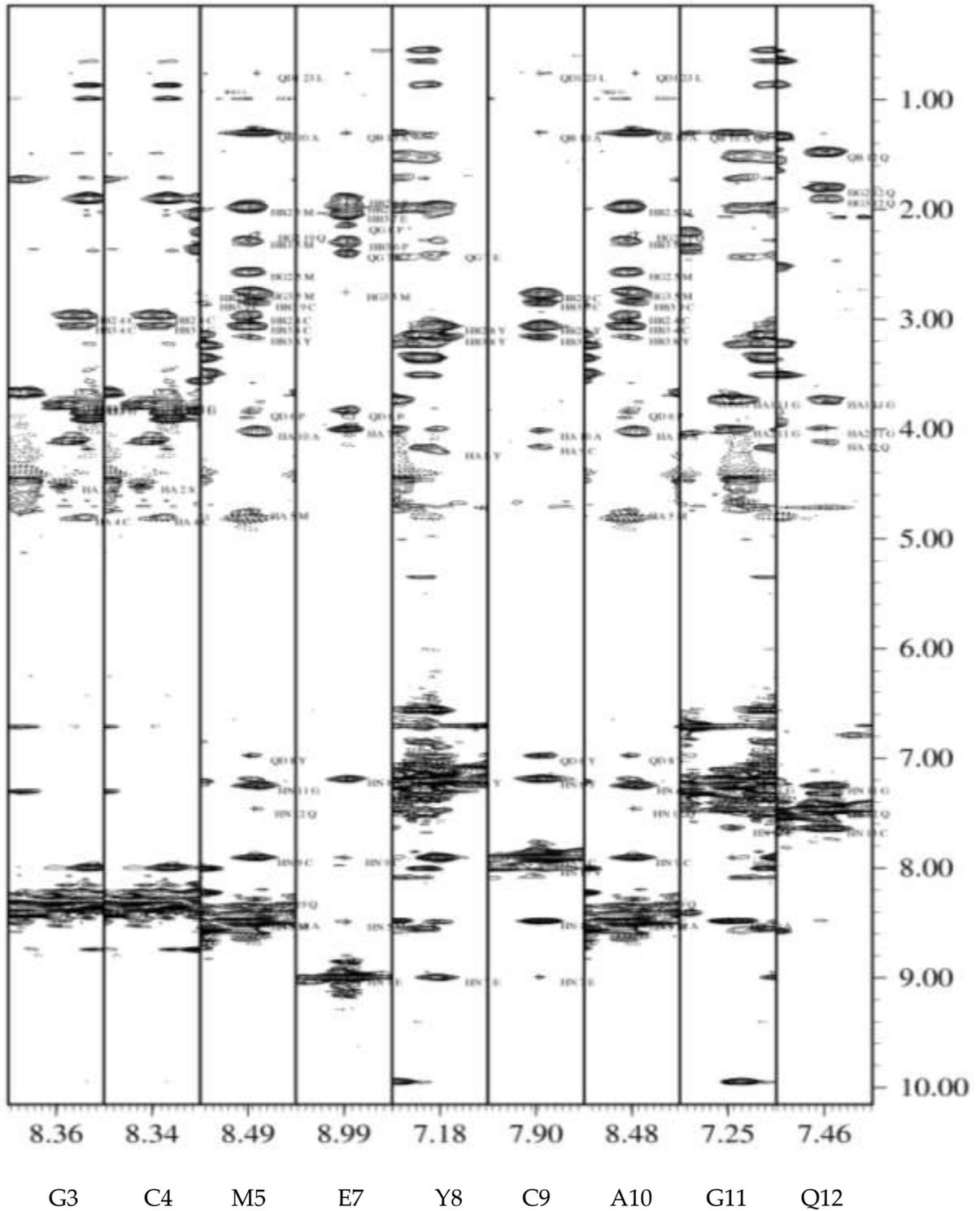
La asignación de las señales de los espectros de RMN fue hecha siguiendo el protocolo estándar [Wüthrich 1986], en donde se sugiere identificar en primer lugar los sistemas de espín de cada aminoácido interpretando simultáneamente los espectros COSY y TOCSY, y posteriormente encontrar las correlaciones debidas al efecto nOe de corto, medio y largo alcance en el espectro NOESY, que permiten obtener la estructura tridimensional de la molécula. De esta manera fue posible identificar a prácticamente todos los sistemas de espín de cada toxina. En el caso particular de la toxina nativa, la escasez de señales dificultó mucho la asignación por sí sola, por lo que la identificación de los sistemas de espín fue hecha utilizando como referencia las asignaciones de la toxina rTx1p1. De esta manera, la asignación de las señales de los sistemas de espín de la toxina Tx1 nativa se completó al 97.1%.

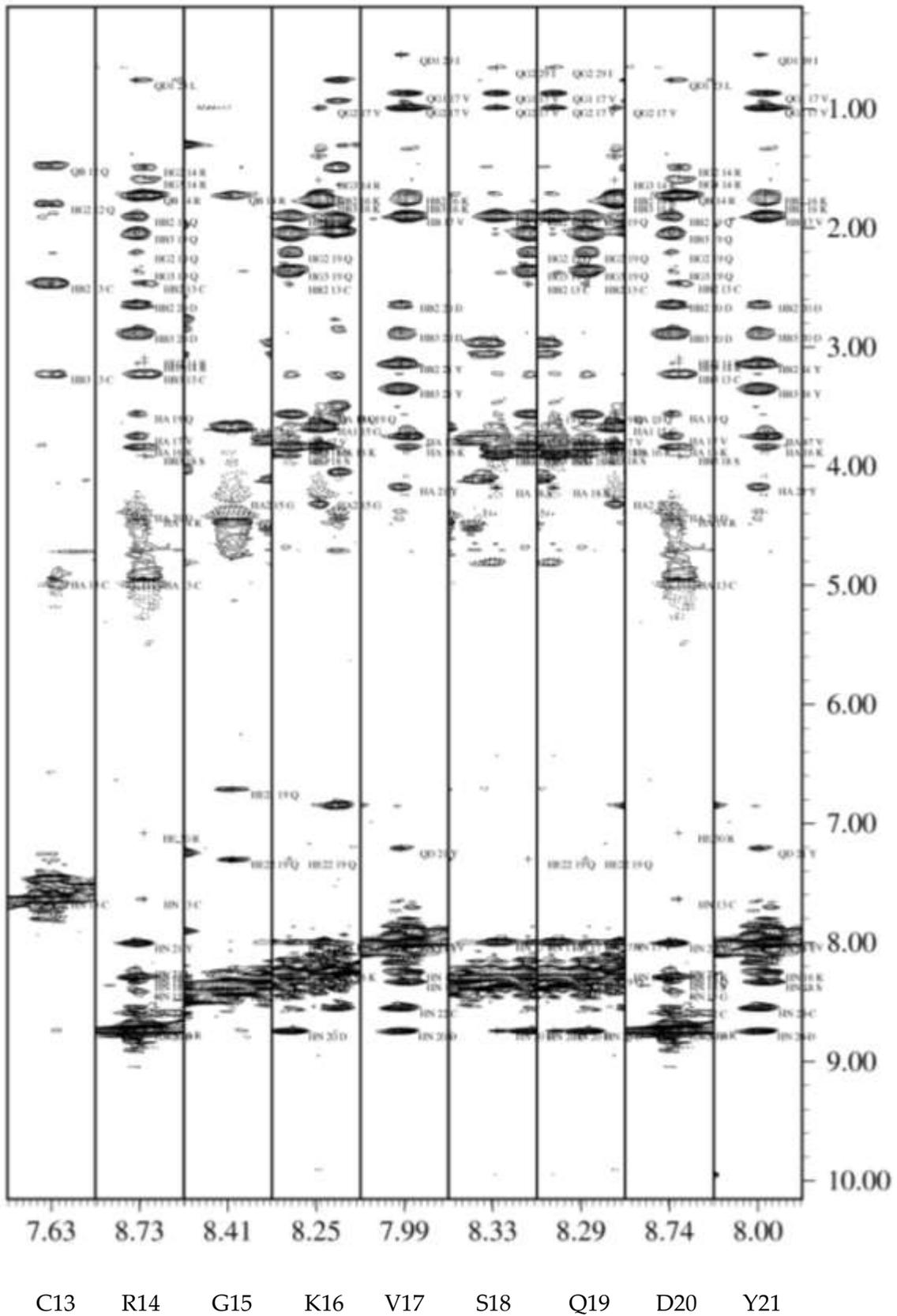
En la tabla 5.7 se listan los desplazamientos químicos de los protones asignados para Tx1, rTx1p1 y rTx1p2. La similitud entre los espectros de la toxina nativa y la recombinante rTxp1 queda en evidencia al graficar la diferencia del desplazamiento químico ($\Delta\delta$, ppm) entre los protones de amida de las toxinas rTx1p1 y rTx1p2, tomando como referencia los datos de la toxina nativa, figura 5.14, en donde se observa que el $\Delta\delta$ entre los protones H_N no excede los 0.3 ppm en el caso de la toxina rTx1p1. Para la toxina rTx1p2 existen diferencias hasta de más de 2 ppm, como es el caso de la Cys²⁴ (C5), ubicada en la región C-terminal en donde se encuentra la región de mayor discrepancia. En las siguientes páginas, figura 5.15, se muestran únicamente las asignaciones en el espectro NOESY de las señales de protón de los residuos de la toxina rTx1p1, cada franja corresponde al sistema de espín del aminoácido indicado en el desplazamiento químico del H_N .



Figura 5.14. Diferencia de desplazamiento químico ($\Delta\delta$) del protón de amida H_N de las toxinas recombinantes *vs.* la toxina nativa. En la gráfica se excluye a la Pro⁴.

Figura 5.15. Franjas del espectros NOESY de la toxina recombinante rTx1p1. Cada franja corresponde al sistema de espín del aminoácido indicado al pie de la figura (δ_{HN}). En este caso, la numeración de los residuos considera a los aminoácidos adicionales Gly¹ y Ser².





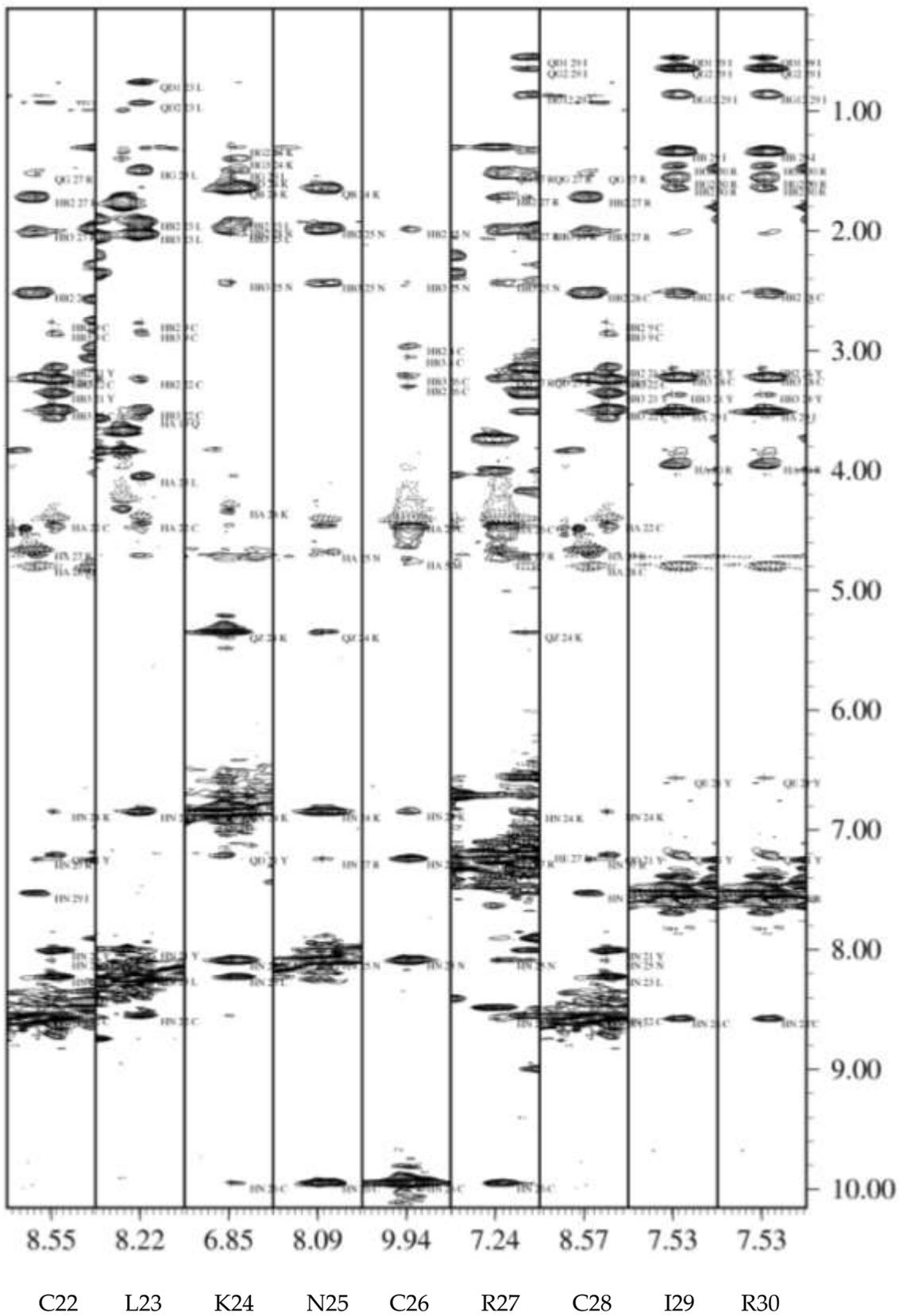


Tabla 5.7. Valores de desplazamiento químico de los protones de las toxinas nativa y recombinantes. La numeración de residuos se hace tomando como referencia a la toxina nativa sin considerar a los aminoácidos extra derivados del diseño recombinante.

Residuo	Tx1				rTx1p1				rTx1p2			
	HN	H α	H β	Otros	HN	H α	H β	Otros	HN	H α	H β	Otros
Gly					8.350	4.095 4.127			8.821	3.912 4.563		
Ser					8.592	4.507	3.843		8.707	4.536	3.877 3.922	
Gly ¹		3.389 3.798			8.357	3.766 3.798			8.548	4.001		
Cys ²	8.599	2.855			8.340	4.800	2.968 3.055		8.313	4.68	3.068	
Met ³	8.463	4.743	1.789 2.140	2.394 2.595	8.483	4.747	1.981 2.281	2.575 2.748	8.537	4.834	2.054 2.220	2.620 2.701
Pro ⁴			2.120 2.143	1.964 3.655 3.684			1.904 2.300	2.143 3.840			1.883 2.343	2.049 2.123 3.803 3.932
Glu ⁵	9.210	3.778	1.719 1.808	2.058 2.095	8.988	4.003	1.960 2.045	2.396	8.637	4.189	2.088	2.421
Tyr ⁶	6.873	4.012	2.828 3.002	6.791 6.424	7.176	4.190	3.061 3.162	6.972 6.626	7.801	4.382	3.185	6.840 7.141
Cys ⁷	7.871	3.903	2.568 2.635		7.900	4.156	2.764 2.845		8.266	4.375	3.037	
Ala ⁸	8.462	3.887	1.113		8.475	4.022	1.305		8.189	4.046	1.406	
Gly ⁹	6.998	3.565 3.813			7.244	3.734 3.999			8.020	3.907		

Continuación

Gln ¹⁰	7.144	3.897	1.333 1.645		7.457	4.119	1.484 1.806 1.900		7.817	4.189	2.047 2.086	2.119 2.209
Cys ¹¹	7.568	4.813	2.178 3.015		7.630	4.952	2.468 3.229		7.855	4.797	2.904 3.281	
Arg ¹²	8.653	4.281	1.405 1.531	1.294 2.899	8.725	4.432	1.728 1.493 1.595 3.096 3.131		7.689	4.237	1.886	1.622 1.695 3.228
Gly ¹³	8.305	3.470 4.076			8.405	3.665 4.274			8.696	3.886 4.074		
Lys ¹⁴	8.105	3.653	1.582	1.128 1.349 2.758	8.243	3.839	1.733 1.800 1.589 1.680 2.950		7.860	4.418	1.781 1.889	1.539 1.625 1.688
Val ¹⁵	7.850	3.592	1.702	0.692 0.805	7.990	3.752	1.910 0.873 0.993		8.162	4.049	2.121	0.972 1.000
Ser ¹⁶	8.285	4.000	3.654 3.721		8.323	4.183	3.847 3.916		8.251	4.550	3.983	
Gln ¹⁷	8.099	3.352	1.732 1.869	1.964 2.188 6.594 7.207	8.281	3.563	1.910 2.053 2.217 2.364 6.709 7.295		8.272	4.050	2.145	2.396
Asp ¹⁸	8.703	4.190	2.345 2.651		8.737	4.391	2.630 2.885		8.711	4.407	2.812	
Tyr ¹⁹	7.767	3.980	2.935 3.198	7.007 6.347	7.999	4.161	3.144 3.351 3.238 3.502	7.201 6.560	8.083	4.173	3.034 3.111	7.089 6.618
Cys ²⁰	8.381	4.227	3.033 3.322		8.545	4.430			8.087	4.217	3.184 3.284	

Continuación

Leu ²¹	8.088	3.853	1.761 1.882	1.304 0.532 0.753	8.217	4.054	1.918 2.030	1.495 0.762 0.931	8.396	4.010	1.739 1.839	1.504 0.811 0.895
Lys ²²	6.610	4.104	1.305 1.458	1.100 1.210 2.724	6.849	4.318	1.651	1.302 1.408 1.566 2.902 5.350	7.745	4.095	1.791	1.375 1.729 1.468 1.626 2.927 2.973
Asn ²³	7.992	4.485	1.787 2.245		8.082	4.687	1.984 2.434		7.536	4.713	2.403 2.765	
Cys ²⁴	9.817	4.177	3.037 3.109		9.940	4.443	3.296 3.214		7.626	4.664	3.202 3.375	
Arg ²⁵	7.056	4.467	1.539 1.791	1.328 3.038 7.079	7.238	4.669	1.719 2.004	1.527 3.226 7.189	8.437	4.567	1.793 1.874	1.633
Cys ²⁶	8.470	4.604	2.322 3.036		8.568	4.802	2.516 3.226		8.507	4.647	2.987 3.112	
Ile ²⁷	7.365	3.215	1.128	0.452 0.626 0.370	7.528	3.510	1.346	0.863 0.753 0.555	8.114	4.213	1.866	0.916 1.159 1.441 0.848
Arg ²⁸	7.363	3.737	1.358 1.430	1.253 2.909	7.525	3.958	1.632 1.728	1.569 1.461 3.084 7.081	8.303	4.309	1.744 1.892	1.606

5.7.4 Predicción de la estructura secundaria

A partir de la gráfica del índice de desplazamiento químico de protón (CSI, *Chemical Shift Index*) es posible identificar las regiones que dan lugar a la formación de los elementos regulares de estructura secundaria, tales como las hélices y las hebras [Wishart *et al.* 1992]. En la figura 5.16 se muestran los valores de CSI determinados para cada una de las toxinas. Un índice consecutivo de -1 para tres residuos indica la formación de una hélice α , por lo que en las toxinas nativa y recombinantes se distinguen claramente dos segmentos helicoidales, en los que la longitud de la segunda hélice es lo único que se modifica. En las toxinas Tx1 y rTx1p1 la hélice I se forma entre los residuos Glu⁵-Gln¹⁰ y la hélice II entre los residuos Gly¹³-Cys²⁴, aunque en rTxp1 hay una aparente discontinuidad debida al índice de 0 del residuo Asn²³.

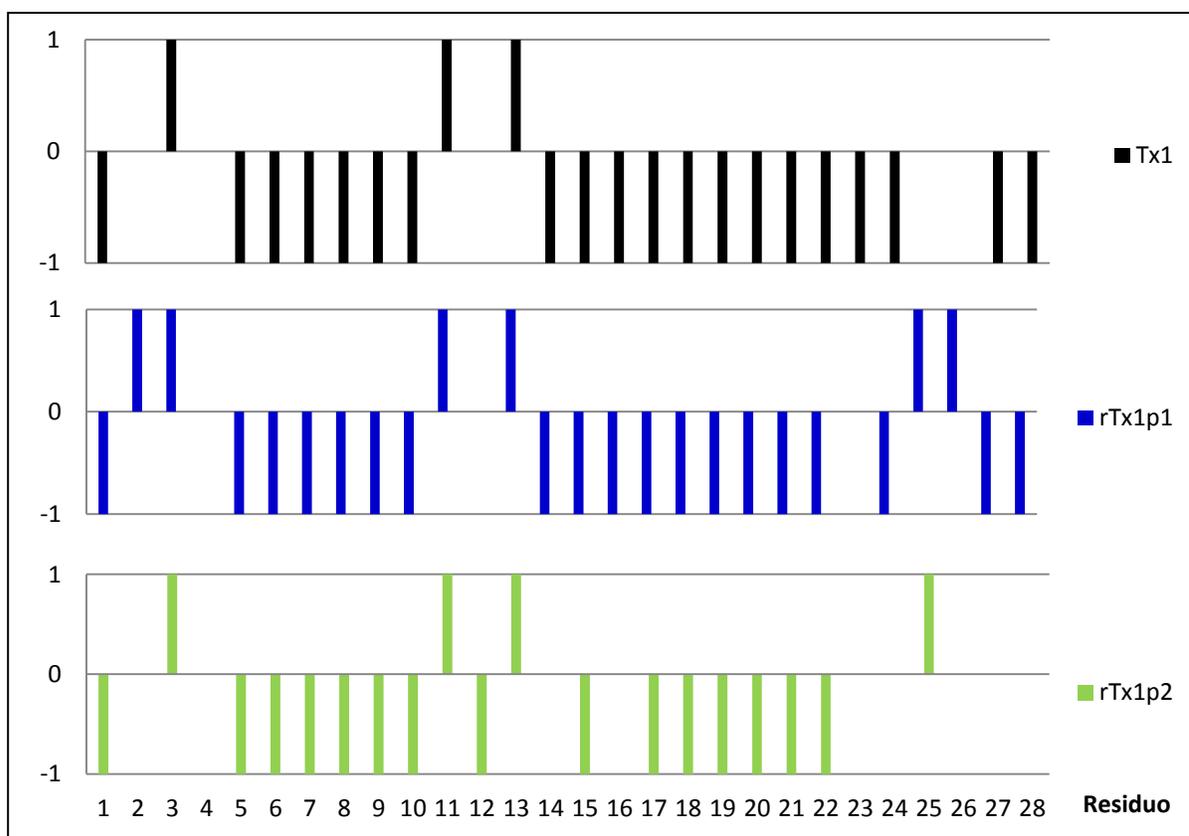


Figura 5.16. Gráficas de CSI de las toxinas Tx1 nativa y recombinantes, rTx1p1 y rTx1p2. Un índice consecutivo de 1 en tres residuos indica la formación de hebras β , un índice consecutivo de 0 indica la presencia de regiones no estructuradas, y un índice consecutivo de -1 en tres residuos indica la formación de una hélice α .

En la toxina rTx1p2 también se forma la hélice I en la misma región que en los casos anteriores; pero, la hélice II es más corta, ya que se reduce a los residuos Gln¹⁷-Lys²². Otra

característica distintiva en la gráfica de rTx1p2 es que el extremo C-terminal Asn²³-Arg²⁸ tiene un índice consecutivo de cero, lo que implica que esta región no está estructurada. Dado que rTx1p2 no tiene efecto de bloqueo sobre los canales es posible que la región responsable de la interacción con el canal esté ubicada en el extremo C-terminal de la toxina.

5.7.5 Determinación de la conectividad entre cisteínas de la toxina rTx1p1

La determinación de las conectividades entre los puentes disulfuro es un dato relevante en la caracterización de las toxinas, ya que al conferirle rigidez estructural a la molécula son responsables indirectos de su función: el apareamiento incorrecto entre las cisteínas se traduce en una pérdida del plegamiento nativo lo que usualmente va acompañado de una pérdida de actividad.

Durante la caracterización bioquímica de la toxina Tx1 nativa solamente fue posible identificar la formación del puente disulfuro C1-C5, que corresponde a la unión entre las Cys²-Cys²⁴. Esta conectividad es sumamente inusual entre las toxinas aisladas del veneno de alacranes, por lo que se volvió relevante encontrar evidencia espectroscópica del apareamiento de las cisteínas mediante RMN [Mobli y King 2010].

Cuando se forma un puente disulfuro la distancia entre los H β de las cisteínas cae en el intervalo entre 3.5 y 5.5 Å [Harrison y Sternberg 1996], por lo que la observación de señales de correlación debidas al efecto NOE permiten inferir que estas cisteínas están covalentemente unidas a través de un enlace disulfuro. En el espectro NOESY de la toxina nativa no se observan este tipo de correlaciones debido a la baja concentración de proteína a la cual fue adquirido; sin embargo, en el espectro de la toxina rTx1p1 hay varias señales que sugieren la formación de los puentes C1-C5 (Cys²-Cys²⁴) y C2-C4 (Cys⁷-Cys²⁰). Las señales de la correlación NOE entre los protones H β -H β de las Cys⁷-Cys²⁰, mostradas en la figura 5.17, indican la formación del puente C2-C4. También se observan señales entre el HN de la Cys²⁴ con el H β de la Cys² y el H β de la Met³, que sugieren fuertemente la formación del puente C1-C5. Finalmente, se asume que las cisteínas restantes, Cys¹¹ y Cys²⁶, forman el puente C3-C6 dado que la masa de la toxina determinada por EM-MALDI-TOF coincide con la oxidación de todas cisteínas.

Una evidencia adicional que soporta la conectividad entre las cisteínas fue obtenida mediante cálculos de dinámica de torsión utilizando el programa CYANA, para determinar la estructura tridimensional a partir de las restricciones de distancia establecidas por RMN.

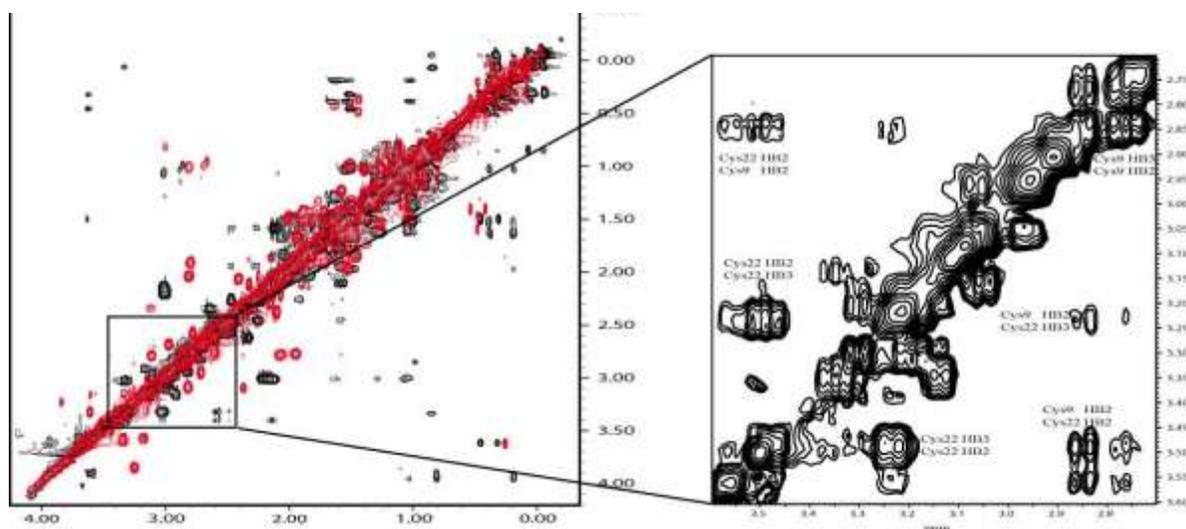


Figura 5.17. Región del espectro NOESY de la toxina rTx1p1 en dónde se observan las correlaciones entre los H β -H β de las Cys⁷⁽⁹⁾-Cys²⁰⁽²²⁾.

Con CYANA se realizaron tres cálculos de estructura independientes, utilizando distintos parámetros de entrada de acuerdo al protocolo descrito para la miotoxina [Fadel *et al.* 2005]. En el primer cálculo las estructuras se obtuvieron sin indicar la formación de puentes disulfuro, de esta manera solamente las restricciones NOE son las que delimitan la convergencia, por lo que la estructura obtenida se utiliza como referencia. En el segundo cálculo además de las asignaciones NOE se utilizaron las restricciones de los puentes disulfuro que comúnmente se presentan en las toxinas obtenidas del veneno de alacrán que afectan a canales de potasio, es decir, que se fijó la conectividad entre C1-C4, C2-C5 y C3-C6. Finalmente, en el tercer cálculo se utilizaron las restricciones derivadas de los datos espectroscópicos de rTx1p1 y de la espectrometría de masas de la digestión enzimática de Tx1 (ver Introducción 1.4.1), por lo que la conectividad entre cisteínas quedó indicada para C1-C5, C2-C4 y C3-C6. En cada cálculo se seleccionaron las 20 estructuras de menor energía, los datos estadísticos se resumen en la tabla 5.8. Los datos estadísticos de cada uno de estos cálculos se incluyeron en los Anexos A.5-A.7.

El análisis de la estructura calculada sin restricciones de puentes disulfuro (sinPDS) arroja los siguientes datos. De todas las configuraciones posibles de puentes disulfuro hay algunas que están impedidas por la conformación adoptada por la estructura misma. En la tabla 5.9 quedan señaladas como EI, estructuralmente impedidas. Al medir las distancias entre los protones H β -H β de las cisteínas apareables en cada de una de las estructuras y obtener el valor promedio, resalta la corta distancia entre la C2 y la C4, 2.20 Å. Esta distancia entre protones sugiere fuertemente la formación del puente C2-C4. Por otra parte, al considerar las posibilidades de unión de la C1, ésta solamente puede estar unida a la C5 dando lugar a la formación del puente C1-C5, ya que la cisteínas C3 y C6 están estructuralmente

impedidas para formar una unión con C1. Esta tesis está soportada porque la distancia promedio observada entre estos protones beta, 4.8 Å, es la segunda distancia más corta medida entre los pares de cisteínas, (después de la de C2-C4) que sin ambigüedad cae dentro de los límites de observación del efecto NOE.

Tabla 5.8. Relación del número de restricciones de distancia utilizadas en el cálculo de la estructura de la toxina rTx1p1. A. Estructuras calculadas sin restricciones de puentes disulfuro (sinPDS). B. Estructuras calculadas considerando los pares usuales en KTXs: C1-C4, C2-C5 y C3-C6 (PDB_{típicos}). C. Estructuras calculadas considerando los puentes anómalos C1-C5, C2-C4 y C3-C6.

	sinPDS ^A	PDB _{típicos} ^B	PDS _{anómalos} ^C
Restricciones NOE			
Totales	367	342	365
Corto alcance	228	221	223
Medio alcance	64	55	64
Largo alcance	75	66	78
RMSD (3-30)			
Cadena principal	0.43	0.52	0.39
Cadena principal + lateral	1.09	1.19	1.01

Así, la única unión posible entre las cisteínas remanentes es la formación del puente C3-C6. Lamentablemente, los protones beta de estas cisteínas tienen desplazamientos químicos que se traslapan en ambos núcleos (ver Tabla 5.7), por lo que no es posible identificar experimentalmente la correlación.

Tabla 5.9. Conectividad entre cisteínas en rTx1p1. Para la identificación de las cisteínas que pueden estar formando puentes disulfuro en rTx1p1, se midieron las distancias (Å) entre los protones H β -H β en las estructuras que fueron calculadas sin restricciones de puentes disulfuro (sinPDS). Aquellos puentes que están impedidos por la geometría de la molécula, con distancias entre cisteínas mayores a 10 Å, se indican como EI (espacialmente impedidos).

	C1	C2	C3	C4	C5	C6
C1	—					
C2	6.65	—				
C3	EI	6.35	—			
C4	6.69	2.20	6.64	—		
C5	4.80	8.43	EI	7.20	—	
C6	EI	8.75	8.80	7.10	EI	—

Por otra parte la sobreposición de las estructuras de menor energía calculadas sin puentes disulfuro y con los puentes disulfuro típicos tiene un RMSD de 1.750 Å considerando

únicamente a los átomos de la cadena principal, mientras que la sobreposición de la referencia con las estructuras calculadas con los puentes disulfuro experimentales tiene un RMSD de 0.781 Å. Este último dato también indica que rTx1p1 adopta una conformación de puentes disulfuro por primera vez observada en toxinas derivadas del veneno de alacrán.

5.7.6 Estructura tridimensional de la toxina rTx1p1

El análisis de los espectros TOCSY y NOESY permitió la identificación de los 30 sistemas de espín de la molécula, identificando sin ambigüedad el 98.7% de las señales de resonancia de protón (*completeness*). En CYANA se calcularon 200 estructuras en cada uno de los siete ciclos de dinámica de torsión y al final se seleccionaron las 20 estructuras con el valor más bajo de función objetivo. En la figura 5.18, se muestran las gráficas de las estadísticas del ensamble de estructuras de rTx1p1 calculadas en CYANA, en donde se indica el número de restricciones totales en función de la distancia entre los residuos (A) y en función de la posición del residuo en la secuencia (B). En (C) se observa que las correlaciones entre los protones de NN($i,i+2$), α N($i,i+2$), α N($i,i+3$), $\alpha\beta$ ($i,i+3$) y α N($i,i+4$) están en concordancia con la predicción de estructura secundaria a partir de las gráficas del índice de protón.

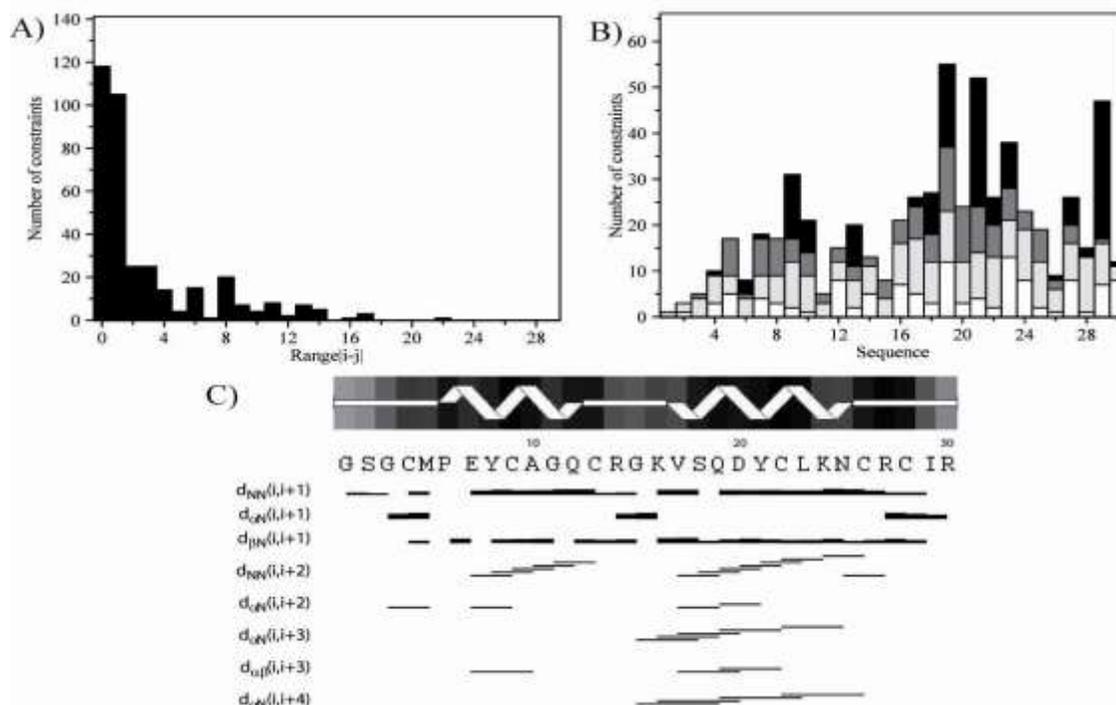


Figura 5.18. Gráficos de las estadísticas de la distribución de señales NOE de la toxina rTx1p1. A. Número de restricciones NOE en función de la posición en la secuencia entre dos residuos. B. Distribución de restricciones NOE intraresiduo (blanco), secuenciales (gris claro), de medio alcance (gris oscuro) y de largo alcance (negro). C. Asignación secuencial, en la que se observa la formación de las hélices por la presencia de señales NOE entre los núcleos NN($i,i+2$).

Las veinte estructuras de menor energía calculadas por CYANA fueron sometidas a un proceso de afinamiento en disolvente explícito. El ensamble refinado en AMBER se muestra en la figura 5.19 A. La estructura de rTx1p1 consiste de una topología de hélice-asa-hélice antiparalelas ($CS\alpha/\alpha$), estabilizada por un patrón no convencional de puentes disulfuro C1-C5, C2-C4 y C3-C6, que por primera vez se describe para toxinas extraídas del veneno de alacrán. La hélice I se forma entre los residuos Pro⁴-Gln¹⁰, mientras que la hélice II se delimita por los residuos Val¹⁵-Asn²³. Un asa de cuatro residuos Cys¹¹-Lys¹⁴ enlaza a las dos hélices. El primer puente C1-C5, Cys²-Cys²⁴, conecta al extremo N-terminal con la región terminal de la hélice II. El segundo puente C2-C4, Cys⁷-Cys²⁰, mantiene unidas a las dos hélices en la parte media en una zona que se destaca por su rigidez, ya que el RMSD entre los residuos de las hélices 4-10 y 15-23 es 0.36 Å. El tercer puente C3-C6, Cys¹¹-Cys²⁶, liga la región final de la hélice I con el extremo C-terminal. La Pro⁴, única en la secuencia, que se encuentra al inicio de la hélice I adopta la configuración *trans*.

La estructura de menor energía se muestra en la representación de listones en la figura 5.19 B, en donde se indican los puentes disulfuro. Mientras que la distribución de carga electrostática de la superficie se observa en la figura 5.19 C. La gráfica de Ramachandran, figura 15.20, fue obtenida durante el proceso de validación de la estructura a través de la aplicación PROCHECK del *Protein Data Bank* e indica que el 82.3% de los residuos se encuentran en las regiones más favorecidas (ABL), 16.7 % en regiones permitidas (a, b, l, p) y solamente el 1% en regiones moderadamente permitidas (~a, ~b, ~l, ~p).

Las similitudes entre los conjuntos de estructuras calculadas para la toxina Tx1 nativa y su homóloga recombinante, rTx1p1, se ilustran en el Anexo A.1b.

La secuencia de la toxina Tx1 fue depositada en la base de datos UNIPROT bajo el código de acceso **B3A0L5**. La estructura tridimensional de la toxina recombinante fue depositada en el *Protein Data Bank* con el código de acceso **2LI3**. Los datos espectroscópicos derivados de la RMN están disponibles en el *Biomolecular Magnetic Resonance Bank*, el número de acceso es **17876**.

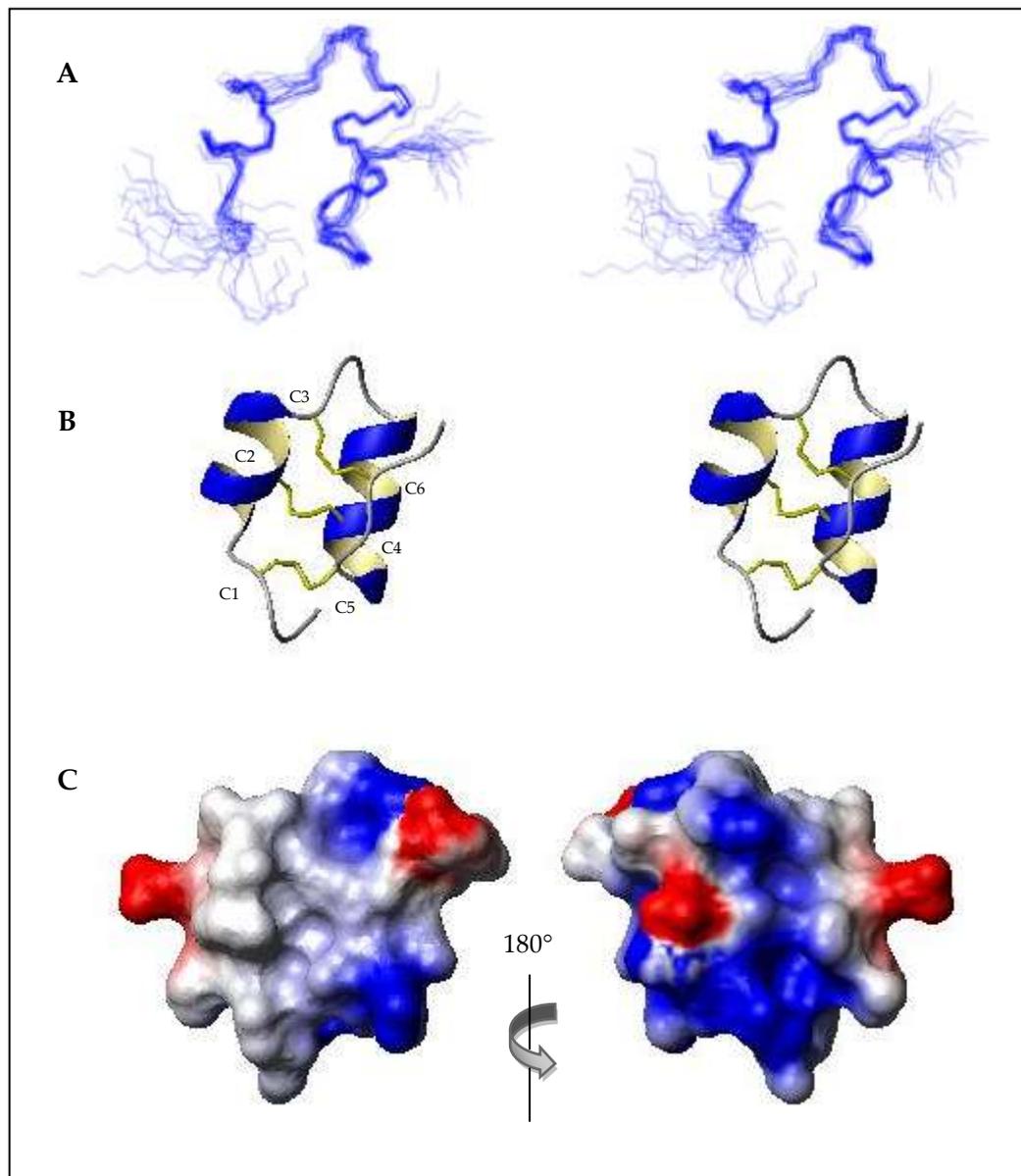


Figura 5.19. Estructura de la toxina rTx1p1 (PDB: 2LI3). A. Imagen estéreo del ensamble de las 20 estructuras calculadas en CYANA que fueron sometidas a refinamiento en disolvente explícito. B. Imagen estéreo de la representación de listones de la estructura de menor energía, los puentes disulfuro están indicados en color amarillo. C. Diagrama de potencial electrostático de superficie de la estructura de menor energía calculado en MOLMOL.

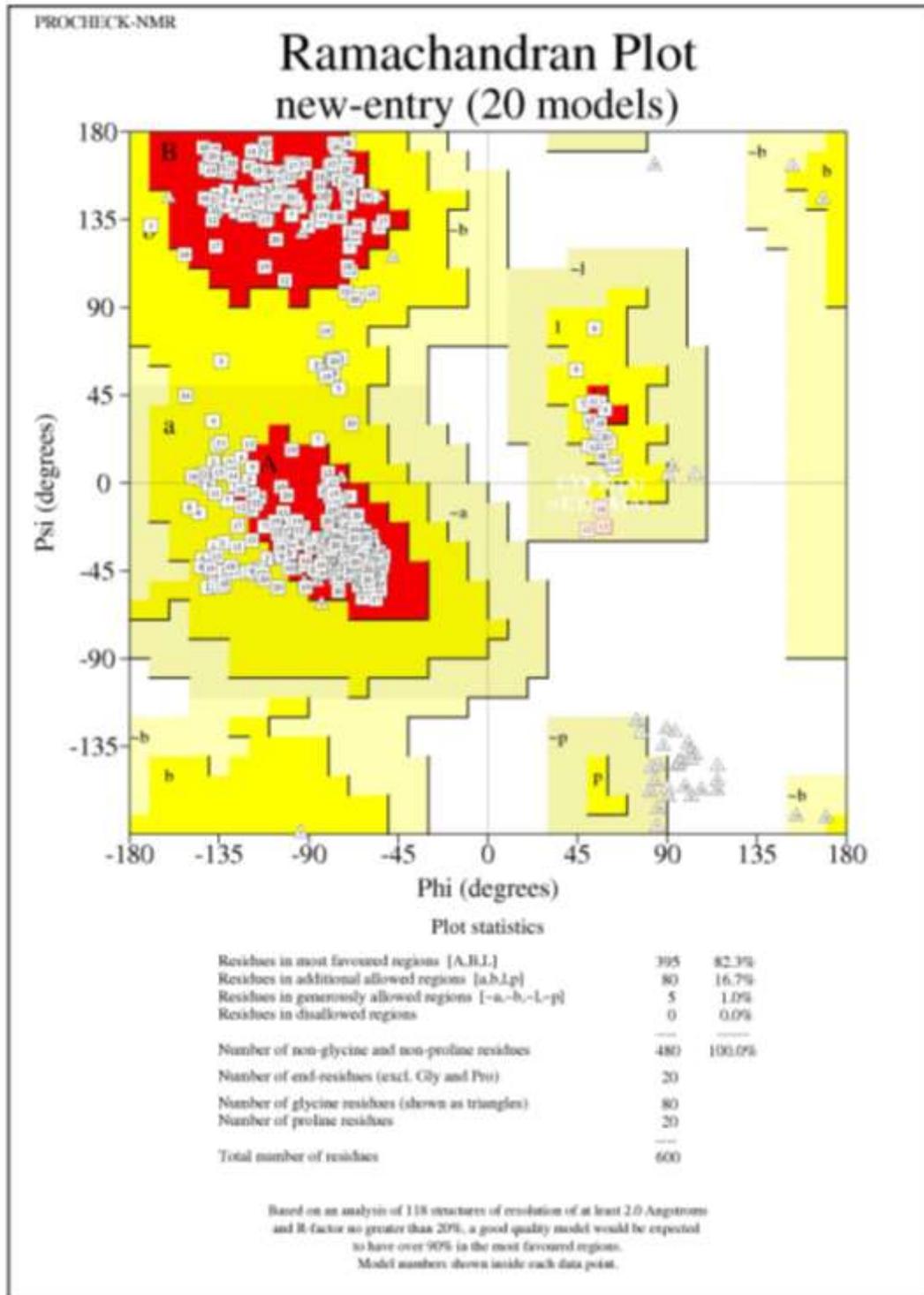


Figura 5.20 Gráfico de Ramachandran del la toxina rTx1p1 generado en la aplicación PROCHECK del *Protein Data Bank*.

5.7.7 Determinación de la estructura de la toxina Tx1 nativa

Debido a que en el espectro NOESY de la toxina Tx1 nativa se observan muy pocas correlaciones NOE intrarresiduo, fue necesario utilizar las asignaciones de la toxina rTx1p1 para identificar las asignaciones secuenciales. De esta manera fue posible identificar el 97.1% de las señales de ^1H . Para el cálculo de la estructura utilizando CYANA se establecieron las restricciones de los puentes disulfuro encontrados en rTx1p1. La estructura se determinó empleando 226 correlaciones NOE totales, 176 de ellas fueron de corto alcance, 24 de mediano alcance y solamente 26 de largo alcance, este último valor es apenas la tercera parte de las restricciones de larga distancia empleadas en el cálculo de la estructura de rTx1p1. En el Anexo A.4 se muestran las estadísticas detalladas de las distintas etapas del cálculo. La figura 5.21 muestra el conjunto de las estructuras de menor energía calculados por CYANA a partir de los datos del espectro NOESY de la toxina Tx1 nativa (A) y la representación de listones de una de ellas (B), así como también el diagrama de listones de la estructura de menor energía de rTx1p1 (C).

La escasez de señales NOE intrarresiduo provoca que la estructura no quede bien definida, por lo que se observan regiones con gran flexibilidad. El RMSD de los átomos de la cadena principal de este conjunto es 1.11 Å, al incluir los átomos de las cadenas laterales se incrementa a 1.71 Å. A pesar de estas limitaciones, es posible realizar una comparación con la esta estructura con la obtenida para rTxp1. En el extremo amino se define un giro, que coincide con la hélice I de rTx1p1, además se define con claridad un segundo elemento helicoidal que corresponde con la hélice II. En el extremo carboxilo se aprecia también la formación de la *pseudo* hebra beta que está ligada a la hélice II.

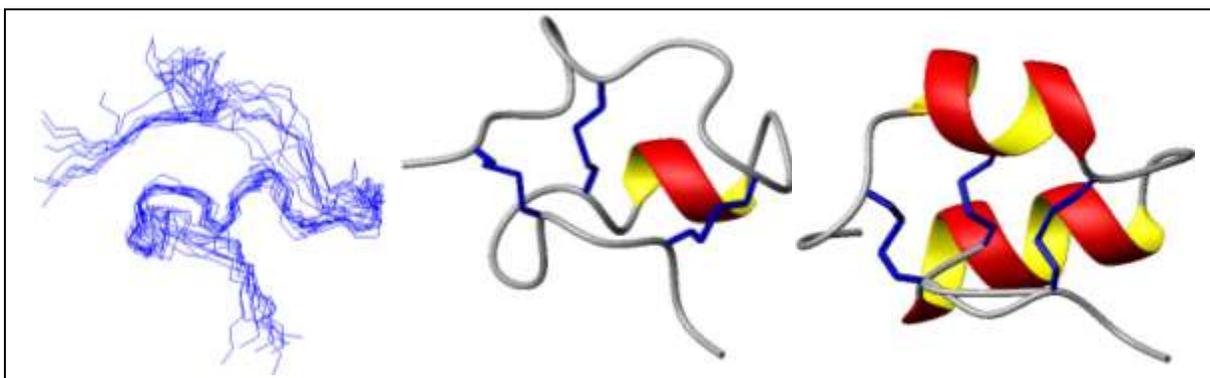


Figura 5.21. Estructura tridimensional de la toxina Tx1 nativa. A. Sobreposición de las diez estructuras de menor energía. B. Representación de listones de la estructura de menor energía, los puentes disulfuro C1-C5, C2-C4, C3-C6 se indican en color azul.

5.7.8 Determinación de la conectividad entre cisteínas de la toxina rTx1p2

Para la identificación de los puentes disulfuro por RMN en la toxina rTx1p2 se siguió el protocolo descrito previamente. En el espectro NOESY se encontró la correlación entre los protones H β -H β de Cys⁷ y Cys²⁴, y entre el HN de la Cys²⁴ y los protones H β de la Cys⁷, que sugieren la formación del puente C2-C5. El volumen de estas señales corresponde a las distancias de 3.55 y 5.09 Å, respectivamente. Por otra parte, debe resaltarse el hecho de que no se observan señales de correlación con los protones H β de las cisteínas restantes. Para las otras cisteínas no fue posible identificar correlaciones cruzadas debido al traslape de algunas señales o bien a la proximidad con las señales sobre la diagonal, ya que por ejemplo los protones HB3 de las Cys¹³ y Cys²² tienen el mismo desplazamiento químico. Posteriormente, se hicieron cálculos en CYANA para determinar la estructura de rTx1p2 sin restricciones de puentes disulfuro (sinPDS) y considerando la formación del puente C2-C5 (2-5PDS) como única restricción adicional de enlace disulfuro. Después, se hicieron los cálculos considerando la formación de tres puentes disulfuro entre C1-C4, C2-C5 y C3-C6 (1-4PDS) y C1-C6, C2-C5 y C3-C4 (1-6PDS), las estadísticas detalladas se encuentran en los Anexos A.8-A.11. En la tabla 5.10 se indican los datos de las restricciones de distancia utilizadas en cada caso y los valores de RMSD (Å) para el ensamble de 20 estructuras. Al comparar estos datos con respecto a los obtenidos para la toxina rTx1p1 (Tabla 5.8), se observa que las correlaciones NOE de corto ($|i-j| \leq 1$) y medio alcance ($1 < |i-j| < 5$) se mantienen constantes y que son las correlaciones de larga distancia ($|i-j| \geq 5$) las que disminuyeron drásticamente en un 75%. La comparación de estos datos indica que en ambas proteínas los sistemas de espín fueron identificados con la misma precisión junto con las correlaciones secuenciales. Las correlaciones con los vecinos cercanos también son muy similares en ambas estructuras, por lo que las regiones de estructura secundaria que dan lugar a la formación de las hélices están bien definidas en ambos casos.

Al analizar las características estructurales en cada ensamble se observa que los cálculos sinPDS, 2-5PDS y 1-6PDS forman dos hélices alfa anti-paralelas, mientras que el ensamble 1-4 PDS produce dos hélices perpendiculares. Cabe destacar que en las estructuras calculadas con el puente disulfuro C2-C5, la formación de los pares C1-C4, C3-C6, C1-C3 y C3-C4 está estructuralmente impedida, por lo que las únicas conectividades que pueden formarse son C1-C6 y C3-C4. Adicionalmente, al calcular el RMSD de los ensambles 1-4PDS y 1-6PDS contra la estructura control sinPDS se obtienen valores de 3.36 y 2.27 Å, respectivamente. Por otra parte al comparar estos mismos ensambles con respecto a las estructuras calculadas con la restricción C2-C5, se obtienen valores de RMSD de 2.38 Å para 1-4PDS y 1.78 Å para 1-6PDS. Consistentemente, las mejores correlaciones con las estructuras control se obtienen considerando los puentes disulfuro C1-C6, C2-C5 y C3-C4, por lo que a partir de los datos

de ^1H -RMN y los cálculos de estructura basados en dinámicas de ángulos de torsión se concluye que la toxina rTx1p2 adopta esta conectividad.

Tabla 5.10. Relación de restricciones de distancia utilizadas en el cálculo de la estructura de la toxina rTx1p2. Las estructuras calculadas sin restricciones de puentes disulfuro (sinPDS) y solamente con la restricción de C2-C5 (2-5PDS), se utilizan como control para definir la conectividad de cisteínas entre las estructuras en la que se consideran los pares C1-C4, C2-C5 y C3-C6 (1-4PDS) y C1-C6, C2-C5 y C3-C4 (1-6PDS).

	sinPDS	2-5PDS*	1-4PDS	1-6PDS
Restricciones NOE				
Totales	313	317	306	308
Corto alcance	235	231	216	223
Medio alcance	65	67	70	67
Largo alcance	13	19	20	18
RMSD (3-30), Å				
Cadena principal	1.87	1.37	0.75	0.63
Cadena principal + lateral	2.60	2.18	1.53	1.24

5.7.9 Estructura tridimensional de la toxina rTx1p2

La estructura de la toxina rTx1p2 consiste del motivo de plegamiento hélice-asa-hélice antiparalelas estabilizada por tres puentes disulfuro ($\text{CS}\alpha/\alpha$) con conectividades C1-C6, C2-C5 y C3-C4, el ensamble de las 20 estructuras de menor energía se muestra en la figura 5.21 A. En esta molécula la hélice I se forma entre los residuos Cys⁷-Gln¹⁰ y la hélice II se enmarca entre los residuos Cys²⁰-Asn²³. Un segmento de nueve residuos sin estructura secundaria regular conecta a las hélices. El primer puente C1-C6, Cys²-Cys²⁶, une a los extremos amino y carboxilo terminales. El segundo puente C2-C5, Cys⁷-Cys²⁴, enlaza a la hélice I con la región contigua al final de la hélice II. El tercer puente C3-C4, Cys¹¹-Cys²⁰, liga la región final de la hélice I con el inicio de la hélice II.

La estructura de menor energía se muestra en la representación de listones en la figura 5.22 B, en donde se remarcan los puentes disulfuro. La superficie de potencial electrostático se muestra en la figura 3.21 C. La gráfica de Ramachandran, figura 5.23, que fue obtenida con la utilidad PROCHECK del Protein Data Bank indica que el 67.3 de los residuos se encuentran en las regiones más favorecidas (A, B, L) y 32.7 % en regiones permitidas (a, b, l, p). El análisis comparativo de las estructuras rTx1p1 y rTx1p2 se encuentra en la sección de la Discusión.

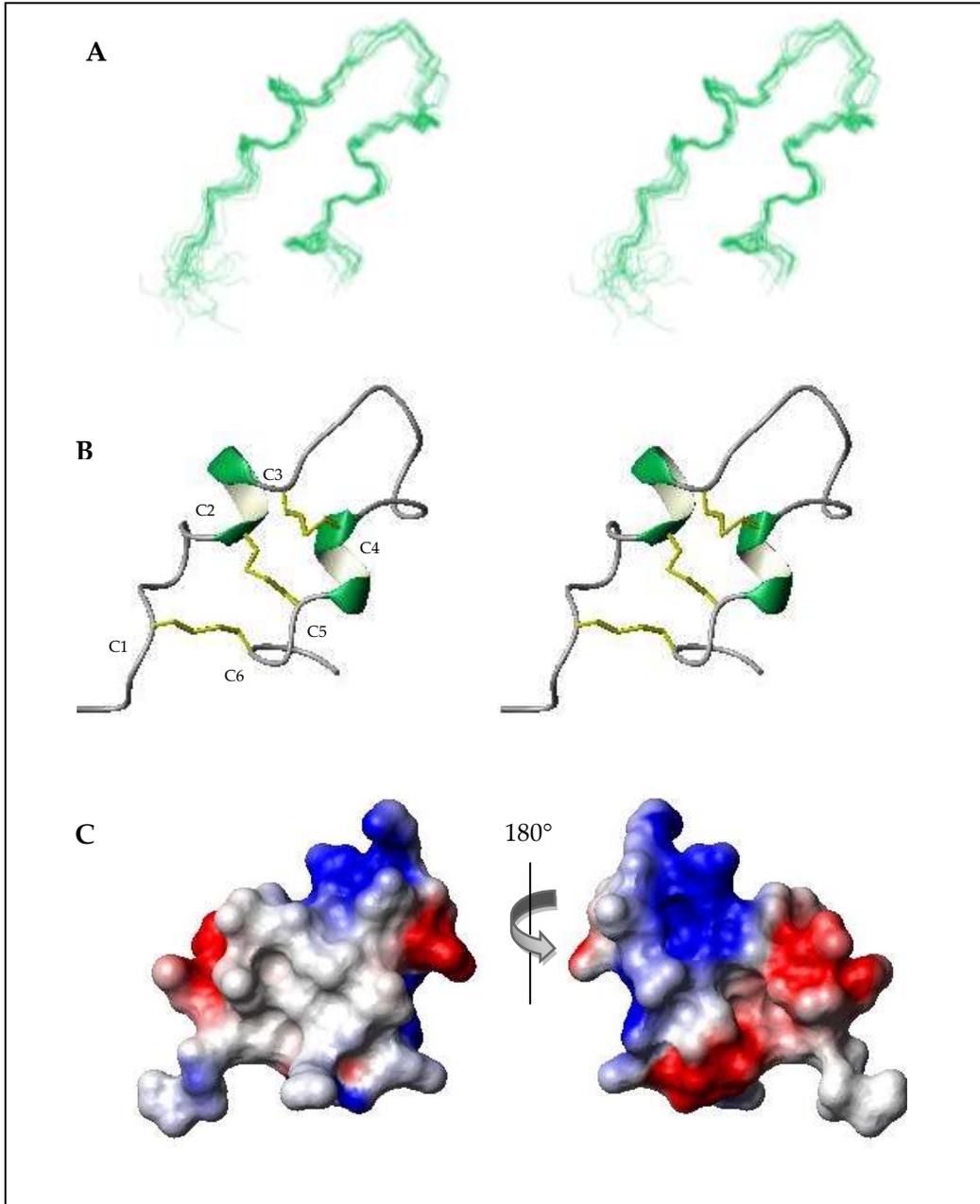


Figura 5.22. Estructura de la toxina rTx1p2. A. Imagen estéreo del ensamble de las 20 estructuras calculadas en CYANA. B. Imagen estéreo de la representación de listones de la estructura de menor energía, los puentes disulfuro están indicados en color amarillo. C. Diagrama de potencial electrostático de superficie de la estructura de menor energía.

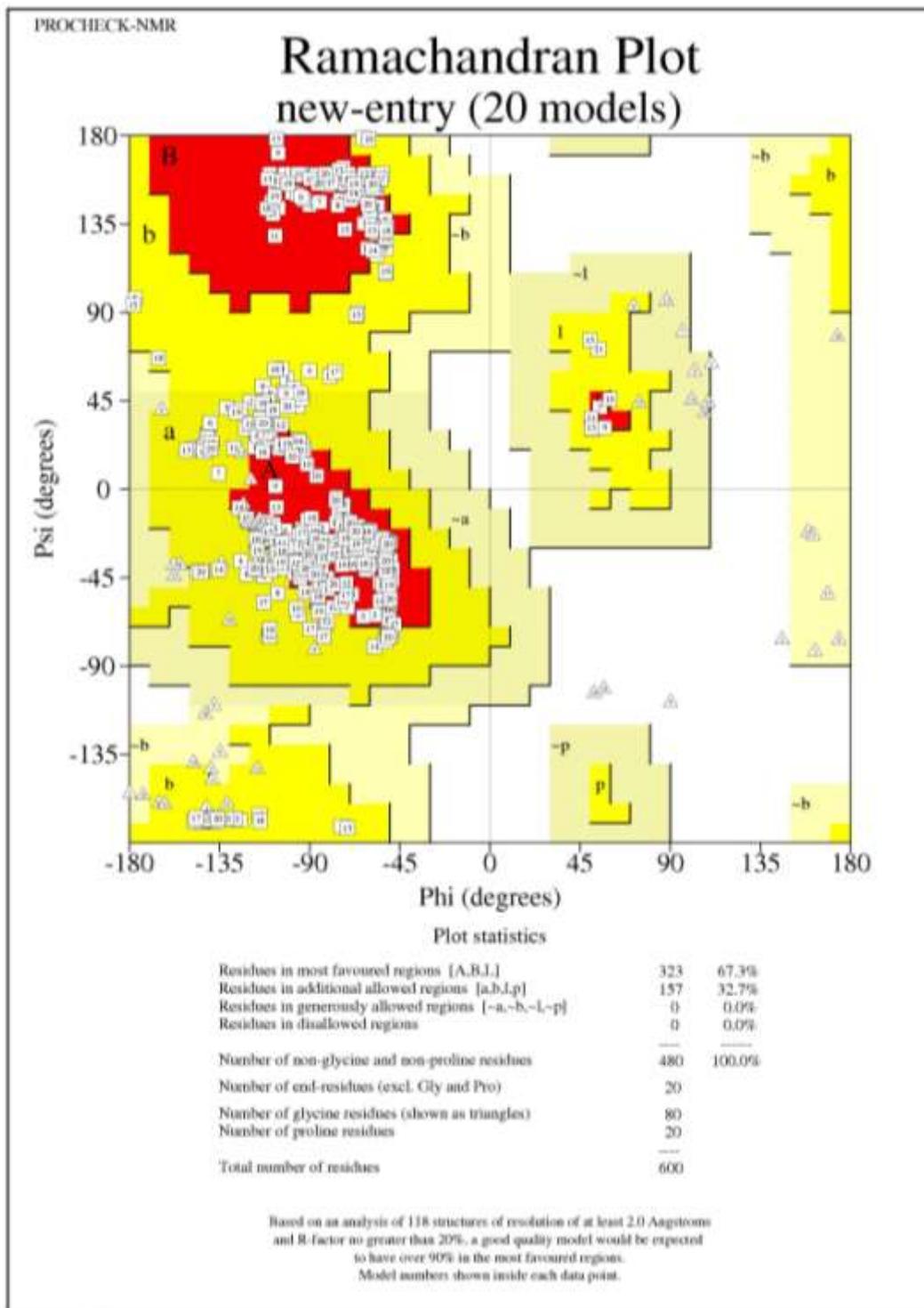


Figura 5.23. Gráfico de Ramachandran de la toxina rTx1p2, generado con la aplicación PROCHECK del Protein Data Bank.

En la figura 5.24, se muestran las gráficas de las estadísticas del ensamble de estructuras de rTx1p2 calculadas en CYANA, en donde se indica el número de restricciones totales en función de la distancia entre los residuos (A) y en función de la posición del residuo en la secuencia (B). En (C) se observa que las correlaciones de distancia entre los protones $\alpha N(i,i+2)$ y $\alpha N(i,i+3)$, indican la formación de la primera hélice entre los residuos Glu⁵ y Arg¹¹, en completa concordancia con la predicción de estructura secundaria a partir de la gráfica de CSI. La segunda hélice quedó definida entre los residuos Leu²¹ y Asn²³; en este caso la predicción de la estructura a partir del CSI sobreestimó la longitud de la hélice (Gln¹⁷-Lys²²).

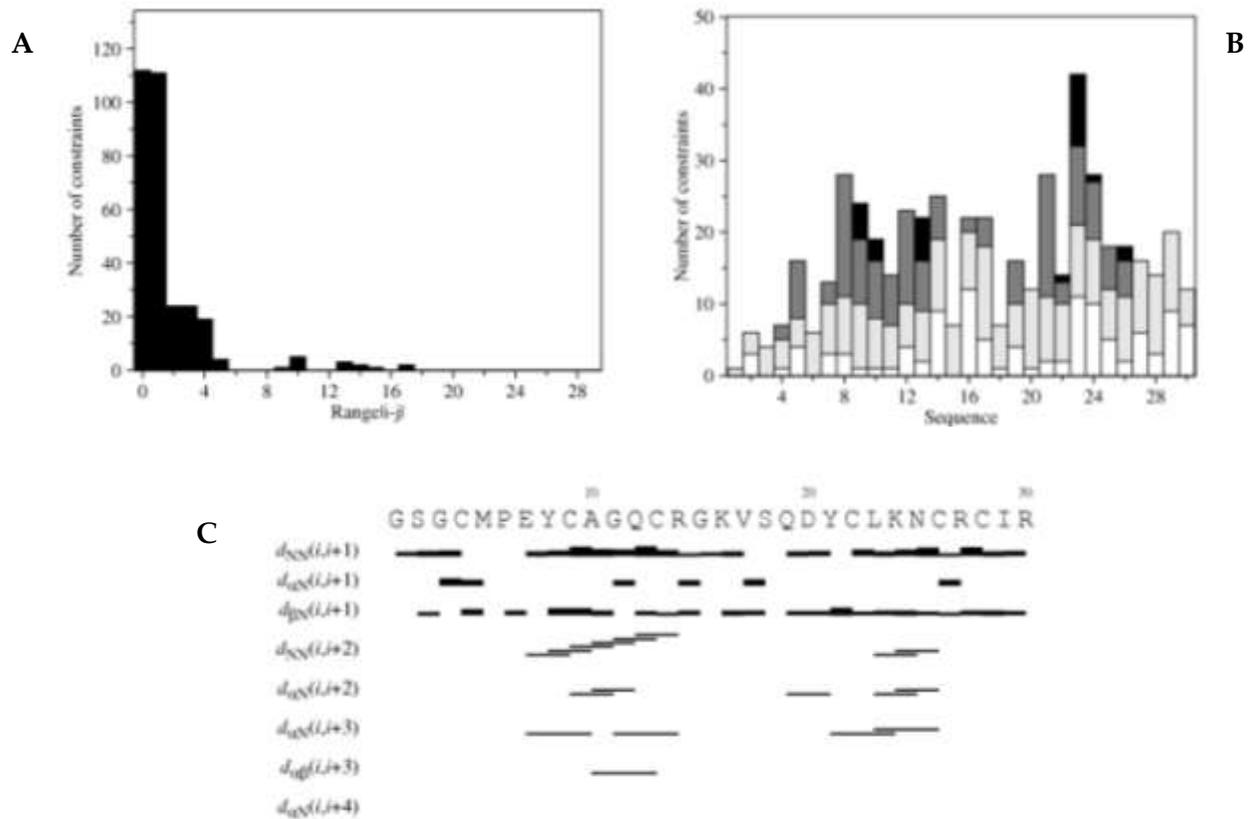


Figura 5.24. Gráficas de la distribución de señales NOE del cálculo de estructura de rTx1p2. con los puentes C1-C6, C2-C5 y C3-C4. La numeración de los residuos incluye a la Gly y Ser incorporadas por el corte enzimático. A. Número de restricciones NOE en función de la posición en la secuencia entre dos residuos. B. Distribución de restricciones NOE intraresiduo (blanco), secuenciales (gris claro), de medio alcance (gris oscuro) y de largo alcance (negro). C. Asignación secuencial.

5.7.10 Las toxinas relacionadas con Tx1.

Al comparar la secuencia de aminoácidos de la toxina Tx1 utilizando BLAST se encontró que además de la Tt28, hay otra toxina que guarda una similitud aún mayor con la Tx1. Se trata de una toxina aislada del veneno del alacrán brasileño *Tityus serrulatus*, que fue identificada como Ts16. La secuencia de aminoácidos de la toxina Ts16 fue depositada en el año 2009 en la base de datos UNIPROT con el número de acceso P86271, por K. C. F. Bordon, W. A. Varanda y E. C. Arantes. De acuerdo con la secuencia primaria y la posición de las cisteínas también fue clasificada como α -KTx, e inclusive se asumió que el apareamiento entre ellas es la conectividad clásica C1-C4, C2-C5 y C3-C6.

A continuación se compara la secuencia de la toxina Tx1 con Ts16 y la Tt28:

TtTx1	GCMPEY CAGQ CRGKVSQDY CLKN CRCI-R	%I
Ts16	GCMKEY CAGQ CRGKVSQDY CLKH CKCI PR	89
Tt28	GCTPEY CSMW CKVKVSQNY CVKN CKCPGR	66
Consenso	** ***: *: *****:***:***:*** *	

Debido a la similitud secuencial entre las toxinas Tx1, Ts16 y Tt28, en nuestro grupo de investigación se decidió obtener a la toxina Ts16 de forma recombinante (rTs16) usando como molde el plásmido que produce a la rTx1, con el fin de determinar su estructura por RMN. El diseño del gen, la obtención de la toxina, la adquisición de los espectros de RMN y el afinamiento de la estructura fueron reportados previamente [Flores 2012]. Por otra parte, el trabajo relacionado con la obtención de la toxina Tt28 recombinante también ha sido iniciado, por lo que en breve será establecida su estructura.

5.7.11 Determinación de la estructura tridimensional de la toxina recombinante Ts16.

La determinación de la estructura tridimensional en disolución de la toxina Ts16 se describe a continuación. Estos resultados fueron obtenidos siguiendo el protocolo previamente descrito para la toxina Tx1.

La interpretación conjunta de los espectros TOCSY y NOESY permitió identificar 30 de los 31 sistemas de espín. El único aminoácido que no fue identificado fue la glicina inicial, que corresponde a uno de los dos residuos adicionales producidos por el corte con trombina (Gly-Ser) en el extremo amino. El porcentaje de asignación (*completeness*) alcanzado fue 96.8%.

En el espectro NOESY de la toxina Ts16 se observan correlaciones entre los átomos H β -H β de las cisteínas C1-C5, Cys²-Cys²⁴, y C2-C4, Cys⁷-Cys²⁰, que sugieren la formación de estos

puentes disulfuro. La intensidad de estas señales equivale a una distancia de 3.5 Å para HB2-Cys⁴ con HB2-Cys²⁶; y 2.8-4.2 Å para las correlaciones entre HB2/3-Cys⁹ con HB2/3-Cys²². Adicionalmente, se observan correlaciones entre el HB2-Cys⁴ con el HN-Lys²⁷, HA2-Gly³ con el HN-Cys²⁶, que se derivan de la proximidad de la unión C1-C5. Mientras que las señales NOE del HN-Cys⁹ con QD*-Leu²³, y de HB2/3-Cys⁹ con QD*-Leu²³, son consecuencia de la unión entre C2-C4. Es importante mencionar que a pesar de la buena dispersión de las señales entre los protones beta de las Cys^{2,20} y Cys^{7,24}, no se presentan correlaciones H β -H β entre los pares C1-C4 y C2-C5. Por otra parte, tal como ocurrió en el espectro de la Tx1, el traslape de los H β de las Cys¹³-Cys²⁸, C3-C6, impide la identificación de las correlaciones cruzadas.

Adicionalmente, para la identificación de las conectividades entre cisteínas se tomaron como referencia las correlaciones NOE H β -H β entre las cisteínas C1-C5, Cys²-Cys²⁴, y C2-C4, Cys⁷-Cys²⁰. Además de que tal como se hizo con la toxina rTx1p1, el cálculo de la estructura en CYANA se hizo empleando tres sets de restricciones: A. Sin indicar puentes disulfuro. B. Incluyendo los puentes clásicos, C1-C4, C2-C5 y C3-C6, y C. Incluyendo los puentes encontrados en la toxina Tx1, C1-C5, C2-C4 y C3-C6. En la Tabla 5.11 se indican las restricciones utilizadas en cada cálculo y los valores de RMSD de la cadena principal y la cadena principal junto con las cadenas laterales. Las estadísticas detalladas de cada uno de los cálculos se reportan en los Anexos A.12-A.14.

Tabla 5.11. Relación del número de restricciones de distancia utilizadas en el cálculo de la estructura de la toxina rTs16. A. Estructuras calculadas sin restricciones de puentes disulfuro (sinPDS). B. Estructuras calculadas considerando los pares típicos en KTXs: C1-C4, C2-C5 y C3-C6 (PDS_{típicos}^B). C. Estructuras calculadas considerando los puentes observados en la Tx1 C1-C5, C2-C4 y C3-C6.

	sinPDS ^A	PDS _{típicos} ^B	PDS _{Tx1} ^C
Restricciones NOE			
Totales	437	419	421
Corto alcance	270	258	251
Medio alcance	87	74	85
Largo alcance	80	87	85
RMSD (3-30), Å			
Cadena principal	0.37	0.25	0.35
Cadena principal + lateral	0.87	0.83	1.00

Al empalmar las veinte estructuras sobrepuestas con los puentes típicos (PDB_{típicos}) y las estructuras con los puentes observados en la toxina Tx1 (PDS_{Tx1}), con respecto a las estructuras calculadas sin restricciones de puentes (sinPDS) se obtienen valores de RMSD de

0.638 y 0.710 Å. Estos resultados son aparentemente contradictorios a la tesis de la formación de los puentes disulfuro C1-C5, C2-C4 y C3-C6 observados en Tx1, ya que indican que la similitud es mayor entre la estructura de referencia (sinPDS) y la de los puentes típicos (PDS_{típicos}). Sin embargo, la medición de las distancias entre los protones HB2 de las cisteínas en las estructuras sinPDS, mostradas en la Tabla 5.11, sugiere que la formación de los puentes disulfuro típicos está impedida: la distancia promedio entre los HB2 de las cisteínas C2-C4 es de 2.97 Å, lo que sugiere fuertemente la formación de un puente disulfuro entre Cys⁷ y Cys²⁰, observado en la estructura de la toxina Tx1. Continuando con el análisis de la Tabla 5.12, al formarse el puente C2-C4 se define también la unión entre C3-C6; a la presencia de esta cistina se le atribuye la segunda distancia más corta entre las cisteínas del ensamble (5.59 Å) y se descarta que se presente la unión C3-C4. Lamentablemente, a partir de la medición de distancias no es posible definir el puente C1-C5; sin embargo, la masa molecular de la toxina rTs16 determinada por MS-MALDI-TOF coincide con la oxidación de todas las cisteínas presentes en la molécula, es decir, presenta una pérdida de seis unidades de masa respecto al valor esperado para la toxina reducida, por lo que se asume que las cisteínas C1-C5 se unen mediante un enlace covalente. Esta evidencia conjunta indica que en la toxina Ts16 la conectividad entre las cisteínas es la misma que la encontrada para la toxina Tx1: C1-C5, C2-C4 y C3-C6.

Tabla 5.12. Conectividad entre cisteínas en Ts16. Para la identificación de las cisteínas que pueden estar formando puentes disulfuro en rTs16, se midieron las distancias (Å) entre los protones H β -H β en las estructuras que fueron calculadas sin restricciones de puentes disulfuro (sinPDS). Aquellos puentes que están impedidos por la geometría de la molécula, con distancias entre cisteínas mayores a 10 Å, se indican como EI (especialmente impedidos).

	C1	C2	C3	C4	C5	C6
C1	—					
C2	7.83	—				
C3	EI	7.06	—			
C4	9.79	2.97	5.56	—		
C5	9.12	8.01	EI	6.97	—	
C6	EI	9.62	5.59	7.2	9.64	—

Para realizar el cálculo de la estructura de la toxina rTs16 con el programa CYANA, además de las restricciones de puentes disulfuro C1-C5, C2-C4 y C3-C6, se utilizaron 421 restricciones de distancia (en promedio 13.6 por residuo), de las cuales 251 son de corto alcance con $|i-j| \leq 1$, 85 son de medio alcance con $1 < |i-j| < 5$ y 85 de largo alcance con $|i-j| \geq 5$. El valor promedio final de la función objetivo obtenido es 0.17. El RMSD de los átomos de la cadena principal entre los residuos 3-31 es 0.35 Å, mientras que si se considera la

contribución de las cadenas laterales el RMSD es 1.00 Å. En la figura 5.25 se muestra la distribución de correlaciones NOE determinadas para la toxina Ts16. El análisis de estos datos indica que en esta estructura también se definen claramente dos elementos helicoidales; las correlaciones de distancia $NN(i,i+2)$, $\alpha N(i,i+3)$, $\alpha\beta(i,i+3)$ y $\alpha N(i,i+4)$ indican que la hélice I se forma entre los residuos Lys4-Gln10, mientras que la hélice II incluye a los residuos Lys¹⁴-His²³.

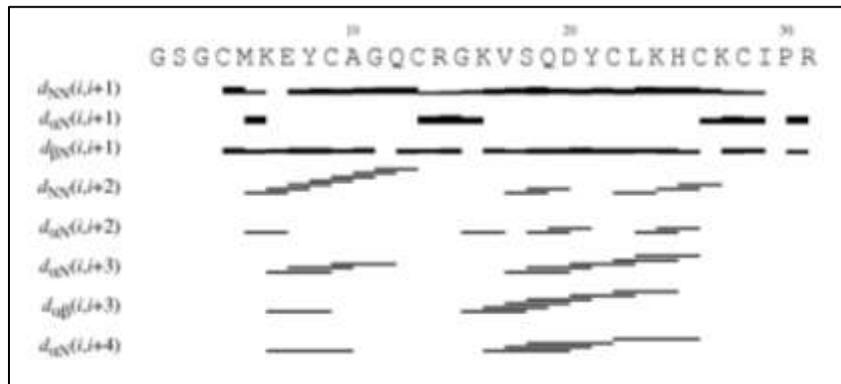


Figura 5.25. Distribución de señales NOE del cálculo de la estructura de la toxina rTs16.

La estructura tridimensional de la toxina rTs16 obtenida por CYANA se muestra en la figura 5.26. En esta imagen, en el panel A se muestra la sobreposición de las veinte estructuras, en el B, la representación de listones indicando los puentes disulfuro de la estructura de menor energía y en C, la superficie de potencial electrostático. La hélice I se forma entre los residuos Lys⁴-Gln¹⁰, mientras que la hélice II se delimita por los residuos Lys¹⁴-His²³. Un asa de tres residuos Gly¹¹-Gly¹³ enlaza a las dos hélices. El primer puente C1-C5, Cys²-Cys²⁴, conecta al extremo amino con la región terminal de la hélice II. El segundo puente C2-C4, Cys⁷-Cys²⁰, mantiene unidas a las dos hélices en la parte media en una zona que se destaca por su rigidez, ya que el RMSD entre los residuos de las hélices 4-10 y 14-23 es 0.32 Å. El tercer puente C3-C6, Cys¹¹-Cys²⁶, liga la región final de la hélice I con el extremo C-terminal. La Pro²⁸, única en la secuencia, que se encuentra en la región C-terminal adopta la configuración *trans*.

Las estructuras de la toxina rTs16 obtenidas por CYANA fueron posteriormente sometidas a un proceso de afinamiento con disolvente explícito. La estructura de la toxina Ts16 conserva el patrón CS α / α con una topología de hélice-asa-hélice antiparalelas estabilizadas por el patrón de puentes disulfuro C1-C5, C2-C4 y C3-C6.

Las estructuras refinadas fueron depositadas en el *Protein Data Bank*, bajo el código de acceso es **2LKA**. Los datos espectroscópicos derivados del análisis por RMN fueron depositados en el BMRB con el número de acceso **17987**.

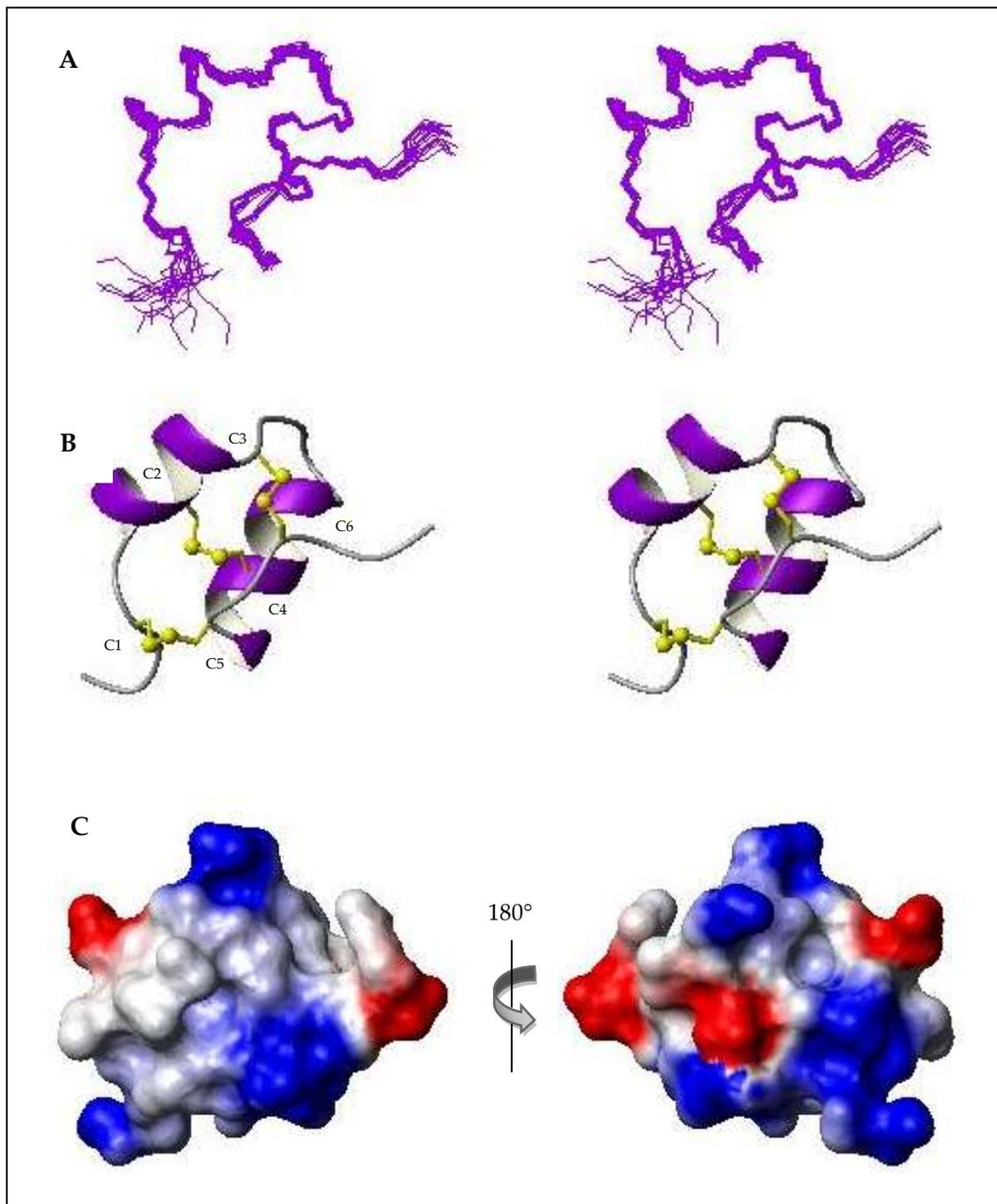


Figura 5.26. Estructura de la toxina rTs16. A. Imagen estéreo de la sobreposición de las 20 estructuras calculadas en CYANA. B. Imagen estéreo de la representación de listones de la estructura de menor energía, los puentes disulfuro están indicados en color amarillo. C. Diagrama de potencial electrostático de superficie de la estructura de menor energía.

6. DISCUSIÓN

6.1 Un nuevo motivo de plegamiento para toxinas del veneno de alacrán.

6.1.1. Comparación con la familia de toxinas CS α / α .

Las características estructurales de las toxinas Tx1 y Ts16 guardan una estrecha similitud con la estructura reportada para las toxinas de la familia κ -KTx: en ambos casos se presenta el motivo de plegamiento CS α / α , que a la fecha puede ser considerado como inusual en el plegamiento de toxinas de origen animal.

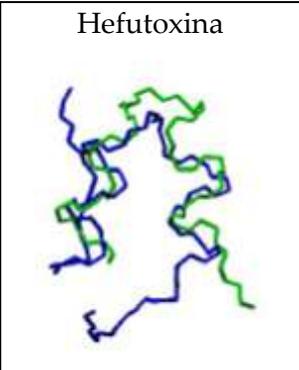
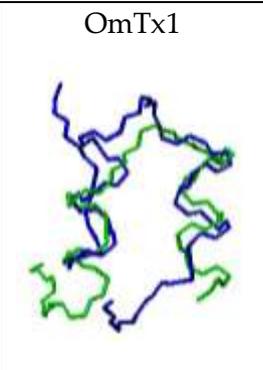
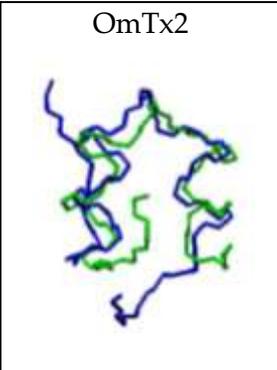
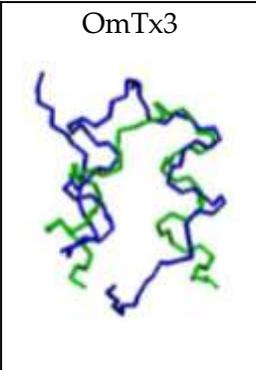
La familia κ -KTx, a la que pertenecen la κ -Hefutoxina y las toxinas Om entre otras, tiene como característica distintiva la presencia de dos puentes disulfuro, y aunque la Tx1 y la Ts16 adoptan este motivo de plegamiento, la presencia de tres puentes disulfuro en estas moléculas impide hacer el alineamiento de secuencias basados en la posición de las cisteínas [Tytgat *et al.* 1989]. En la Tabla 6.1 se comparan las secuencias de algunos miembros de la familia κ -KTx con la toxina Tx1, así como también el efecto (% de bloqueo de la corriente) causado a tres tipos de canales Kv. Basados en esta clasificación resulta evidente que Tx1 y Ts16 no pueden ser consideradas dentro de la familia de las toxinas kappa, sin embargo su toxicidad es comparable con estas moléculas.

Tabla 6.1. Comparación de secuencias y porcentaje de bloqueo sobre canales Kv de los miembros representativos de las κ -toxinas y la Tx1. La toxina Tx1 tiene un puente disulfuro adicional por lo que la secuencia no puede ser alineada con la familia κ -KTx. Los residuos Y y K corresponden a la "díada funcional".*La toxina Tx1 fue evaluada en el canal *Shaker*.

Toxina	Secuencia	Res	[Toxina]	% Bloqueo a canales		
			μ M	Kv1.1	Kv1.2	Kv1.3
Hefutoxina	GHAC <u>Y</u> RNCWREGNDEET <u>C</u> <u>K</u> ERC-----	22	40	0	17	50
κ -KTx1.3	GFG <u>C</u> <u>Y</u> RSCKWAGHDEET <u>C</u> <u>K</u> KECS-----	23	1000	0	0	0
OmTx1	-D <u>P</u> <u>C</u> <u>Y</u> EVCLQQHGNV <u>K</u> EE <u>A</u> <u>C</u> <u>K</u> HPVE-	26	500	17	8	33
OmTx2	-D <u>P</u> <u>C</u> <u>Y</u> EVCLQQHGNV <u>K</u> EE <u>A</u> <u>C</u> <u>K</u> HPVEY	27	500	12	10	8
OmTx3	ND <u>P</u> <u>C</u> <u>Y</u> EVCLQHTGNV <u>K</u> EE <u>A</u> <u>C</u> <u>Q</u> -----	23	500	24	36	70
κ -KTx2.5	YD <u>A</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>H</u> <u>P</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>C</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>P</u>	28	16	20	0	0
Tx1	G <u>C</u> <u>M</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>C</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>C</u> <u>R</u> <u>C</u> <u>I</u> <u>R</u>	28	200	89*	75	82

Para distinguir las características de la toxina Tx1 con respecto a los miembros de la familia de las kappa-toxinas, se hizo un alineamiento por parejas de la estructura tridimensional utilizando el algoritmo FATCAT flexible [Ye y Godzik 2003]. Los resultados se resumen en la tabla 6.2, en donde la estructura de la cadena principal de la toxina Tx1 está representada en color azul y la de toxina con la cual se compara está indicada en color verde. En todos los alineamientos se observa la convergencia entre los segmentos helicoidales, destacando que la mayor similitud estructural se obtiene con la toxina OmTx2, con la que el RMSD es de 1.49 Å.

Tabla 6.2. Resultados del alineamiento estructural con FATCAT-flexible de la toxina rTx1 con algunos miembros de la familia κ -KTx. *RA = residuos alineados.

	Hefutoxina	OmTx1	OmTx2	OmTx3
				
*RA	21	22	22	23
RMSD	1.82 Å	1.55 Å	1.49 Å	3.35 Å

Adicionalmente, se hizo la comparación de la posición de los residuos de la díada funcional (la díada está constituida por un residuo básico y un aromático, a una distancia ≤ 7 Å), ya que para la toxinas OmTx1, OmTx2 y hefutoxina se reportó la presencia de pares Lys-Tyr que formaban la díada. Al medir las distancias entre el H α de la lisina y los protones aromáticos de la tirosina (H δ,ϵ), que definen la restricción de la díada, se encontró que en prácticamente todas las estructuras de la familia κ -KTx depositadas en el PDB “la díada funcional” está a una distancia mayor de 7 Å, por lo que podría ser un error que estos pares de residuos hayan sido considerados como tales. Es importante mencionar que la díada funcional fue identificada para toxinas de la familia α/β y aunque existen varios reportes de su importancia para mediar la interacción entre la toxina y el canal [Dauplais *et al.* 1997], estos mecanismos de interacción no necesariamente deben cumplirse en toxinas que tienen una estructura tridimensional notablemente distinta. La identificación de la díada y su función en la familia κ -Tx deben ser confirmadas experimentalmente. En la figura 6.1 se muestran las estructuras de algunas kappa-toxinas indicando los puentes disulfuro y la

supuesta “díada funcional” inferida por comparación con las estructuras de toxinas con plegamientos $CS\alpha/\beta$. En el caso particular de la Tx1 los residuos Tyr¹⁹-Lys²² y Tyr¹⁹-Arg²⁵ cumplen con el requisito establecido para la díada ya que se encuentran a una distancia promedio de 7Å. Llama la atención que en la toxina Tx1 los residuos de la posible díada se encuentran en la misma hélice, a diferencia de las toxinas de la familia kappa en donde se ubican en hélices contrapuestas.

Por otra parte, al comparar la secuencia de la toxina Tx1 con las toxinas aisladas del veneno de alacrán, la identidad es menor al 40%. Solamente la toxinas Tt28 y Ts16 presentan una identidad significativamente mayor: 65% y 89%, respectivamente.

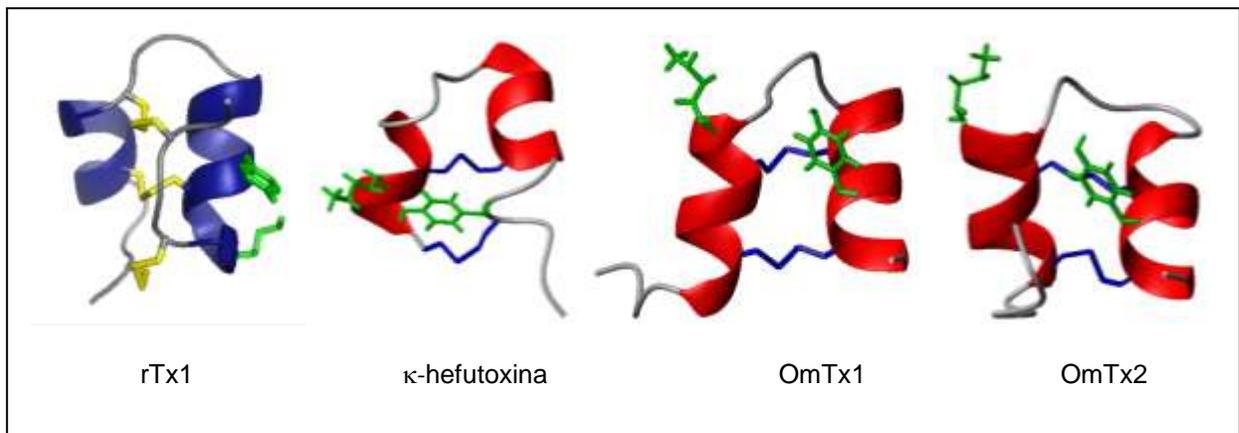


Figura 6.1. Representación de listones de las estructuras tridimensionales de algunas toxinas de la familia κ -KTx. En color verde se indican los residuos de la díada funcional Lys y Tyr.

6.1.2. Comparación con la familia de toxinas $CS\alpha/\beta$.

La toxina Tt28 fue reportada como un bloqueador de canales Kv1.2 y Kv1.3. A la fecha, la estructura de esta molécula y la conectividad de las cisteínas no han sido reportadas; sin embargo, los autores la propusieron como el primer miembro conocido de una nueva familia de toxinas bloqueadoras de canales de potasio, debido a que el espaciamiento entre las cisteínas permite alinear la secuencia de aminoácidos con las toxinas α -KTx. El nombre sistemático que se adoptó para la Tt28 fue α -KTx20.1.

Con base en esta clasificación las toxinas Tx1 y Ts16 deberían ser agrupadas dentro de la familia α -KTx20; sin embargo, las estructuras de este grupo presentan el motivo de plegamiento $CS\alpha/\beta$, por lo que Tx1 y Ts16 que son $CS\alpha/\alpha$ tampoco pueden ser consideradas dentro de esta familia.

Al sobreponer las estructuras de la toxina Tx1 con algunos miembros representativos de la familia de toxina $CS\alpha/\beta$, hay semejanzas notables. La primera hélice alfa coincide en ambos

motivos, mientras que la segunda hélice en el patrón CS α / α se ubica en la región en la que aparece la primera hebra beta del patrón CS α / β . Finalmente, la extensión C-terminal sin estructura definida se sobrepone con la segunda hebra beta del patrón CS α / β . Estas coincidencias sugieren que ambos patrones de plegamiento podrían estar estrechamente relacionados, por lo que es posible que exista (o que haya existido entre los componentes del veneno del alacrán) una conformación intermedia que favorezca esta transición. En la Tabla 6.3 se muestran los resultados de los alineamientos con los miembros representativos de las toxinas CS α / β , que fueron obtenidos con el programa CE (*Combinatorial Extension*) [Shindyalov y Bourne 1998]. Adicionalmente, en la figura 6.2 se observan las imágenes del alineamiento estructural de la toxina Tx1 con la caribdotoxina (PDB: 2CRD) y la noxiustoxina (PDB: 1SXM). En estas representaciones están indicadas las cadenas laterales de los residuos de la díada funcional, residuos K27 y Y36 de la caribdotoxina y K28 y Y37 de la noxiustoxina. Si bien la identificación de la díada funcional debe ser demostrada por estudios de mutagénesis y su consecuente repercusión en la actividad biológica, la similitud estructural de los residuos K21 y Y19 de la Tx1 con los de la díada funcional, sugiere que estos residuos pudieran estar involucrados en el reconocimiento del receptor.

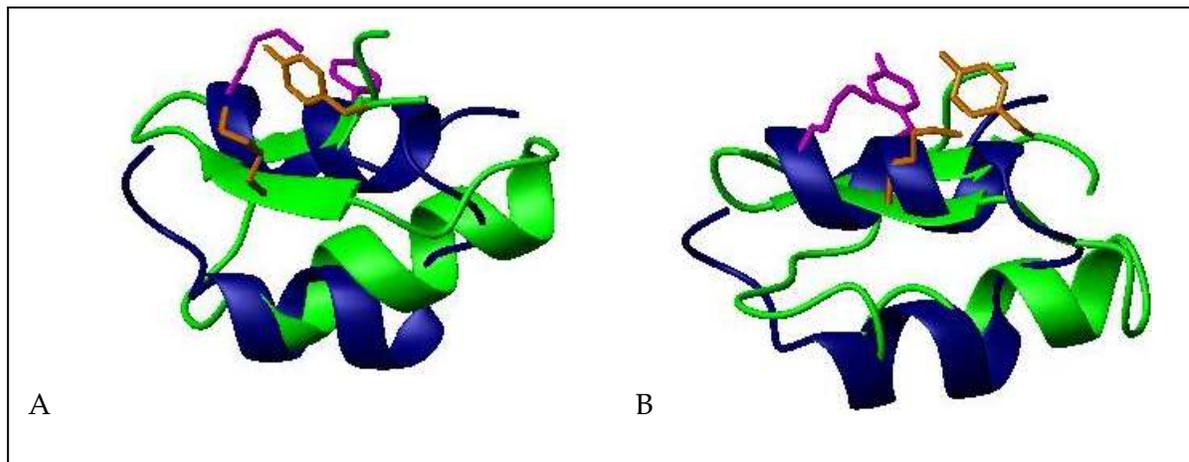


Figura 6.2. Alineamiento estructural de la toxina Tx1 con toxinas representativas de la familia CS α / β . A. Tx1 (azul) y caribdotoxina (verde). B. Tx1 (azul) y noxiustoxina (verde). Las cadenas laterales de los residuos K y Y de la díada funcional se muestran en amarillo para la caribdotoxina y la noxiustoxina. Los residuos de la Tx1, K21 y Y19, que podrían corresponder a la díada funcional se muestran en magenta.

Tabla 6.3. Alineamiento de la secuencia de Tx1 con miembros representativos de la familia α -KTx. En “negritas” se indica la secuencia de la Tx1, debajo la secuencia de la de la α -KTx correspondiente. Descripción de columnas: %I=porcentaje de identidad, RA/G=Residuos Alineados/Huecos. El *Z-score* es una medida estadística que relaciona el alineamiento de estructuras aleatorias. Las proteínas que poseen un plegamiento similar tienen un *Z-score* menor o igual a 3.5.

	Toxina (PDB)	Secuencias alineadas	RMSD, Å	Z-score	%I	RA/H
KT α 1.1	Caribdotoxina (2CRD)	GCMPEYCAGQCRGKVS ---- QDYCLKNC SCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKC	4.9	1.2	12.5	24/4
KT α 2.1	Noxiustoxina (1SXM)	GCMPEYCAGQCR ---- GKVSQDYCLKNCRC CTSPKQCSKPKCKELYGSSAG-AKCMNGKCK	3.2	1.6	16.7	24/7
KT α 3.1	Kaliotoxina (2KTX)	CMPEYCAGQCRG - KVSQDYCLKNCRC SGSPQCLKPKCKDAGM-RFGKCMNRKC	3.7	1.6	16.7	24/2
KT α 4.1	TsTxKalfa (1HP2)	GCMPEYCAG - QCRGKVSQDYCLKNCRC RGSPECLPKCKEAI GK-AAGKCMNGKC	3.7	1.2	25.0	24/4
KT α 5.1	Scylatoxina (1SCY)	CMPEYCAGQCR - GKVSQDYCLKNCRC CNLRMCQLSCRSLLGLL GK-CIGDKCE	3.4	2.0	20.8	24/2
KT α 6.2	Maurottoxina (1TXM)	GCMPEYCAGQCRGKVS --- QDYCLKNC CTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCI NKSC	4.8	1.6	20.8	24/3
KT α 7.1	Pi2 (2PTA)	CMPEYCAGQCRG - KVSQDYCLKNCR TNPKQCYPHCKKETGYPNAKCMNRKC	4.1	1.6	16.7	24/2
KT α 8.1	AmP01	CMPEYCAGQCR - GKVSQDYCLKNCRC VSCEDCPEHCSTQKAQAK-CDNDKCV	3.5	2.0	20.8	24/2
KT α 9.1	BmP02	CMPEYCAGQCR - GKVSQDYCLKNCRC VGCEECPMHCKGKNAKPT-CDDGV CN	3.5	2.0	16.7	24/2
KT α 10.1	Cobatoxina (1PJV)	GSGCMPEYCAGQCRGKVSQDYCLKNCRC VYRTCDKDKRRGYRS----GKCI NNAC	4.2	1.2	12.5	24/4
KT α 12.1	Butantoxina (1C55)	MPEYCAGQC - RGKVSQDYCLKNCRC ASRECYDPCFKAFGRAHGKCMNNKC	4.1	2.0	16.7	24/1
KT α 13.1	Tc1 (1JLZ)	GQCRGKVSQDYCLKNCRCI KKCKGSG---KCI NGRCKC	2.8	1.2	18.8	16/3
KT α 19.1	Bmk37 (1Q2K)	GSGCMPEYCAGQCRGKVSQDYCLKNCRC YSSDCRVKCVAMGFSS----GKCI NSKC	4.3	1.2	16.7	24/4
-	MTx-HsTx1 (1WPD)	SGCMPEYCAGQCRGKVSQDYCLKNCR SKDCYAPCRKQTGCP-YGKCMNRKC	3.7	2.0	16.7	24/2

6.2 Las características estructurales de Tx1 y su actividad biológica.

La toxina Tx1 es una molécula cuya estructura tridimensional está constituida por dos hélices alfa que se alinean con un sentido antiparalelo, y por un segmento en la región C-terminal cuya estructura secundaria no está definida pero que se asemeja a una hebra beta. La presencia de tres puentes disulfuro que entrecruzan a las hélices y a la “pseudo-hebra beta” le confieren a la molécula un alto grado de rigidez.

Por otra parte, las características electrostáticas de la superficie de la molécula revelan que posee regiones con una marcada carga positiva, generada por la presencia de las cadenas laterales expuesta de residuos de arginina y lisina. Es de llamar la atención que además de la presencia de una posible díada funcional (Tyr¹⁹, Lys²²), la distribución de los residuos de Arg y Lys genera un anillo de residuos básicos alrededor de la Tyr¹⁹ de la díada, mostrados en la figura 6.3. Una distribución similar de cargas positivas fue identificada en la conotoxina *pl14a*, demostrándose que este anillo es la región responsable de la interacción con el receptor al cual se une [Mondal *et al.* 2007].

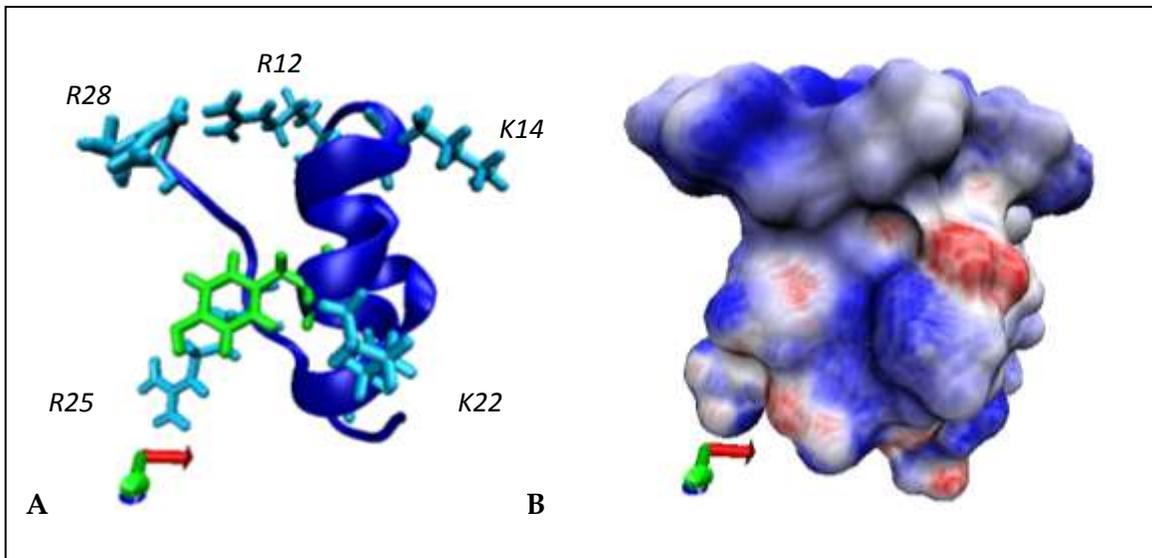


Figura 6.3. Análisis de la estructura de la toxina Tx1. A. Diagrama de listones donde se muestran los residuos básicos (R12, R25, R28, K14 y K22) formando un anillo alrededor de la tirosina de la posible díada funcional, Y19. B. Representación del potencial electrostático de la superficie de la toxina Tx1.

La evaluación electrofisiológica de la toxina Tt28 en canales Kv mostró que esta toxina tiene una mayor afinidad por los canales Kv1.2 y Kv1.3, mientras que en los canales *Shaker*, Kv1.1, Kv1.4, Kv1.5 y hERG no fueron registrados cambios en la intensidad de la corriente debidos

a la presencia de la toxina. Los valores de EC50 obtenidos para los canales Kv1.2 y Kv1.3 fueron 102 ± 7.6 nM y 7.9 ± 1.4 nM, respectivamente [Abdel-Mottaleb *et al.* 2006].

Por otra parte, la toxina Ts16 ha sido ampliamente estudiada frente a canales Kv (Kv1.1-Kv1.6; Kv2.1; Kv3.1; Kv4.2; Kv4.3; Kv7.1; Shaker y hERG). A diferencia de la toxina Tt28, bloquea específicamente al canal Kv1.2, sin causar efecto en los otros canales [Bordon 2011]. Hasta el momento no han sido reportados datos numéricos de la concentración a la cual se ha observado el bloqueo sobre el canal Kv1.2, ni el porcentaje del mismo, sin embargo, dado que ha sido comparada con la Tt28 es probable que el efecto de bloqueo de la Ts16 se presente a una concentración del orden nano molar.

En cambio, para la toxina Tx1 recombinante el efecto de bloqueo se ha observado a una concentración casi 400 veces mayor con respecto a Tt28. Esta diferencia sustancial podría ser atribuída en primera instancia a la presencia de los residuos adicionales de glicina y serina en el extremo N-terminal. Aunque también puede derivarse de las diferencias moleculares entre estas toxinas. Al comparar el potencial electrostático entre las toxinas Tx1 y Ts16, es evidente que ésta última presenta una mayor distribución de cargas positivas en la superficie. De verificarse una mayor actividad en Ts16 con respecto a Tx1, la tesis de la interacción mediada por el anillo de residuos básicos quedaría reforzada.

6.3 ¿Por qué rTx1p2 también actúa como toxina?

La toxina rTx1p2 tiene actividad nula frente a los canales *Shaker*, hKv1.2 y hKv1.3 cuando es evaluada a una concentración de 200 μ M. La comparación de las estructuras tridimensionales de rTx1p1 y rTx1p2 y la identificación de las diferencias podrían proporcionar los primeros indicios para ayudar a responder la pregunta.

Al hacer el alineamiento de la estructura de ambas moléculas con el programa CE [Shindyalov y Bourne 1998] se sobreponen los residuos 1-12 y la región 15-24 de κ -BUTX-Tt-2b con la región 19-28 de rTx1p2.

La hélice I de ambas moléculas, que queda contenida dentro de los residuos 1-12, tiene un RMSD de 0.99 Å para los átomos de la cadena principal y 1.93 Å al considerar a las cadenas laterales (considerando los 20 modelos obtenidos para cada estructura). Es interesante resaltar que los residuos Glu⁵, Tyr⁶ y Gln¹⁰ tienen la misma orientación de las cadenas laterales, como se observa en la figura 6.4 A.

Por otra parte, en la hélice II las diferencias son significativas. Si bien la hélice II de rTx1p2 queda definida dentro de la hélice II de rTx1p1 las posiciones de las cadenas laterales no

guardan similitud alguna, figura 6.4 B. Por ejemplo, la posición de la cadena lateral de la Tyr²¹. Sobre la hélice II de rTx1p1 están los residuos de la díada funcional, mientras que 4 de los 5 residuos del anillo básico se encuentran agrupados en la hélice II y el extremo C-terminal. La deformación de la hélice II y del extremo C-terminal de rTx1p2 es una evidencia de que el sitio responsable del bloqueo de los canales *Shaker* y Kv1.2 está localizado en esta región.

Sin embargo, los experimentos de citotoxicidad indican que esta molécula es capaz de inhibir el 41.5% del crecimiento de los macrófagos murinos de la línea celular J774 a una concentración 50 μ M. Mientras que rTx1p1 lo inhibe al 100% a la misma concentración. Los macrófagos son células en las que las corrientes de K⁺ son generadas mayoritariamente por los canales Kv1.3 y Kv1.5 [Randriamampita y Trautmann 1987], por lo que es posible que el efecto tóxico de rTx1p2 sea ocasionado sobre algunos de estos canales. El hecho de que la hélice I sea el único elemento estructural conservado en ambas moléculas sugiere que debe existir en esta región un sitio de interacción con el receptor que ancla a la toxina, por lo que cuando la estructura de la hélice II está mal plegada el efecto de bloqueo no puede darse de forma efectiva; sin embargo, esta interacción es suficiente para comprometer la viabilidad de las células.

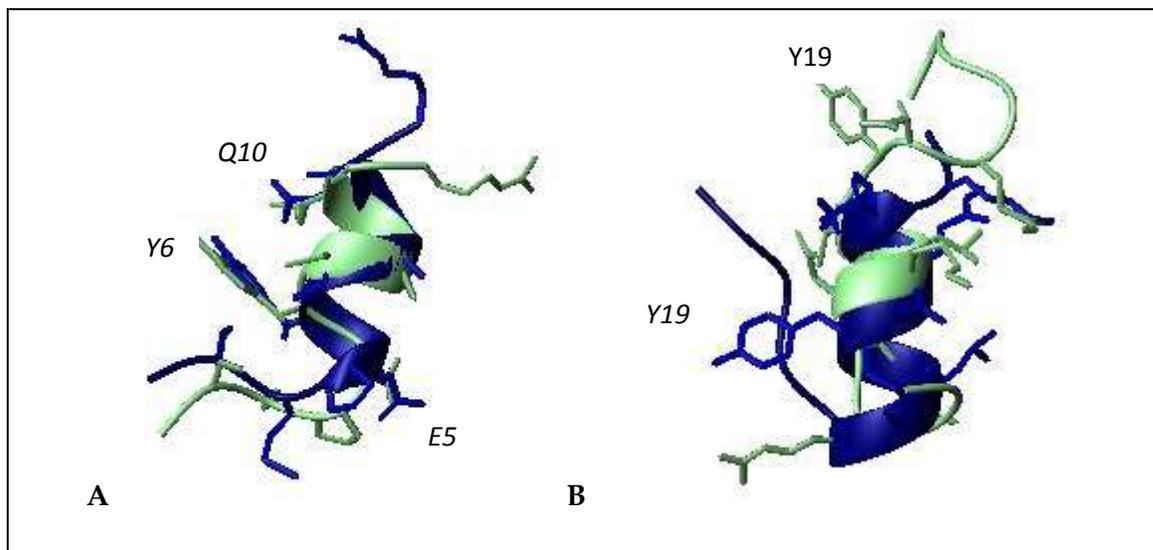


Figura 6.4. Comparación estructural entre rTx1p1 (azul) y rTx1p2 (verde). A. Sobreposición de la hélice I, la región 1-12 tiene un RMSD de 0.99 Å, en donde destaca la orientación idéntica de las cadenas laterales de Glu⁵, Tyr⁶ y Gln¹⁰. B. Sobreposición de la hélice II y el extremo carboxilo, en donde se aprecian diferencias significativas como la posición de la cadena lateral de la Tyr¹⁹, uno de los residuos de la posible díada funcional.

6.4 Clasificación de la toxina Tx1

En la estructura tridimensional de las toxinas Tx1 y Ts16 destaca la versatilidad del plegamiento en péptidos que comparten el mismo patrón de cisteínas, confirmando que la posición en la secuencia de estos residuos no determina el arreglo espacial de la molécula; es decir, que la ubicación secuencial de las cisteínas no está relacionada con el motivo de plegamiento que adopta la toxina. En consecuencia, la clasificación de estas moléculas no puede estar basada en ello. La corroboración experimental de la estructura de la Tt28 y la identificación del patrón de puentes disulfuro será crucial para demostrarlo.

Debido a las características estructurales únicas de la toxina Tx1, resulta evidente que no puede ser aplicado el sistema de clasificación comúnmente empleado para toxinas del veneno de alacrán, que está basado en la posición de las cisteínas [Tytgat *et al.* 1989] ni en la formación de segmentos helicoidales.

Recientemente King *et al.* [2008] propusieron un nuevo sistema de clasificación general de toxinas peptídicas de origen animal, basado en la identificación de la especie de la cual se obtuvo la toxina y en el blanco biológico de la misma, en el que el número de puentes disulfuro o la estructura tridimensional no son considerados, pero que potencialmente tiene ventajas con respecto al sistema vigente de clasificación.

Siguiendo este esquema, dado que Tx1 es una toxina obtenida de la clase *Buthidae* que actúa sobre canales de potasio dependientes de voltaje, se clasifica en la categoría **kappa-BUTX**. La especie que la produce, *Tityus trivittatus*, queda indicada al incluir el identificador **Tt**, por la primera letra del género y la especie. Posteriormente, se deben considerar las toxinas que han sido identificadas con anterioridad para la misma especie y que tienen el mismo blanco molecular. En el caso de *T. trivittatus*, se conocen cuatro toxinas, que ordenadas secuencialmente a partir del año de su descubrimiento se pueden listar como: 1) Butantoxina (alfa-KTx12.1) reportada en año 2000. 2) Tt28 (alfa-KTx20.1) reportada en año 2006. 3) Ttr-beta-KTx y 4) TtrKIK, ambas reportadas en el año 2007. Debido a la similitud de la secuencia entre Tt28 y Tx1, ésta última se considera una molécula paróloga a Tt28 por lo que se adopta el identificador **b** para Tx1 siguiendo la secuencia del abecedario, ya que la *a* le correspondería a la Tt28.

De esta manera el nombre sistemático de la toxina Tx1 es **κ-BUTX-Tt-2b**. Mientras que Tt28 sería κ-BUTX-Tt-2a.

7. CONCLUSIONES

"Aprender sin pensar es inútil. Pensar sin aprender es peligroso."

Confucio

A partir de los datos derivados de Resonancia Magnética Nuclear fue posible determinar la estructura tridimensional en disolución de la toxina Tx1, un péptido de 28 aminoácidos derivado del veneno del alacrán *T. trivittatus* que actúa como bloqueador de canales de potasio dependientes de voltaje.

El arreglo tridimensional de la toxina Tx1 nativa fue establecido a partir de la obtención de la estructura de la toxina recombinante; para ello fue necesario definir las condiciones óptimas para la biosíntesis mediante la expresión heteróloga en *E. coli*, y aplicar los métodos más adecuados para la purificación y la caracterización de esta molécula.

El análisis de la estructura de Tx1 permitió identificar por primera vez el motivo del plegamiento de hélices alfa antiparalelas unidas por tres puentes disulfuro, en toxinas derivadas del veneno de alacrán. La evidencia espectroscópica y las estructuras calculadas a partir de dinámicas de ángulos de torsión revelaron que la conectividad entre cisteínas presenta un patrón C1-C5, C2-C4, C3-C6 que únicamente había sido identificada en una toxina producida en el veneno de anémona. Este plegamiento fue corroborado al determinar la estructura tridimensional de la toxina Ts16 recombinante, una toxina cuya secuencia guarda una identidad del 89% con la Tx1 y que fue identificada como componente del veneno del alacrán *T. serrulatus*.

Las evaluaciones electrofisiológicas realizadas en los canales iónicos *Shaker*, hKv1.2 y hKv1.3, mostraron que a una concentración de 200 μM la toxina Tx1 recombinante provoca la disminución de las corrientes de potasio en porcentajes del 88.7 ± 9.9 , 75 ± 7.1 y 82 ± 5.7 %, respectivamente. Por otra parte, las pruebas de citotoxicidad realizadas en macrófagos murinos, sugieren que en estas células debe existir un receptor específico para esta molécula, que aún no ha sido identificado, cuya función sea abatida a concentraciones por debajo de 50 μM , ya que a esta concentración la toxina Tx1 recombinante fue capaz de inhibir al 100% el crecimiento celular.

Durante la biosíntesis de la proteína Tx1 recombinante fue obtenida como subproducto de la reacción una molécula con la misma secuencia primaria, llamada informalmente rTx1p2. La caracterización estructural de esta molécula demostró que conserva el plegamiento de

hélices alfa antiparalelas estabilizadas por puentes disulfuro pero presenta un arreglo tridimensional distinto y una conectividad entre cisteínas que es sumamente inusual; C1-C6, C2-C5, C3-C4. La evaluación biológica (con actividad nula frente a los canales *Shaker*, hKv1.2 y hKv1.3 a 200 μ M, pero con inhibición del crecimiento celular de macrófagos murinos del $41.5 \pm 9.6\%$ a 50 μ M) y análisis de la estructura de rTx1p2 permitió proponer que la región de Tx1 que está involucrada en el bloqueo del poro del canal se ubica en la región conformada por la segunda hélice alfa y el extremo C-terminal.

Adicionalmente, este estudio demostró que la clasificación de las toxinas de acuerdo con la nomenclatura mundialmente adoptada para toxinas bloqueadoras de canales de potasio, debe corroborarse con la determinación de la estructura tridimensional y la evidencia experimental de la conectividad entre cisteínas. Por lo que si estos estudios no pueden ser realizados de forma paralela, es conveniente adoptar un sistema de clasificación que no esté en función de las variables que se desconocen. En el caso de Tx1 el nombre sistemático que se le asignó fue κ -BUTX-Tt-2b (con códigos 2LI3 y 17876 en el *Protein Data Bank* y en el *Biomolecular Magnetic Resonance Bank*, respectivamente), siguiendo la nomenclatura propuesta por King *et al.*

8. REFERENCIAS

“Uno no es lo que es por lo que escribe, sino por lo que ha leído”

Jorge Luis Borges

- Abdel-Mottaleb Y., Coronas F. V., de Roodt A. R., Possani L. D., Tytgat J. (2006) A novel toxin from the venom of the scorpion *Tityus trivittatus*, is the first member of a new α -KTX subfamily. *FEBS Lett.* **580**: 592-596.
- Anil-Kumar, Ernest R. R., Wüthrich K. (1980) A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton-proton cross-relaxation networks in biological macromolecules. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **95**: 1-6.
- Baneyx F. (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**: 411-421.
- Bartels C., Xia T., Billeter M., Güntert P., Wüthrich K. (1995) The program XEASY for computer-supported NMR spectral analysis of biological macromolecules *J. Biomol. NMR* **6**: 1-10.
- Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Baht T. N., Weissing H., Shindyalov I. N., Bourne P. B. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**: 235-242.
- Berndt K. D., Güntert P., Wüthrich K. (1993) Nuclear magnetic resonance solution structure of dendrotoxin K from the venom of *Dendroaspis polylepis polylepis*. *J. Mol. Biol.* **234**: 735-750.
- Berndt C., Lillig C. H., Holmgren A. (2008) Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. *Biochim. Biophys. Acta.* **1783**: 641-650.
- Blanc E., Sabatier J. M., Kharrat R., Meunier S., el Ayeb M., Van Rietschoten J., Darbon H. (1997) Solution structure of maurotoxin, a scorpion toxin from *Scorpio maurus*, with high affinity for voltage-gated potassium channels. *Proteins* **29**: 321-333.
- Bontems F., Gilquin B., Roumestand C., Ménez A., Toma F. (1992) Analysis of side-chain organization on a refined model of charybdotoxin: structural and functional implications. *Biochemistry* **31**: 7756-7764.
- Bordon K. C. F., Cologna C. T., Tytgat J., Arantes E. C. (2011) Purification and characterization of Ts16, a new specific Kv1.2 blocker, from *Tityus serrulatus* scorpion venom. Program and Abstracts book, 17th Congress of the european section of the International Society on Toxinology, Valencia, Spain, 11-15 September, pp. 240.
- Caldwell J. E., Abildgaard F., Dzakula Z., Ming D., Hellekant G., Markley J. L. (1998) Solution structure of the thermostable sweet-tasting protein brazzein. *Nat. Struct. Biol.* **5**: 427-31.
- Calvete J. J., Sanz L., Angulo Y., Lomonte B., Gutiérrez J. M. (2009) Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS Lett.* **583**: 1736-1743.
- Case D. A., Cheatham T. E. 3rd, Darden T., Gohlke H., Luo R., Merz K. M. Jr., Onufriev A., Simmerling, C., Wang, B., Woods R. J. (2005) The Amber biomolecular simulation programs. *J. Computat. Chem.* **26**, 1668-1688.
- Castañeda O., Sotolongo V., Amor A. M., Stöcklin R., Anderson A. J., Harvey A. L., Engström A., Wernstedt C., Karlsson E. (1995) Characterization of a potassium channel toxin from the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* **33**: 603-613.
- Castle N. A., Haylett D. G., Jenkinson D. H. (1989) Toxins in the characterization of potassium channels. *Trends Neurosci.* **12**: 59-65.

- Catterall WA, Cestèle S, Yarov-Yarovoy V, Yu FH, Konoki K, Scheuer T. (2007) Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon* **49**: 124-141.
- Cavanagh J., Rance M. (1990) Sensitivity improvement in isotropic mixing (TOCSY) experiments. *J. Magn. Res.* **88**: 72-85.
- Cavanagh J., Fairbrother W. J., Palmer III A. G., Skelton N. J., Rance M. (2007) Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice, 2nd. Edition, Academic Press.
- Chagot B., Ciochot S., Pimentel C., Lazdunski M., Darbon H. (2005a) Solution structure of APETx1 from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*: A new fold for an HERG toxin. *Proteins* **59**: 380-386.
- Chagot B., Escoubas P., Diochot S., Bernard C., Lazdunski M., Darbon H. (2005b) Solution structure of APETx2, a specific peptide inhibitor of ASIC3 proton-gated channels. *Protein Sci.* **14**: 2003-2010.
- Chagot B., Pimentel C., Dai L., Pil J., Tytgat J., Nakajima T., Corzo G., Darbon H., Ferrat G. (2005c) An unusual fold for potassium channel blockers: NMR structure of three toxins from the scorpion *Ophisthacanthus madagascariensis*. *Biochem. J.* **388**: 263-271.
- Clark R. J., Fischer H., Dempster L., Daly N. L., Rosengren K. J., Nevin S. T., Meunier F. A., Adams D. J., Craik D. J. (2005) Engineering stable peptide toxins by means of backbone cyclization: stabilization of the alpha-conotoxin MII. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**: 13767-13772.
- Clore G. M., Driscoll P. C., Gronenborn A. M. (1989) Determination of the three-dimensional solution structure of the antihypertensive and antiviral protein BDS-I from the sea anemone *Anemonia sulcata*: a study using nuclear magnetic resonance and hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing. *Biochemistry* **28**: 2188-2198.
- Cologna C. T., Marcussi S., Giglio J. R., Soares A. M., Arantes E. C. (2009) *Tityus serrulatus* scorpion venom and toxins: an overview. *Protein Pept. Lett.* **16**: 920-932.
- Dauplais M., Lecoq A., Song J., Cotton J., Jamin N., Gilquin B., Roumestand C., Vita C., de Medeiros C. L., Rowan E. G., Harvey A. L., Ménez A. (1997) 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.* **272**: 4302-4309.
- De Roodt A. R., García S. I., Salomón O. D., Segre L., Dolab J. A., Funes R. F., de Titto E. H. (2003) Epidemiological and clinical aspects of scorpionism by *Tityus trivittatus* in Argentina. *Toxicon* **41**: 971-977.
- De Roodt A. R., Coronas F. I. V., Lago, N., González M. E., Laskowics R. D., Beltramino J. C., Saavedra S., López R. A., Reati G. J., Vucharchuk M. G., Bazán E., Varni L., Salomón O. D., Possani L. D. (2010) General biochemical and immunological characterization of the venom from the scorpion *Tityus trivittatus* of Argentina. *Toxicon* **55**: 307-319.
- Delaglio F., Grzesiek S., Vuister G. W., Zhu G., Pfeifer J., Bax A. (1995) NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR* **6**: 277-293.
- Diego-García E., Schwartz E. F., D'Suze G., González S. A., Batista C. V., García B. I., de la Vega R. C., Possani L. D. (2007) Wide phylogenetic distribution of Scorpine and long-chain beta-KTx-like peptides in scorpion venoms: identification of "orphan" components. *Peptides* **28**: 31-37.
- Dutertre S., Lewis R. J. (2010) Use of venom peptides to probe ion channels structure and function. *J. Biol. Chem.* **285**: 13315-13320.
- Driscoll P. C., Gronenborn A. M., Beress L., Clore G. M. (1989) Determination of the three-dimensional solution structure of the antihypertensive and antiviral protein BDS-I from the sea

- anemone *Anemonia sulcata*: a study using nuclear magnetic resonance and hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing. *Biochemistry* **28**: 2188-2198.
- Fant F., Vranken W. F., Borremans F. A. (1999) The three-dimensional solution structure of *Aesculus hippocastanum* antimicrobial protein 1 determined by ¹H nuclear magnetic resonance. *Proteins* **37**: 388-403.
- Fadel V., Bettendorff P., Herrmann T., de Azevedo W. F. Jr, Oliveira E. B., Yamane T., Wüthrich K. (2005) Automated NMR structure determination and disulfide bond identification of the myotoxin crotamine from *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon* **46**: 72-76.
- Fajloun Z., Mosbah A., Carlier E., Mansuelle P., Sandoz G., Fathallah M., di Luccio E., Devaux C., Rochat H., Darbon H., De Waard M., Sabatier J. M. (2000) Maurotoxin versus Pi1/HsTx1 scorpion toxins. Toward new insights in the understanding of their distinct disulfide bridge patterns. *J. Biol. Mol.* **275**: 39394-39402.
- Favreau P., Stöcklin R. (2009) Marine snail venoms: use and trends in receptor and channel neuropharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.* **9**: 594-601.
- Ferentz, A. E., Wagner G. (2000) NMR spectroscopy: a multifaceted approach to macromolecular structure. *Q. Rev. Biophys.* **33**: 29-65.
- Foster, KA. (2009) Engineered toxins: new therapeutics. *Toxicon* **54**: 587-592.
- Flores Solis D. (2012) Biosíntesis, purificación, caracterización y determinación estructural por RMN de la toxina de alacrán Ts16. Tesis de Maestría. Instituto de Química, UNAM.
- Frénal K., Xu C. Q., Wolff N., Wecker K., Gurrola G. B., Zhu S. Y., Chi C. W., Possani L. D., Tytgat J., Delepierre M. (2004) Exploring structural features of the interaction between the scorpion toxin CnErg1 and ERG K⁺ channels. *Proteins* **56**: 367-375.
- Garcia M. L., Gao Y., McManus O. B., Kaczorowski G. J. (2001) Potassium channels: from scorpion venoms to high-resolution structure. *Toxicon* **39**: 739-748.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A. (2005) *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*; John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005): 571-607
- Gobom J., Schuerenberg M., Mueller M., Theiss D., Lehrach H., Nordhoff E. (2001) α -cyano-4-hydroxycinnamic acid for affinity sample preparation. A protocol for MALDI-MS peptide analysis in proteomics. *Anal. Chem.* **73**: 434-438.
- Gross A., MacKinnon R. (1996) Agitoxin footprinting the shaker potassium channel pore. *Neuron* **16**: 399-406.
- Güntert P. (2004) Automated NMR structure calculation with CYANA. *Methods Mol. Biol.* **278**: 353-378.
- Harrison P. M., Sternberg M. J. (1996) The disulphide beta-cross: from cystine geometry and clustering to classification of small disulphide rich protein folds. *J. Mol. Biol.* **264**: 603-623.
- Hille B. (2001) *Ion Channels of Excitable Membranes*, Third Edition. University of Washington.
- Holaday S. K. Jr, Martin B. M., Fletcher P. L. Jr, Krishna N. R. (2000) NMR solution structure of butantoxin. *Arch. Biochem. Biophys.* **379**: 18-27.
- Imperial J. S., Bansal P. S., Alewood P. F., Daly N. L., Craik D. J., Sporning A., Terlau H., López-Vera E., Bandyopadhyay P. K., Olivera B. M. (2006) A novel conotoxin inhibitor of Kv1.6 channel and nAChR subtypes defines a new superfamily of conotoxins. *Biochemistry* **45**: 8331-8340.

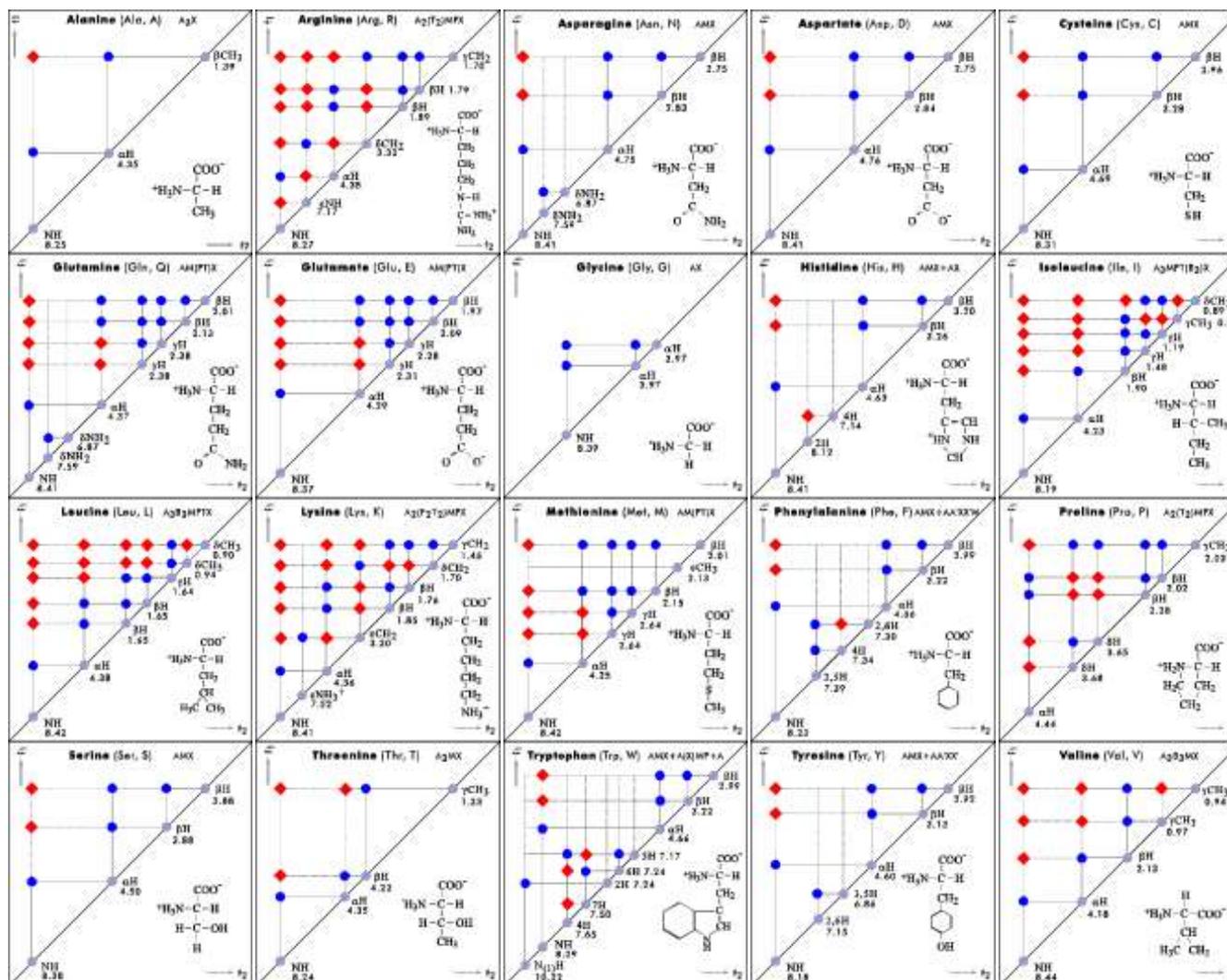
- Jaravine V. A., Nolde D. E., Reibarkh M. J., Korolkova Y. V., Kozlov S. A., Pluzhnikov K. A., Grishin E. V., Arseniev A. S. (1997) Three-dimensional structure of toxin OSK1 from *Orthochirus scrobiculosus* scorpion venom. *Biochemistry* **36**: 1223-1232.
- Jeyaprakash A., Hoy M.A. (2009) First divergence time estimate of spiders, scorpions, mites and ticks (subphylum: *Chelicerata*) inferred from mitochondrial phylogeny. *Exp Appl Acarol.* **47**: 1-18.
- Kastin A. ed. (2006) Handbook of Biologically Active Peptides. Academic Press.
- Keeler J. (2002) Understanding NMR Spectroscopy. John Wiley & Sons Ed. West Sussex, England.
- Keller R. (2004) The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial, Cantina, Goldau, Switzerland. ISBN 3-85600-112-3.
- King G. F., Gentz M. C., Escoubas P., Nicholson G. M. (2008) A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals. *Toxicon* **52**: 264-276.
- Koradi, R. (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graph.* **14**: 29-32.
- Krezel A. M., Kasibhatla C., Hidalgo P., MacKinnon R., Wagner G. (1995) Solution structure of the potassium channel inhibitor agitoxin 2: caliper for probing channel geometry. *Protein Sci.* **4**: 1478-1489.
- Lebrun B., Romi-Lebrun R., Martin-Eauclaire M. F., Yasuda A., Ishiguro M., Oyama Y., Pongs O., Nakajima T. (1997) A four-disulphide-bridged toxin, with high affinity towards voltage-gated K⁺ channels, isolated from *Heterometrus spinnifer* (Scorpionidae) venom. *Biochem. J.* **328**: 321-327.
- Lee H. C. (2003) Hanatoxin and the resting conformation of the voltage-sensor paddle in Kv channels. *Neuron* **40**: 527-536.
- Liu M., Mao X., Ye C., Huang H., Nicholson J. K., Lindon J. C. (1998) Improved WATERGATE pulse sequences for solvent suppression in NMR spectroscopy. *J. Magn. Res.* **132**: 125-129.
- MacKinnon R. (2003) Potassium channels. *FEBS Lett.* **555**: 62-65.
- Milescu M., Vobecky J., Roh S. H., Kim S. H., Jung H. J., Kim J. I., Swartz K. J. (2007) Tarantula toxins interact with voltage sensors within lipid membranes. *J. Gen. Physiol.* **130**: 497-511.
- Miller C., Moczydlowski E., Latorre R., Phillips M. (1985) Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca²⁺-activated K⁺ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature* **313**: 316-318.
- Mittermaier A., Kay L. E. (2006) New tools provide new insights in NMR studies of protein dynamics. *Science* **14**: 224-228.
- Mobli M., King GF. (2010) NMR methods for determining disulfide-bond connectivities. *Toxicon* **56**: 849-854.
- Mondal S., Babu R. M., Bhavna R., Ramakumar S. (2007) In silico detection of binding mode of J-superfamily conotoxin pl14a with Kv1.6 channel. *In Silico Biol.* **7**: 175-186.
- Monks A., Scudiero D., Skehan P., Shoemaker R., Paul K., Vistica D., Hose C., Langley J., Cronise P., Vaigro-Wolff A., Gray-Goodrich M., Campbell H., Mayo J., Boyd M. (1991) Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **38**: 757-766.
- Mouhat S., Jouirou B., Mosbah A., De Waard M., Sabatier J. M. (2004a) Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochem. J.* **378**: 717-726.
- Mouhat S., Mosbah A., Visan V., Wulff H., Delepierre M., Darbon H., Grissmer S., De Waard M., Sabatier J. M. (2004b) The 'functional' dyad of scorpion toxin Pi1 is not itself a prerequisite for toxin binding to the voltage-gated Kv1.2 potassium channels. *Biochem. J.* **377**: 25-36.

- Mouhat S., De Waard M., Sabatier J. M. (2005a) Contribution of the functional dyad of animal toxins acting on voltage-gated Kv1-type channels. *J. Pept. Sci.* **11**: 65-68.
- Mouhat S., Visan V., Ananthakrishnan S., Wulff H., Andreotti N., Grissmer S., Darbon H., De Waard M., Sabatier J. M. (2005b) K⁺ channel types targeted by synthetic OSK1, a toxin from *Orthochirus scrobiculosus* scorpion venom. *Biochem. J.* **385**: 95-104.
- Mouhat S., Andreotti N., Jouirou B., Sabatier J. M. (2008) Animal toxins acting on voltage-gated potassium channels. *Curr. Pharm. Des.* **14**: 2503-2518.
- Novagen Competent cells (2004). User Protocol TB009 Rev. F 0104. EMD Biosciences, Inc.
- Nozaki Y. (1986) Determination of the concentration of protein by dry-weight -- a comparison with spectrophotometric methods. *Arch. Biochem. Biophys.* **249**: 437-446.
- Pardo-López L., García-Valdés J., Gurrola G. B., Robertson G. A., Possani L. D. (2002) Mapping the receptor site for ergotoxin, a specific blocker of ERG channels. *FEBS Lett.* **510**: 45-49.
- Piotto M., Saudek V., Sklenar V. (1992) Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR* **2**: 661-665.
- Qiu S., Yi H., Liu H., Cao Z., Wu Y., Li W. (2009) Molecular Information of charybdotoxin blockade in the large conductance calcium-activated potassium channel. *J. Chem. Inf. Model.* **49**: 1831-1838.
- Randriamampita C., Trautmann A. (1987) Ionic channels in murine macrophages. *J. Cell Biol.* **105**: 761-769.
- Regaya I., Beeton C., Ferrat G., Andreotti N., Darbon H., De Waard M., Sabatier J. M. (2004) Evidence for domain-specific recognition of SK and Kv channels by MTX and HsTx1 scorpion toxins. *J. Biol. Chem.* **279**: 55690-55696.
- Rochat H., Kharrat R., Sabatier J. M., Mansuelle P., Crest M., Martin-Eauclaire M. F., Sampieri F., Oughideni R., Mabrouk K., Jacquet G., Van Rietschoten J., El Ayeb M. (1998) Maurotoxin, a four disulfide bridges scorpion toxin acting on K⁺ channels. *Toxicon* **36**: 1609-1611.
- Rodríguez de la Vega R. C., Merino E., Becerril B., Possani L. D. (2003) Novel interactions between K⁺ channels and scorpion toxins. *Trends. Pharmacol. Sci.* **24**: 222-227.
- Salinas G., Pellizza L., Margenat M., Fló M., Fernández C. (2011) Tuned *Escherichia coli* as a host for the expression of disulfide-rich proteins. *Biotechnol. J.* **6**: 686-699.
- Saucedo Yáñez A. L. (2003) Determinación de parámetros estructurales del fragmento 1-108 de la proteína SV40 mediante experimentos multidimensionales de resonancia magnética nuclear. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- Savarin P., Guennegues M., Gilquin B., Lamthang H., Gasoarini S., Zinn-Justin S., Menez A. (1998) Three-dimensional structure of kappa-conotoxin PVIIA, a novel potassium channel-blocking toxin from cone snails. *Biochemistry* **37**: 5407-5416.
- Savarin P., Romi-Lebrun R., Zinn-Justin S., Lebrun B., Nakajima T., Gilquin B., Menez A. (1999) Structural and functional consequences of the presence of a fourth disulfide bridge in the scorpion short toxins: solution structure of the potassium channel inhibitor HsTX1. *Protein Sci.* **8**: 2672-2685.
- Shindyalov I. N., Bourne P. E. (1998) Protein structure alignment by incremental combinatorial extension (CE) of the optimal path. *Protein Eng.* **11**: 739-747.
- Srinivasan K. N., Sivaraja V., Huys I., Sasaki T., Cheng B., Kumar T. K., Sato K., Tytgat J., Yu C., San B. C., Ranganathan S., Bowie H. J., Kini R. M., Gopalakrishnakone P. (2002) k-Hefutoxin1, a novel toxin from the scorpion *Heterometrus fulvipes* with unique structure and function. Importance of the functional diad in potassium channel selectivity. *J. Biol. Chem.* **277**: 30040-30047.

- Storm J. F. (1987) Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J. Physiol.* **385**: 733-759.
- Takahashi H., Kim J. I., Min H. J., Sato K., Swartz K. J., Shimada I. (2000) Solution structure of hanatoxin1, a gating modifier of voltage-dependent K (+) channels: common surface features of gating modifier toxins. *J. Mol. Biol.* **297**: 771-780.
- Tenenholz T. C., Klenk K. C., Matteson D. R., Blaustein M. P., Weber D. J. (2000) Structural determinants of scorpion toxin affinity: the charybdotoxin (alpha-KTX) family of K(+)-channel blocking peptides. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **140**: 135-185.
- Tudor J. E., Pallaghy P. K., Pennington M. W., Norton R. S. (1996) Solution structure of ShK toxin, a novel potassium channel inhibitor from a sea anemone. *Nat. Struct. Biol.* **3**: 317-320.
- Tytgat J., Chandy K. G., Garcia M. L., Gutman G. A., Martin-Eauclaire M. F., van der Walt J. J., Possani L. D. (1999) A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. *Trends Pharmacol. Sci.* **20**: 444-447.
- Vassilevski A. A., Kozlov S. A., Grishin E. (2009) Molecular diversity of spider venom. *Biochemistry (Mosc)* **74**: 1505-1534. Vera Ramírez M. A. (2002). Determinación de la estructura secundaria del fragmento 1-108 de la proteína SV40 por RMN. Tesis de Maestría, Instituto de Química, UNAM.
- Verdier L., Al-Sabi A., Rivier J. E., Olivera B. M., Terlau H., Carlomagno T. (2005) Identification of a novel pharmacophore for peptide toxins interacting with K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* **280**: 21246-21255.
- Association of Kv1.5 and Kv1.3 Contributes to the Major Voltage-dependent K_v Channel in Macrophages. *J. Biol. Chem.* **281**: 37675-37685.
- Wang J. M., Roh S. H., Kim S., Lee C. W., Kim J. I., Swartz K. J. (2004) Molecular surface of tarantula toxins interacting with voltage sensors in Kv channels. *J. Gen. Physiol.* **123**: 455-467.
- Wishart D. S., Sykes B. D., Richards F. M. (1992) The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of secondary structure through NMR spectroscopy. *Biochemistry* **31**: 1647-1651.
- Wulff H., Castle N. A., Pardo L. A. (2009) Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* **8**: 982-1001.
- Wüthrich K. (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York.
- Wüthrich K. (1990) Protein structure determination in solution by NMR spectroscopy. *J. Biol Chem.* **265**: 22059-22062.
- Wüthrich K. (2003) NMR studies of structure and function of biological macromolecules (Nobel Lecture). *J. Biomol. NMR* **27**: 13-39.
- Xia B., Tsui V., Case D. A., Dyson H. J., Wright P. E. (2002) Comparison of protein solution structures refined by molecular dynamics simulation in vacuum, with a generalized Born model, and with explicit water. *J. Biomol. NMR* **22**: 317-331.
- Xu C. Q., Zhu S. Y., Chi C. W., Tytgat J. (2003) Turret and pore block of K⁺ channels: what is the difference? *Trends Pharmacol. Sci.* **49**: 446-448.
- Ye Y., Godzik A. (2003) Flexible structure alignment by chaining aligned fragment pairs allowing twist. *Bioinformatics* **19**: ii246-ii255.
- Zhu S., Darbon H., Dyason K., Verdonck F., Tytgat J. (2003) Evolutionary origin of inhibitor cystine knot peptides. *FASE B J.* **17**: 1765-1767.

9. ANEXOS

A. 1. Patrones COSY y TOCSY de los 20 aminoácidos más comunes. Tomados de www.bp.uni-bayreuth.de/NMR/nmr_aminotocsy.html.



A.2. Propiedades fisicoquímicas de Tx1 calculadas con la herramienta ProtParam de ExPASy.

10 20 30
GSGCMPEYCA GQCRGKVSQD YCLKNCR CIR

Numero de aminoácidos: 30

Peso molecular: 3329.8

pI teórico: 8.66

Composición de aminoácidos:

Ala	1	3.3%	Leu	1	3.3%
Arg	3	10.0%	Lys	2	6.7%
Asn	1	3.3%	Met	1	3.3%
Asp	1	3.3%	Phe	0	0.0%
Cys	6	20.0%	Pro	1	3.3%
Gln	2	6.7%	Ser	2	6.7%
Glu	1	3.3%	Thr	0	0.0%
Gly	4	13.3%	Trp	0	0.0%
His	0	0.0%	Tyr	2	6.7%
Ile	1	3.3%	Val	1	3.3%

Número total de residuos cargados negativamente (Asp + Glu): 2

Número total de residuos cargados positivamente (Arg + Lys): 5

Composición atómica:

Carbono	C	133	Oxígeno	O	42
Hidrógeno	H	218	Azufre	S	7
Nitrógeno	N	44			

Fórmula: C₁₃₃H₂₁₈N₄₄O₄₂S₇

Número total de átomos: 444

Coefficientes de extinción:

La proteína no contiene residuos Trp, por lo que el coeficiente de extinción calculado puede presentar un error de más del 10%. Las unidades del coeficiente de extinción son M⁻¹ cm⁻¹, medido en agua a 280 nm.

Coef. de extinción 3355

Abs 0.1% (=1 g/l) 1.008, asumiendo que todos los pares de Cys están formando cistinas.

Coef. de extinción 2980

Abs 0.1% (=1 g/l) 0.895, asumiendo que todos los residuos de Cys están reducidos.

Estimación de vida media:

La vida media estimada es: 30 horas (reticulocitos de mamífero, *in vitro*).

>20 hours (levadura, *in vivo*).

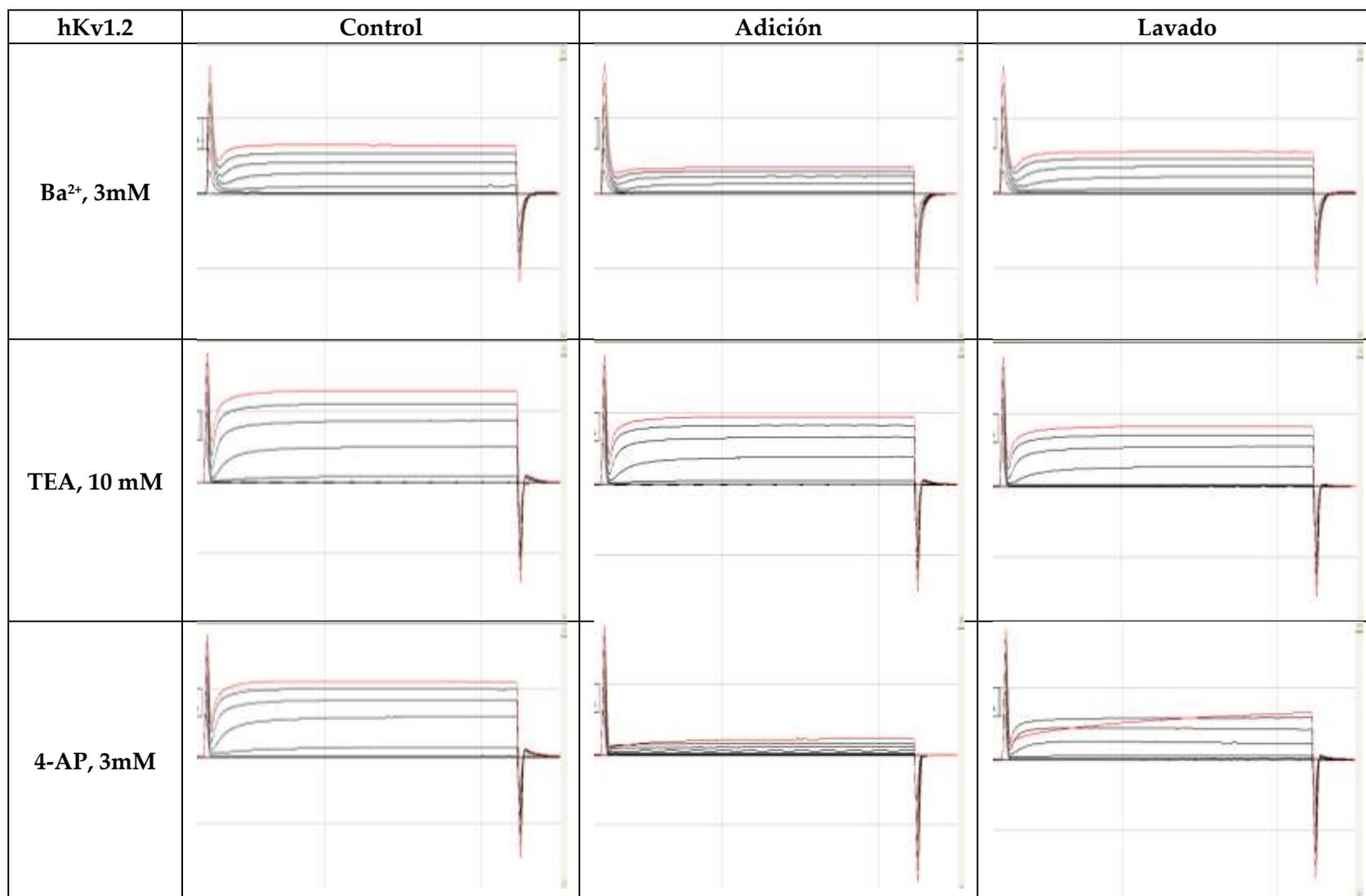
>10 hours (*E. coli*, *in vivo*).

Índice de inestabilidad:

El índice de inestabilidad (II) calculado es 45.44.

Esto clasifica a la proteína como inestable

A.3. Evaluación de la funcionalidad del canal hKv1.2 mediante la adición de compuestos que actúan como bloqueadores del poro.



A.4. Estadísticas generadas por CYANA del cálculo de la estructura de Tx1 Nativa con restricciones de puentes disulfuro C1-C5, C2-C4 y C3-C6.

Programa	:	CYANA 2.1 (intel)							
Tiempo de computadora (Labná)	:	94.93 min							
Ciclo	:	1	2	3	4	5	6	7	
Picos:									
seleccionados	:	653	653	653	653	653	653	653	653
asignados	:	602	620	615	617	621	619	619	
sin asignar	:	51	33	38	36	32	34	35	
con asignación en la diagonal	:	126	126	126	126	126	126	126	
Picos fuera de la diagonal:									
con asignación fuera de la diagonal	:	476	494	489	491	495	493	492	
con asignación única	:	358	423	430	442	450	451	452	
con asig. de corto alcance $ i-j \leq 1$:	432	445	443	442	443	441	440	
con asig. de medio alcance $1 < i-j < 5$:	19	21	21	21	24	24	24	
con asig. de largo alcance $ i-j \geq 5$:	25	28	25	28	28	28	28	
Comparación con la asignación de referencia:									
Picos fuera de la diagonal	:	487	487	487	487	487	487	487	
con asignación idéntica	:	351	403	410	421	426	427	427	
con asignación compatible	:	457	472	467	467	469	468	466	
con asignación incompatible	:	0	3	4	4	6	5	6	
con asignación adicional a la ref.	:	30	12	16	16	12	14	15	
con asignación adicional	:	19	19	18	20	20	20	20	
Límite de distancias máximas:									
total	:	223	223	219	214	213	212	218	232
corto alcance, $ i-j \leq 1$:	185	188	186	178	175	174	174	185
medio alcance, $1 < i-j < 5$:	26	23	15	15	17	17	19	21
largo alcance, $ i-j \geq 5$:	12	12	18	21	21	21	25	26
Asignaciones promedio/restricción	:	1.63	1.32	1.13	1.10	1.09	1.09	1.00	1.00
Valor promedio de la función objetivo	:	2.72	5.12	4.88	1.27	0.30	0.19	0.05	0.01
RMSD (residuos 3..30):									
RMSD promedio de la cadena principal	:	3.43	2.60	1.81	1.65	1.44	1.53	1.16	1.24
RMSD promedio de la cadena principal y cadenas laterales	:	4.42	3.47	2.76	2.57	2.29	2.28	1.84	1.94

A.5. Estadísticas generadas por CYANA del cálculo de la estructura de rTx1p1 sin restricciones de puentes disulfuro.

Programa	:	CYANA 2.1 (intel)							
Tiempo de computadora (Sacbé)	:	53.72 min							
Ciclo	:	1	2	3	4	5	6	7	
Picos:									
seleccionados	:	820	820	820	820	820	820	820	
asignados	:	752	767	762	765	767	766	764	
sin asignar	:	68	53	58	55	53	54	56	
con asignación en la diagonal	:	122	122	122	122	122	122	122	
Picos fuera de la diagonal:									
con asignación fuera de la diagonal	:	630	645	640	643	645	644	642	
con asignación única	:	337	518	541	570	581	589	589	
con asig. de corto alcance $ i-j \leq 1$:	484	488	487	484	482	482	480	
con asig. de medio alcance $1 < i-j < 5$:	68	70	65	69	71	71	70	
con asig. de largo alcance $ i-j \geq 5$:	78	87	88	90	92	91	92	
Comparación con la asignación de referencia:									
Picos fuera de la diagonal	:	586	586	586	586	586	586	586	
con asignación idéntica	:	319	458	473	490	493	499	498	
con asignación compatible	:	564	560	555	551	547	542	540	
con asignación incompatible	:	0	5	7	13	16	20	20	
con asignación adicional a la ref.	:	23	22	25	23	24	25	27	
con asignación adicional	:	66	80	78	79	82	82	82	
Límite de distancias máximas:									
total	:	370	358	352	353	353	354	368	368
corto alcance, $ i-j \leq 1$:	248	229	227	223	218	220	217	217
medio alcance, $1 < i-j < 5$:	91	97	57	61	64	63	70	69
largo alcance, $ i-j \geq 5$:	31	32	68	69	71	71	81	82
Asignaciones promedio/restricción	:	2.48	1.67	1.17	1.13	1.10	1.09	1.00	1.00
Valor promedio de la función objetivo	:	2.52	2.58	3.56	0.64	0.04	0.02	0.02	0.01
RMSD (residuos 3..30):									
RMSD promedio de la cadena principal	:	1.92	2.05	0.76	0.64	0.61	0.59	0.56	0.42
RMSD promedio de la cadena principal y cadenas laterales	:	2.54	2.59	1.40	1.38	1.32	1.20	1.11	1.08

A.6. Estadísticas generadas por CYANA del cálculo de la estructura de rTx1p1 con restricciones de puentes disulfuro C1-C4, C2-C5 y C3-C6.

Programa	:	CYANA 2.1 (intel)							
Tiempo de computadora (Sacbé)	:	77.12 min							
Ciclo	:	1	2	3	4	5	6	7	
Picos:									
seleccionados	:	803	803	803	803	803	803	803	
asignados	:	725	747	726	731	730	728	727	
sin asignar	:	78	56	77	72	73	75	76	
con asignación en la diagonal	:	122	122	122	122	122	122	122	
Picos fuera de la diagonal:									
con asignación fuera de la diagonal	:	603	625	604	609	608	606	605	
con asignación única	:	331	517	526	546	557	560	562	
con asig. de corto alcance $ i-j \leq 1$:	477	482	480	477	474	475	472	
con asig. de medio alcance $1 < i-j < 5$:	59	61	56	56	56	55	55	
con asig. de largo alcance $ i-j \geq 5$:	67	82	68	76	78	76	78	
Comparación con la asignación de referencia:									
Picos fuera de la diagonal	:	549	549	549	549	549	549	549	
con asignación idéntica	:	309	445	455	467	477	478	478	
con asignación compatible	:	528	534	519	519	520	516	513	
con asignación incompatible	:	0	2	6	10	9	11	13	
con asignación adicional a la ref.	:	22	14	25	21	21	23	24	
con asignación adicional	:	75	89	79	80	79	79	79	
Límite de distancias máximas:									
total	:	347	339	327	328	329	329	340	342
corto alcance, $ i-j \leq 1$:	242	222	222	218	217	219	218	221
medio alcance, $1 < i-j < 5$:	80	84	49	50	50	50	55	55
largo alcance, $ i-j \geq 5$:	25	33	56	60	62	60	67	66
Asignaciones promedio/restricción	:	2.42	1.61	1.13	1.11	1.09	1.09	1.00	1.00
Valor promedio de la función objetivo	:	6.24	3.64	4.91	0.57	0.32	0.10	0.14	0.08
RMSD (residuos 3..30):									
RMSD promedio de la cadena principal	:	1.91	0.90	0.69	0.52	0.53	0.53	0.46	0.52
RMSD promedio de la cadena principal y cadenas laterales	:	2.64	1.57	1.34	1.22	1.32	1.28	1.12	1.19

A.7. Estadísticas generadas por CYANA del cálculo de la estructura de rTx1p1 con restricciones de puentes disulfuro C1-C5, C2-C4, C3-C6.

Programa	:	CYANA 2.1 (intel)							
Tiempo de computadora (Sacbé)	:	76.57 min							
Ciclo	:	1	2	3	4	5	6	7	
Picos:									
seleccionados	:	803	803	803	803	803	803	803	
asignados	:	725	754	753	752	752	752	753	
sin asignar	:	78	49	50	51	51	51	50	
con asignación en la diagonal	:	122	122	122	122	122	122	122	
Picos fuera de la diagonal									
con asignación fuera de la diagonal	:	603	632	631	630	630	630	631	
con asignación única	:	331	529	554	558	577	589	588	
con asig. de corto alcance $ i-j \leq 1$:	477	482	481	479	477	474	475	
con asig. de medio alcance $1 < i-j < 5$:	59	63	59	63	65	65	66	
con asig. de largo alcance $ i-j \geq 5$:	67	87	91	88	88	91	90	
Comparación con la asignación de referencia:									
Picos fuera de la diagonal	:	549	549	549	549	549	549	549	
con asignación idéntica	:	309	449	466	470	482	486	487	
con asignación compatible	:	528	533	531	528	525	518	520	
con asignación incompatible	:	0	5	7	9	11	18	17	
con asignación adicional a la ref.	:	22	12	12	13	14	14	13	
con asignación adicional	:	75	94	93	93	94	94	94	
Restricciones de distancia máxima:									
total	:	347	350	346	347	345	344	362	365
corto alcance, $ i-j \leq 1$:	242	225	222	222	219	216	219	223
medio alcance, $1 < i-j < 5$:	80	88	53	57	58	58	65	64
largo alcance, $ i-j \geq 5$:	25	37	71	68	68	70	78	78
Asignaciones promedio/restricción	:	2.42	1.61	1.13	1.13	1.10	1.07	1.00	1.00
Valor promedio de la función objetivo	:	2.37	1.91	3.16	0.16	0.03	0.03	0.01	0.01
RMSD (residuos 3..30):									
RMSD promedio de la cadena principal	:	1.07	0.75	0.64	0.50	0.47	0.45	0.33	0.39
RMSD promedio de la cadena principal y cadenas laterales	:	1.83	1.47	1.32	1.31	1.31	1.21	0.99	1.01

A. 8. Estadísticas generadas por CYANA del cálculo de la estructura de rTx1p2 sin restricciones de puentes disulfuro.

Programa	:	CYANA 2.1 (intel)							
Tiempo de computadora (Sacbé)	:	56.68 min							
Ciclo	:	1	2	3	4	5	6	7	
Picos:									
seleccionados	:	820	820	820	820	820	820	820	
asignados	:	788	809	805	806	806	807	805	
sin asignar	:	32	11	15	14	14	13	15	
con asignación en la diagonal	:	15	15	15	15	15	15	15	
Picos fuera de la diagonal:									
con asignación fuera de la diagonal	:	773	794	790	791	791	792	790	
con asignación única	:	492	701	746	753	762	767	769	
con asig. de corto alcance $ i-j \leq 1$:	611	610	604	602	600	600	598	
con asig. de medio alcance $1 < i-j < 5$:	81	90	85	89	90	89	89	
con asig. de largo alcance $ i-j \geq 5$:	81	94	101	100	101	103	103	
Comparación con la asignación de referencia:									
Picos fuera de la diagonal	:	708	708	708	708	708	708	708	
con asignación idéntica	:	445	615	645	646	653	656	658	
con asignación compatible	:	684	690	682	679	678	678	677	
con asignación incompatible	:	2	11	16	20	21	22	22	
con asignación adicional a la ref.	:	21	6	9	8	8	7	8	
con asignación adicional	:	87	93	92	92	92	92	91	
Límite de distancias máximas:									
total	:	407	407	404	402	401	404	413	437
corto alcance, $ i-j \leq 1$:	271	254	248	242	241	242	243	270
medio alcance, $1 < i-j < 5$:	107	117	76	80	81	81	85	87
largo alcance, $ i-j \geq 5$:	29	36	80	80	79	81	85	80
Asignaciones promedio/restricción	:	2.16	1.53	1.07	1.04	1.03	1.03	1.00	1.00
Valor promedio de la función objetivo	:	1.32	1.50	2.84	0.26	0.16	0.16	0.16	0.16
RMSD (residuos 3..30):									
RMSD promedio de la cadena principal	:	1.15	1.11	0.40	0.34	0.35	0.36	0.26	0.37
RMSD promedio de la cadena principal y cadenas laterales	:	1.67	1.51	0.86	0.84	0.83	0.89	0.82	0.87

A. 9. Estadísticas generadas por CYANA del cálculo de la estructura de rTx1p2 considerando los puentes disulfuro C1-C4, C2-C5 y C3-C6.

Programa	:	CYANA 2.1 (intel)							
Tiempo de computadora (Saché)	:	52.35 min							
Ciclo	:	1	2	3	4	5	6	7	
Picos:									
seleccionados	:	894	894	894	894	894	894	894	894
asignados	:	845	847	837	839	837	836	834	
sin asignar	:	49	47	57	55	57	58	60	
con asignación en la diagonal	:	132	132	132	132	132	132	132	
Picos fuera de la diagonal:									
con asignación fuera de la diagonal	:	713	715	705	707	705	704	702	
con asignación única	:	314	564	589	601	621	629	628	
con asig. de corto alcance $ i-j \leq 1$:	620	621	613	612	611	611	608	
con asig. de medio alcance $1 < i-j < 5$:	80	76	73	75	71	72	71	
con asig. de largo alcance $ i-j \geq 5$:	13	18	19	20	23	21	23	
Comparación con la asignación de referencia:									
Picos fuera de la diagonal	:	692	692	692	692	692	692	692	
con asignación idéntica	:	297	506	528	536	552	560	556	
con asignación compatible	:	663	646	632	630	628	626	622	
con asignación incompatible	:	2	21	25	29	30	31	33	
con asignación adicional a la ref.	:	27	25	35	33	34	35	37	
con asignación adicional	:	48	48	48	48	47	47	47	
Límite de distancias máximas:									
total	:	331	305	300	299	296	293	296	306
corto alcance, $ i-j \leq 1$:	254	228	225	224	221	218	209	216
medio alcance, $1 < i-j < 5$:	76	77	61	61	59	60	69	70
largo alcance, $ i-j \geq 5$:	1	0	14	14	16	15	18	20
Asignaciones promedio/restricción	:	2.62	1.58	1.17	1.17	1.11	1.10	1.00	1.00
Valor promedio de la función objetivo	:	4.37	2.78	4.48	0.90	0.55	0.45	0.39	0.25
RMSD (residuos 3..30):									
RMSD promedio de la cadena principal	:	2.70	1.92	0.80	0.91	1.12	0.96	0.95	0.75
RMSD promedio de la cadena principal y cadenas laterales	:	3.57	2.79	1.50	1.70	1.95	1.77	1.74	1.53

A.10. Estadísticas generadas por CYANA del cálculo de la estructura de rTx1p2 considerando los puentes disulfuro C1-C6, C2-C5 y C3-C4.

Programa	:	CYANA 2.1 (intel)							
Tiempo de computadora (Sacbé)	:	51.23 min							
Ciclo	:	1	2	3	4	5	6	7	
Picos:									
seleccionados	:	894	894	894	894	894	894	894	
asignados	:	845	853	841	842	841	842	841	
sin asignar	:	49	41	53	52	53	52	53	
con asignación en la diagonal	:	132	132	132	132	132	132	132	
Picos fuera de la diagonal:									
con asignación fuera de la diagonal	:	713	721	709	710	709	710	709	
con asignación única	:	313	568	595	609	623	633	633	
con asig. de corto alcance $ i-j \leq 1$:	620	621	614	614	613	612	613	
con asig. de medio alcance $1 < i-j < 5$:	80	82	74	76	76	76	75	
con asig. de largo alcance $ i-j \geq 5$:	13	18	21	20	20	22	21	
Comparación con la asignación de referencia:									
Picos fuera de la diagonal	:	692	692	692	692	692	692	692	
con asignación idéntica	:	296	505	523	536	544	549	551	
con asignación compatible	:	663	644	628	626	621	618	619	
con asignación incompatible	:	2	26	31	34	38	42	40	
con asignación adicional a la ref.	:	27	22	33	32	33	32	33	
con asignación adicional	:	48	51	50	50	50	50	50	
Límite de distancias máximas:									
total	:	331	311	299	297	296	297	300	308
corto alcance, $ i-j \leq 1$:	254	229	225	222	221	219	215	223
medio alcance, $1 < i-j < 5$:	76	80	60	62	62	63	67	67
largo alcance, $ i-j \geq 5$:	1	2	14	13	13	15	18	18
Asignaciones promedio/restricción	:	2.63	1.56	1.17	1.16	1.12	1.11	1.00	1.00
Valor promedio de la función objetivo	:	3.67	3.72	3.55	0.61	0.25	0.25	0.21	0.04
RMSD (residuos 3..30):									
RMSD promedio de la cadena principal	:	2.39	1.58	1.23	0.97	0.88	0.96	0.94	0.63
RMSD promedio de la cadena principal y cadenas laterales	:	3.31	2.45	1.84	1.73	1.53	1.65	1.68	1.24

A. 11. Estadísticas generadas por CYANA del cálculo de la estructura derTx1p2 considerando la formación del puente disulfuro C2-C5.

Programa	:	CYANA 2.1 (intel)							
Tiempo de computadora (Sacbé)	:	51.77 min							
Ciclo	:	1	2	3	4	5	6	7	
Picos:									
seleccionados	:	894	894	894	894	894	894	894	
asignados	:	846	849	839	841	838	838	834	
sin asignar	:	48	45	55	53	56	56	60	
con asignación en la diagonal	:	132	132	132	132	132	132	132	
Picos fuera de la diagonal:									
con asignación fuera de la diagonal	:	714	717	707	709	706	706	702	
con asignación única	:	312	564	589	599	609	625	627	
con asig. de corto alcance $ i-j \leq 1$:	620	620	613	613	613	613	612	
con asig. de medio alcance $1 < i-j < 5$:	81	81	77	79	74	73	70	
con asig. de largo alcance $ i-j \geq 5$:	13	16	17	17	19	20	20	
Comparación con la asignación de referencia:									
Picos fuera de la diagonal	:	692	692	692	692	692	692	692	
con asignación idéntica	:	296	505	525	534	543	553	557	
con asignación compatible	:	664	641	631	629	625	620	621	
con asignación incompatible	:	2	28	30	34	36	41	38	
con asignación adicional a la ref.	:	26	23	31	29	31	31	33	
con asignación adicional	:	48	48	46	46	45	45	43	
Límite de distancias máximas:									
total	:	334	305	301	299	295	293	300	317
corto alcance, $ i-j \leq 1$:	256	227	226	224	222	219	214	231
medio alcance, $1 < i-j < 5$:	77	78	64	64	61	61	67	67
largo alcance, $ i-j \geq 5$:	1	0	11	11	12	13	19	19
Asignaciones promedio/restricción	:	2.65	1.57	1.17	1.17	1.15	1.11	1.00	1.00
Valor promedio de la función objetivo	:	3.09	3.80	4.20	1.38	0.68	0.52	0.34	0.14
RMSD (residuos 3..30):									
RMSD promedio de la cadena principal	:	3.04	2.81	1.78	2.13	1.70	1.88	1.22	1.37
RMSD promedio de la cadena principal y cadenas laterales	:	4.01	3.81	2.60	3.07	2.47	2.73	1.93	2.18

A. 12. Estadísticas generadas por CYANA del cálculo de la estructura de Tsl6 sin restricciones de puentes disulfuro.

Programa	:	CYANA 2.1 (intel)							
Tiempo de computadora (Sacbé)	:	56.68 min							
Ciclo	:	1	2	3	4	5	6	7	
Picos:									
seleccionados	:	820	820	820	820	820	820	820	
asignados	:	788	809	805	806	806	807	805	
sin asignar	:	32	11	15	14	14	13	15	
con asignación en la diagonal	:	15	15	15	15	15	15	15	
Picos fuera de la diagonal:									
con asignación fuera de la diagonal	:	773	794	790	791	791	792	790	
con asignación única	:	492	701	746	753	762	767	769	
con asig. de corto alcance $ i-j \leq 1$:	611	610	604	602	600	600	598	
con asig. de medio alcance $1 < i-j < 5$:	81	90	85	89	90	89	89	
con asig. de largo alcance $ i-j \geq 5$:	81	94	101	100	101	103	103	
Comparación con la asignación de referencia:									
Picos fuera de la diagonal	:	708	708	708	708	708	708	708	
con asignación idéntica	:	445	615	645	646	653	656	658	
con asignación compatible	:	684	690	682	679	678	678	677	
con asignación incompatible	:	2	11	16	20	21	22	22	
con asignación adicional a la ref.	:	21	6	9	8	8	7	8	
con asignación adicional	:	87	93	92	92	92	92	91	
Límite de distancias máximas:									
total	:	407	407	404	402	401	404	413	437
corto alcance, $ i-j \leq 1$:	271	254	248	242	241	242	243	270
medio alcance, $1 < i-j < 5$:	107	117	76	80	81	81	85	87
largo alcance, $ i-j \geq 5$:	29	36	80	80	79	81	85	80
Asignaciones promedio/restricción	:	2.16	1.53	1.07	1.04	1.03	1.03	1.00	1.00
Valor promedio de la función objetivo	:	1.32	1.50	2.84	0.26	0.16	0.16	0.16	0.16
RMSD (residuos 3..30):									
RMSD promedio de la cadena principal	:	1.15	1.11	0.40	0.34	0.35	0.36	0.26	0.37
RMSD promedio de la cadena principal y cadenas laterales	:	1.67	1.51	0.86	0.84	0.83	0.89	0.82	0.87

A.13 Estadísticas generadas por CYANA del cálculo de la estructura de Ts16 con restricciones de puentes disulfuro C1-C4, C2-C5, C3-C6.

Programa	:	CYANA 2.1 (intel)							
Tiempo de computadora (Sacbé)	:	55.42 min							
Ciclo	:	1	2	3	4	5	6	7	
Picos:									
seleccionados	:	820	820	820	820	820	820	820	
asignados	:	787	810	801	799	799	799	798	
sin asignar	:	33	10	19	21	21	21	22	
con asignación en la diagonal	:	15	15	15	15	15	15	15	
Cross peaks:									
Picos fuera de la diagonal:									
con asignación fuera de la diagonal	:	772	795	786	784	784	784	783	
con asignación única	:	496	714	744	749	763	764	763	
con asig. de corto alcance $ i-j \leq 1$:	610	608	602	599	597	597	597	
con asig. de medio alcance $1 < i-j < 5$:	81	91	82	81	80	79	78	
con asig. de largo alcance $ i-j \geq 5$:	81	96	102	104	107	108	108	
Comparación con la asignación de referencia:									
Picos fuera de la diagonal	:	708	708	708	708	708	708	708	
con asignación idéntica	:	448	626	637	641	649	650	651	
con asignación compatible	:	683	694	673	670	666	668	668	
con asignación incompatible	:	2	9	21	22	26	24	23	
con asignación adicional a la ref.	:	22	4	13	15	15	15	16	
con asignación adicional	:	87	92	92	92	92	92	92	
Límite de distancias máximas:									
total	:	407	409	399	398	395	394	403	419
corto alcance, $ i-j \leq 1$:	270	253	247	245	242	241	240	258
medio alcance, $1 < i-j < 5$:	106	120	72	71	71	70	77	74
largo alcance, $ i-j \geq 5$:	31	36	80	82	82	83	86	87
Asignaciones promedio/restricción	:	2.15	1.55	1.06	1.05	1.03	1.02	1.00	1.00
Valor promedio de la función objetivo	:	3.92	4.05	6.34	1.05	0.72	0.57	0.41	0.38
RMSD (residuos 3..30):									
RMSD promedio de la cadena principal	:	1.27	0.61	0.21	0.31	0.33	0.26	0.21	0.25
RMSD promedio de la cadena principal y cadenas laterales	:	1.85	1.12	0.86	0.84	0.85	0.83	0.80	0.83

A. 14. Estadísticas generadas por CYANA del cálculo de la estructura de Ts16 con restricciones de puentes disulfuro C1-C5, C2-C4 y C3-C6.

Programa	:	CYANA 2.1 (intel)							
Tiempo de computadora (Sacbé)	:	55.75 min							
Ciclo	:	1	2	3	4	5	6	7	
Picos:									
seleccionados	:	820	820	820	820	820	820	820	
asignados	:	787	812	808	810	807	809	809	
sin asignar	:	33	8	12	10	13	11	11	
con asignación en la diagonal	:	15	15	15	15	15	15	15	
Picos fuera de la diagonal:									
con asignación fuera de la diagonal	:	772	797	793	795	792	794	794	
con asignación única	:	496	706	747	747	762	766	768	
con asig. de corto alcance $ i-j \leq 1$:	610	607	602	602	595	596	594	
con asig. de medio alcance $1 < i-j < 5$:	81	90	90	90	91	92	92	
con asig. de largo alcance $ i-j \geq 5$:	81	100	101	103	106	106	108	
Comparación con la asignación de referencia:									
Picos fuera de la diagonal	:	708	708	708	708	708	708	708	
con asignación idéntica	:	448	620	649	647	659	664	664	
con asignación compatible	:	683	696	687	689	686	688	685	
con asignación incompatible	:	2	8	14	14	15	14	17	
con asignación adicional a la ref.	:	22	3	6	4	6	5	5	
con asignación adicional	:	87	93	92	92	91	92	92	
Límite de distancias máximas:									
total	:	407	409	406	404	404	405	412	421
corto alcance, $ i-j \leq 1$:	270	252	246	244	239	240	237	251
medio alcance, $1 < i-j < 5$:	106	121	80	80	82	83	86	85
largo alcance, $ i-j \geq 5$:	31	36	80	80	83	82	89	85
Asignaciones promedio/restricción	:	2.15	1.54	1.07	1.06	1.04	1.03	1.00	1.00
Valor promedio de la función objetivo	:	1.15	2.57	4.10	0.36	0.21	0.20	0.19	0.17
RMSD (residuos 3..30):									
RMSD promedio de la cadena principal	:	0.84	0.74	0.36	0.37	0.38	0.36	0.31	0.35
RMSD promedio de la cadena principal y cadenas laterales	:	1.45	1.28	1.05	1.03	1.07	1.03	1.03	1.00

10. PUBLICACIONES

Los resultados del trabajo de investigación desarrollado fueron publicados en:

- i. Saucedo *et al.* (2012) New tricks of an old pattern. Structural versatility of scorpion toxins with common cysteine spacing. *J. Biol. Chem.* **287**: 12321-12330.
- ii. Saucedo, del Río *et al.* (2012) Solution structure of native and recombinant expressed toxin CssII from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*, and their effects on Nav1.5 Sodium channels. *Biochim. Biophys. Acta* **1824**: 478-487.

Adicionalmente, el reporte de la estructura y actividad biológica de la *pseudo* toxina rTx1p2 se encuentra en preparación, por lo que en breve será enviado a una revista de circulación internacional.

New Tricks of an Old Pattern

STRUCTURAL VERSATILITY OF SCORPION TOXINS WITH COMMON CYSTEINE SPACING[□]

Received for publication, December 1, 2011, and in revised form, December 21, 2011. Published, JBC Papers in Press, January 10, 2012. DOI: 10.1074/jbc.M111.329607

Alma Leticia Saucedo^{1,2}, David Flores-Solis³, Ricardo C. Rodríguez de la Vega^{5,6}, Belén Ramírez-Cordero¹, Rogelio Hernández-López^{1,4}, Patricia Cano-Sánchez², Roxana Noriega Navarro¹, Jesús García-Valdés¹, Fredy Coronas-Valderrama^{7,8}, Adolfo de Roodt^{9,10}, Luis G. Brieba^{5,6}, Lourival Domingos Possani^{7,8}, and Federico del Río-Portilla^{1,5}

From the ¹Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, D.F., 04510, México, the ²UMR 7138, Département Systematique et Evolution, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris 75005, France, the ³Department of Chemistry and Chemical Biology, Harvard University, Cambridge, Massachusetts 02138, the ⁴Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, D.F., 04510, México, the ⁵Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca México, the ⁶Centro de Patología Experimental y Aplicada, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires and Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos G. Malbrán," Ministerio de Salud, Av. Velez Sarsfield 563, CP 1281, CABA, Buenos Aires, Argentina, and the ⁷Laboratorio de Genómica para la Biodiversidad, CINVESTAV Unidad Irapuato, 36821 Irapuato, Guanajuato, México

Background: Most scorpion venom peptides adopt a single structural scaffold around four strictly conserved cysteines.

Results: Two K⁺ channel-blocking peptides from *Tityus* venoms share this cysteine spacing but fold into a distinct cysteine-stabilized helix-loop-helix scaffold.

Conclusion: These peptides define a new structural group of scorpion venom peptides.

Significance: Cysteine spacing does not dictate the three-dimensional fold of small disulfide-rich proteins.

Scorpion venoms are a rich source of K⁺ channel-blocking peptides. For the most part, they are structurally related small disulfide-rich proteins containing a conserved pattern of six cysteines that is assumed to dictate their common three-dimensional folding. In the conventional pattern, two disulfide bridges connect an α -helical segment to the C-terminal strand of a double- or triple-stranded β -sheet, conforming a cysteine-stabilized α/β scaffold (CS α/β). Here we show that two K⁺ channel-blocking peptides from *Tityus* scorpions conserve the cysteine spacing of common scorpion venom peptides but display an unconventional disulfide pattern, accompanied by a complete rearrangement of the secondary structure topology into a CS helix-loop-helix fold. Sequence and structural comparisons of the peptides adopting this novel fold suggest that it would be a new elaboration of the widespread CS α/β scaffold, thus reveal-

ing an unexpected structural versatility of these small disulfide-rich proteins. Acknowledgment of such versatility is important to understand how venom structural complexity emerged on a limited number of molecular scaffolds.

Scorpion venoms are complex mixtures of biomolecules, products of millions years of evolution (1, 2). Venoms contain, among others components, peptide toxins capable of interacting specifically with potassium, sodium, and calcium channels (3–5). These toxic peptides have contributed considerably to the understanding of the structure and functional mechanism of the ion channels (6). Some of them are considered good candidates for the design and development of new drugs (7), although the number of structural and functional analyses of these peptides is still limited (8).

Potassium channels blocker toxins (KTx)⁶ can be classified into four subfamilies accordingly to the accepted nomenclature: α , β , γ , and κ (9, 10). α -KTx are peptides of 23–43 amino acids stabilized by three to four disulfide bonds, two of which are strictly conserved and link an α -helix and one strand of a β -sheet within the so-called cysteine-stabilized α/β scaffold (CS α/β), the most common among scorpion toxins (10, 11). β -KTx toxins, known as "long chain," are three disulfide-bridged peptides with ~60 amino acids that also contain the cysteine pattern of peptides adopting the CS α/β scaffold, although no structure is available yet (12). γ -KTxs are blockers of the *ether-à-go-go*-related gene family of K⁺ channels; they are 36–47 amino acids long with three or four disulfide bridges,

^{*} This work was supported in part by Dirección General de Servicios de Cómputo Académico y Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México Projects IN205110 (to F. R. P.) and IN204110 (to L. D. P.) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Project 59297 (to F. R. P.).

[□] This article contains supplemental Figs. S1–S4.

The atomic coordinates and structure factors (codes 2UJ3 and 2UKA) have been deposited in the Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, New Brunswick, NJ (<http://www.rcsb.org/>).

¹ Recipients of scholarship support from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

² Supported by the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

³ Invited researcher at the Muséum National d'Histoire Naturelle sponsored by the Marie de Paris.

⁴ Supported by the Fundación México en Harvard.

⁵ To whom correspondence should be addressed: Dept. de Química de Macromoléculas, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, México, D.F. 04510, México. Tel.: 52-55-5622-4613; Fax: 52-55-5616-2203; E-mail: jfrp@unam.mx.

⁶ The abbreviations used are: KTx, K⁺ channel toxin; H α , hydrogen in α position; H β , hydrogen in β position; HN, amide proton; RMSD, root mean square deviation; CS, cysteine-stabilized.

New Fold for Scorpion Venom Peptides

which also adopt the CS α / β scaffold (13). The last and smallest family, the κ -KTxs, displays purely helical structure stabilized by two disulfide bridges and fold into an α -hairpin fold known as CS α / α (cystine-stabilized helix-loop-helix) (11, 14–17). Peptides belonging to this family have been isolated from only two scorpion genera: *Heterometrus* (14, 15) and *Opisthacanthus* (16, 17). κ -KTxs are relatively poor blockers of K⁺ channels, despite presence of the typical functional dyad, Tyr and Lys, important for other activity of the toxin (3). It is still neither clear whether members of the κ -KTx family might all work through the same mechanism on potassium channels (16, 17), nor whether K⁺ channels are indeed their cognate receptors. In part this may be due to the lack of structural and functional characterization of peptides in this family.

This work describes the native isolation, recombinant production and structural characterization of a newly identified 28 amino acid K⁺ channel-blocking peptide from *Tityus trivittatus* venom, named κ -buthitoxin-Tt2b, κ -BUTX-Tt2b for short, following the nomenclature proposal of King *et al.* (18). The sequence shows high identity with peptides classified within the α -KTx subfamily 20 (19), including the six cysteines of the sequence signature of the CS α / β scaffold. Unexpectedly, the peptide adopts a CS α / α fold in solution. The same overall structure was determined for a recombinant version of another peptide from *Tityus serrulatus* classified within the same subfamily (UniProt P86271, Ts16 in Ref. 46). Peptides of the α -KTx subfamily 20 were assumed to adopt the conventional CS α / β scaffold on the basis of their common cysteine spacing. However, both κ -BUTX-Tt2b and Ts16 adopt an unexpected fold even if sharing the cysteine pattern of conventional CS α / β peptides, thus offering new insights on the structural versatility of scorpion venom peptides. Acknowledging this versatility is important if the full potential of animal venoms as natural peptide libraries is to be realized.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Purification and Sequence Determination of the Novel Peptide

Venom from the scorpion *Tityus trivittatus* collected in the Province of Santa Fe, Argentina, was obtained by electrical stimulation and separated as earlier described (20). Only two steps of HPLC fractionation were necessary to obtain the pure peptide under study. An analytical C18 reverse phase column (Vydac, Hesperia) was used with a linear gradient from solvent A (water in 0.12% TFA, Sigma-Aldrich; all of the chemicals were purchased from this company, unless otherwise specified) to 60% solvent B (acetonitrile in 0.10% TFA), run for 60 min. The second separation used the same system with a gradient from 10 to 35% solvent B, run for 45 min. The amino acid sequence determination of the pure peptide was obtained using automatic Edman degradation with a Beckman LF 3000 protein sequencer, and MS measurements were obtained with an ion-trap equipment from Finnigan LCQ^{Pro} as earlier described (20). The peptide was named κ -buthitoxin-Tt2b.

Disulfide Bridge Determination

Pure peptide (18 μ g) was digested with tosylphenylalanyl chloromethyl ketone-trypsin and endopeptidase V8 from *Staphylococcus aureus* (Roche Applied Science). Initially, 1 μ g

of trypsin was added in presence of an ammonium bicarbonate buffer (pH 8) and hydrolyzed for 5 h; then the endopeptidase V8 (1 μ g) was added, and the reaction was incubated for 12 h at 36°C. The peptides were separated using the same HPLC conditions used initially for the whole venom (see above) and sequenced.

Design and Cloning of the Synthetic κ -BUTX-Tt2b Gene

The κ -BUTX-Tt2b synthetic gene coding for the peptide was assembled based on the amino acid sequence obtained and optimized for *Escherichia coli* codon usage. The κ -BUTX-Tt2b gene (see supplemental data Fig. SMI) was cloned into the expression vector pET32a (Novagen). The resulting plasmid pET32- κ -BUTX-Tt2b was confirmed by DNA sequencing. The Ts16 synthetic gene used was based on the κ -BUTX-Tt2b gene (sequence available in supplemental data Fig. SMI).

Protein Expression

Recombinant- κ -BUTX-Tt2b protein was overexpressed in tuner *E. coli* cells (Novagen) transformed with the expression vector pET32- κ -BUTX-Tt2b. LB medium supplemented with ampicillin was used to grown cells at 37°C. Protein expression was induced at an A₆₀₀ between 0.7–0.8 with isopropyl thio- β -galactopyranoside 0.5 mM. The cells were incubated for 6 h at 30°C and harvested by centrifugation.

Recombinant Protein Purification

For κ -BUTX-Tt2b, the cell pellets were resuspended in lysis buffer (150 mM NaCl, 0.1 mg/ml lysozyme, 50 mM Tris/HCl, pH 8) and sonicated using (Misonix Sonicator 3000). The soluble fraction was separated by centrifugation at 32,000 \times g for 30 min at 4°C. Recombinant His₆-tagged fusion toxin (20.3 kDa) was purified by metal-chelate affinity chromatography using a HiTrap Ni²⁺ column (GE Healthcare) and eluted with two column volumes of elution buffer (50 mM Tris/HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 500 mM imidazole). Thrombin was used to release the κ -BUTX-Tt2b recombinant toxin from the N terminus thioredoxin fusion protein. Cleavage reaction was performed for 6 h at 18°C according to the manufacturer's instructions. A second round of isolation by metal-chelate affinity chromatography was required to remove κ -BUTX-Tt2b from cleavage reaction subproducts. Final κ -BUTX-Tt2b purification was performed with reverse phase HPLC in a Pro-Star Varian instrument equipped with a binary gradient solvent system on a Jupiter C18 column (250 mm \times 4.6 mm; Phenomenex) using a linear gradient from 12 to 30% of water-acetonitrile run for 30 min (containing 0.05% TFA) at a flow rate of 1 ml/min.

Protein Characterization

Mass Spectrometry—MALDI-TOF MS on a Bruker Daltonics Microflex LT equipment was used to determine the molecular mass of the recombinant proteins. The data were acquired using the reflector operation mode acquiring 150 shots. The samples were prepared with α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in a 1:10 ratio (21).

Electrophysiological Measurements—cRNAs for voltage-dependent potassium channels: *Shaker-IR* (Shaker channel with inactivation domain removed) and hKv1.2 subunits were tran-

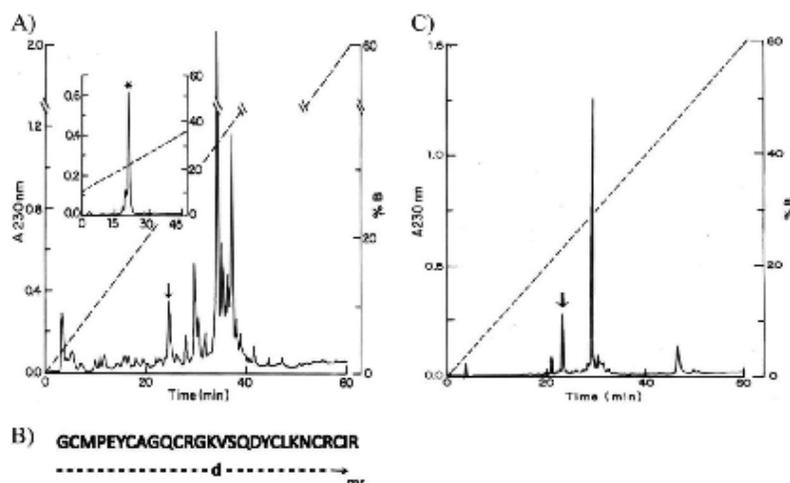


FIGURE 1. A, venom fractionation. Soluble venom of *T. trivittatus* was loaded into a C18 reverse phase column and eluted from the HPLC system with a linear gradient made of solvent A (0.12% TFA in water) to solvent B (acetonitrile in 0.10% TFA) run for 60 min. The component eluting at 24.7 min (arrow), which corresponds to 4.44% of the soluble venom applied, was recovered and loaded into the same system but resolved with a linear gradient from 8–35% solvent B run for 45 min. From the component marked with an arrow, ~70% was the pure peptide (labeled with asterisk). B, a sample (~2 nmol) of reduced and alkylated peptide was used for amino acid sequence determination using automatic sequencing and mass spectrometry, as described under "Experimental Procedures." The first 27 residues were unequivocally determined by Edman degradation, and the last residue was inferred from the mass spectrometry analysis. C, separation of enzymatically digested peptide. A sample of native peptide (18 μ g) was digested by trypsin and endopeptidase V8 in the conditions described under "Experimental Procedures" and applied to the C18 reverse phase column. All of the peptides were sequenced. The one labeled with an arrow eluted at 23.0 min was identified as corresponding to the disulfide between C1 and C5.

scribed using a mMESSAGE mMACHINE *in vitro* transcription kit (Ambion). cRNAs were injected into *Xenopus laevis* oocytes using 1–2 ng (in 50 nl) of K^+ -subunits. Potassium currents were recorded 2–4 days after cRNA injection.

Two-electrode Voltage Clamp—The bath solution was ND-96: 96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 5 mM HEPES, pH 7.4, adjusted with NaOH. Resistance for the voltage and current electrodes were 1.0–1.5 and 0.3–0.5 M Ω , respectively, when filled with 3 M KCl. Holding potential was –60 mV, and pulse protocol was applied from –60 mV to +60 mV with increments of 20 mV for 200 ms. Macroscopic currents were recorded using the CA1B high performance oocyte clamp amplifier (Dagan Co.), the Digidata 1440 digitizer, and the pClamp10 software (Molecular Devices). The currents were filtered at $\frac{1}{2}$ of the sampling frequency (2 kHz). The volume of washing solution was ~20 times greater than that of the chamber containing the oocytes. Inhibition was evaluated every minute until steady state was reached, usually from 8 to 10 min.

Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

Sample Preparation—Native and recombinant κ -BUTX-Tt2b were prepared at 0.08 and 2.3 mM concentrations, respectively, by dissolving lyophilized protein in 95% H_2O , 5% D_2O (Cambridge Isotope Laboratories). The recombinant protein spectra were obtained at pH 3.5. No pH adjustment was done with the native sample. NMR data were recorded at 25 °C on an 800 MHz Varian spectrometer equipped with a HCN indirect detection probe. TOCSY spectra were recorded with isotropic mixing time of 75 and 20 ms. NOESY spectra were acquired using mixing times of 150 and 300 ms. The two-dimensional NMR spectra were conducted using a scheme of water suppression by gradient-tailored excitation for solvent suppression

(22). All of the experiments were acquired using 2048 and 1024 complex points in direct and indirect dimensions, respectively. Tt16 recombinant protein (rTt16) spectra were recorded in a 500 MHz Varian instrument at 3.0 mM; experiments were obtained as before.

Data Processing and Analysis—NMRDraw and NMRpipe software were used for processing data (23). CARA1.5 software was used for NMR data analysis (24). Semi-automated assignment and distance geometry calculations were performed with CYANA 2.1 (25).

Molecular Dynamics Refinement

Structure refinement was performed using molecular dynamics AMBER 9 (26) suite with an explicit solvent model. Lowest CYANA target function values were used for further refinement. Molecular dynamics simulations and the energy minimizations were carried out with the topology and parameters of AMBER-99SB force field. Distance and dihedral angle constraints were used for AMBER calculations following the method proposed by Xia *et al.* (27). Geometric quality of structures was assessed using PROCHECK utility in the validation server of the Protein Data Bank.

RESULTS

κ -BUTX-Tt2b Isolation Sequence and Disulfide Determination—Fig. 1A shows HPLC separation of the soluble venom from *T. trivittatus*. The inset shows a second HPLC fractionation, after selecting only the component eluted at 24.7 min from the first run. The major component, labeled with an asterisk (see inset), was the peptide used for this study (~3.1% of the soluble venom). The amino acid sequence determination of this pure peptide gave an unequivocal sequence assignment up

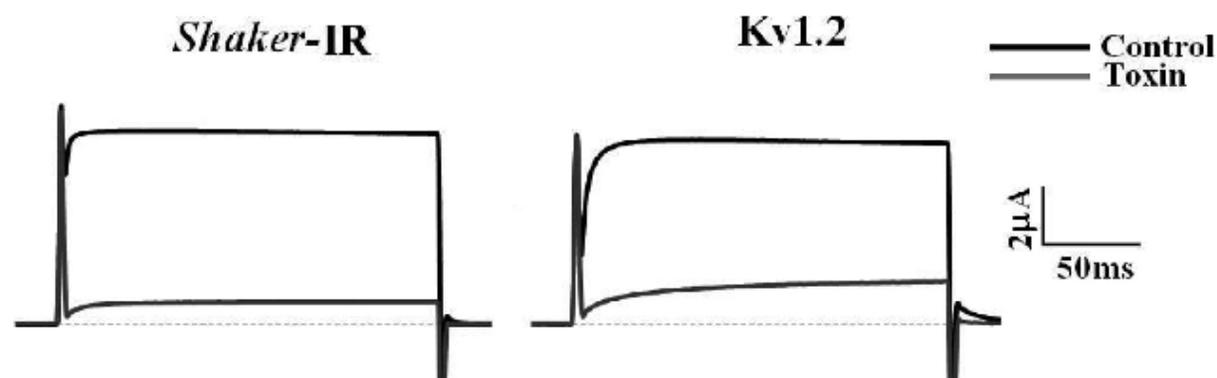


FIGURE 2. Effect of κ -BUTX-Tt2b toxin on *Shaker-IR* (left panel) and *Kv1.2* channels (right panel). Macroscopic K^+ currents were recorded using two-electrode voltage-clamp technique in ND96 solution. Currents were elicited by depolarizing the membrane for 200 ms, from a holding potential of -60 mV to a pulse step of $+60$ mV. Pulse protocol was applied at 60 s each. Traces for control conditions are shown with a black line, and those in the presence of recombinant toxin are shown with a gray line (after 8 min of application at $200 \mu\text{mol/liter}$). The current percentages of blockade for *Shaker-IR* and *Kv1.2* were 88.7 ± 9.9 and 74.9 ± 7.1 (mean \pm S.E.), respectively. The inhibition of currents was not fully reversible (not shown).

to residue number 27 (Fig. 1B). The last amino acid, Arg in position 28, was inferred by mass spectrometry determination. The experimental mass determined for the native peptide was 3179.75 Da, and the theoretical mass expected for the first 27 residues directly determined was 3023.57, leaving a molecular mass of 156.18, which was identified as being that of arginine. This sequence was deposited in the UniProt Knowledgebase under the accession number B3A0L5. Sequence similarity searches revealed high identity with only two *Tityus* sp. venom peptides: Ts16 from *T. serrulatus* (P86271, 89%) and Tt28 from *T. trivittatus* (POC183 (18), 65%). No disulfide pairing for any of these homologous peptides has been reported.

Fig. 1C shows the profile of HPLC separation after enzymatic hydrolysis. The peptide eluted at 23.0 min was compatible with a disulfide pairing between the first (Cys²) and fifth cysteines (Cys²⁴), C1 and C5. The automatic sequencer showed two amino acid residues for the first cycles: Gly and Asn. Position 2 was a blank, but Met was in position 3 and Pro was in position 4. It implies that endopeptidase V8 cleaved the peptide bond at the Glu⁵, and trypsin cleaved Lys²² and Arg²⁵. The remaining peptides gave always more than two amino acid residues per cycle of the sequencer, because the core fragment of peptide after the enzymatic hydrolysis did not allow separating the other peptides containing the two remaining disulfide bridges. In this way, only one of the disulfide bridges of the toxin was directly determined.

Fusion Protein Expression and Purification—Most of the fusion protein was located in the soluble cellular lysate, and it was efficiently retained by the HiTrap Ni²⁺ column with purification yield of 36 mg/liter. Thrombin recognizes the sequence X₃X₂R/L—GSX₁X₅; therefore, the product of the hydrolysis reaction is the κ -BUTX-Tt2b sequence with additional glycine and serine at the N-terminal segment, r κ -BUTX-Tt2b. Optimal cleavage conditions were obtained at 18 °C after 6 h of reaction. Finally, another isolation by metal-chelate affinity chromatography purification step was performed.

Reverse Phase HPLC Purification and Protein Characterization—Under chromatographic conditions selected, r κ -BUTX-Tt2b elutes at 23.0 min with a MALDI-TOF mass of

3325.1 for [M+H]⁺, which is in good agreement with the theoretical mass of 3323.9 Da for an oxidized peptide forming three disulfide bridges, calculated with the ProtParam tool from ExPASy server (28). The purification procedures indicated above yielded 0.7 mg of r κ -BUTX-Tt2b per liter in LB culture medium.

Electrophysiological Measurements—Electrophysiological assays were done on *Shaker-IR* and h*Kv1.2* channels. Fig. 2 shows the effect of r κ -BUTX-Tt2b on both channels, using the experimental conditions described below. The protocol of test pulses was applied every 60 s to verify the current stability previous to the toxin addition. Only oocytes showing a minimum run-down were chosen for experimental assays. The control currents (black line) through *Shaker-IR* or h*Kv1.2* channels under whole cell recording are plotted. Fig. 2 shows representative traces for both channels only at $+60$ mV pulse. The addition of r κ -BUTX-Tt2b ($200 \mu\text{mol/liter}$) blocked partially outward currents (gray line). Recombinant toxin did not change basically the original shape of currents, suggesting that r κ -BUTX-Tt2b acts as a pore blocker, although, further experiments are needed to test this hypothesis. Current reduction was 88.7 ± 9.9 and 74.9 ± 7.1 ($n = 3$) for *Shaker-IR* and *Kv1.2*, respectively.

Nuclear Magnetic Resonance Analysis—NMR experiments for the κ -BUTX-Tt2b native protein were obtained with poor signal to noise ratio at a very low concentration. The TOCSY experiment was obtained with sufficient sensitivity. However, the NOESY experiments displayed low sensitivity that made difficult to complete the sequential assignments. In contrast, NMR spectroscopic studies using higher concentration of r κ -BUTX-Tt2b revealed well resolved resonances with good chemical shift dispersion between 6.3 and 10.3 ppm. A comparison of the chemical shifts between the amide region signals of the recombinant (black) and the native (red) toxins shows just slight differences mainly caused by different pH levels and concentrations used for the experiments (see Fig. 3). Aliphatic region is almost identical. A NOESY HN region spectrum shows the HN-HN correlations consistent with the presence of

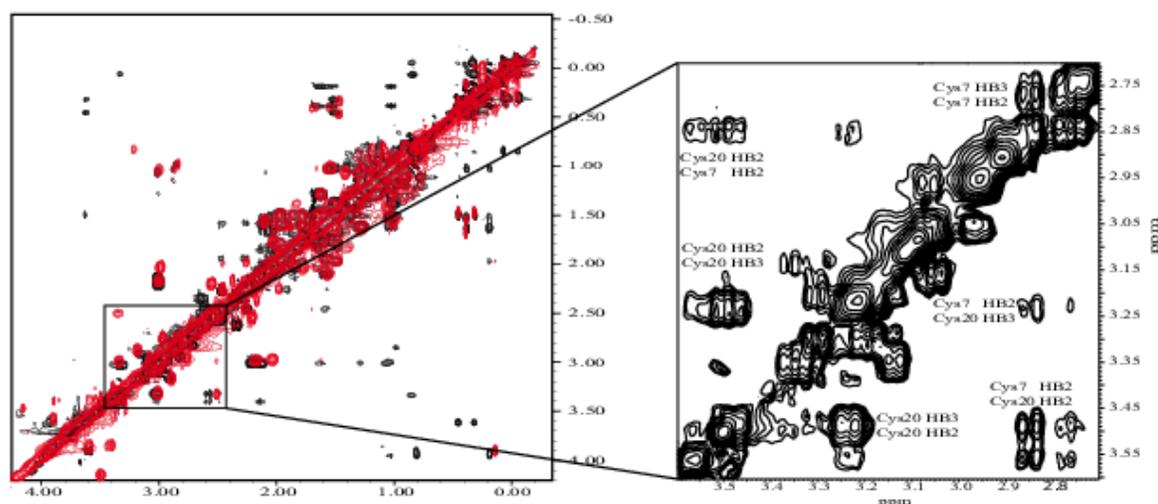


FIGURE 3. NOESY spectra showing the aliphatic region of native and recombinant κ -BUTX-Tt2b spectra obtained with 0.1 mM native (48 h of acquisition in red) and with 2.3 mM recombinant (in black). Differences are attributed to concentration and the glycine and serine in the N terminus. The inset shows the correlations between Cys⁷ and Cys²⁰ forming the cystine pair C2-C4 for the recombinant protein (Cys⁷ HB₃-Cys²⁰ HB₂, Cys⁷ HB₂-Cys²⁰ HB₃, Cys⁷ HB₃-Cys²⁰ HB₃, and Cys⁷ HB₂-Cys²⁰ HB₃ with distances found of 4.9, 4.0, 3.4, and 4.0 Å).

helical structures (data not shown). The assignments were achieved following the standard protocol (29).

κ -BUTX-Tt2b Disulfide Bond Connectivities and Three-dimensional Structure—All 30 κ -BUTX-Tt2b spin systems were identified, and most proton resonance signals were unambiguously assigned (chemical shift completeness of 98.7%). The position of the disulfide bridges was established by analyzing the NMR experimental results independently. A NOE signal between H β -H β from Cys⁷ and Cys²⁰ (Fig. 3, inset), which corresponds to C2-C4 cystine pair (residue numbers are indicated as in the native protein), was found. Also, there were observed NOE correlations between HN of Cys²⁴ with H β of Cys² and H β of Met³; all of these signals are in agreement with the formation of the C1-C5 pair. These results confirm a new cystine pairing for scorpion toxins when compared with the conventional pairs of CS α / β scorpion venom peptides (C1-C4, C2-C5, and C3-C6 (11)). To further support the assigned disulfide bonds, three CYANA calculations were performed with different input parameters following a protocol described by Fadel *et al.* (30). The first calculation included data without disulfide bond restrictions. This result provides the NOE constraint contributions for the structure, which was used as a reference. The second calculation was performed using as restrictions the most common disulfide pattern observed in KTxs toxins: C1-C4, C2-C5, and C3-C6. Finally, another set of structures were calculated considering the alternative C1-C5, C2-C4, and C3-C6 cystine pairing pattern, as suggested by the NOE NMR data assignment and mass spectrometry of a digested peptide. Table 1 shows the statistics and RMSD values of these three calculations. After comparison of backbone for the residues 3–30 of the lowest energy structure for each set of calculations, the RMSD against the reference structure gave 1.75 Å for the conventional disulfide bridges and 0.78 Å for the nonconventional disulfide bridges.

TABLE 1

RMSD between 20 CYANA calculated structures for κ -BUTX-Tt2b varying the disulfide bridge patterns

The initial data set of NOE restraints for all calculations was the same. The first set was calculated using only NOE restraints, and no disulfide bridge constraints (No DSB) were used. A second structure calculation set was done considering conventional DSB (cDSB): C1-C4, C2-C5, and C3-C6 pairs. Last calculations were done including novel DSB (nDSB): C1-C5, C2-C4, and C3-C6 pairs. The reported numbers under the upper distance limit are the final set of NOEs that were included by CYANA, which automatically rejects or accepts NOEs to improve the target function value (25).

κ -BUTX-Tt2b	No DSB	cDSB	nDSB
Upper distance limits			
Total	367	342	365
Short range	228	221	223
Medium range	64	55	64
Long range	75	66	78
RMSD (3–30)			
Average backbone (Å)	0.83	0.52	0.39
Average heavy atom (Å)	1.09	1.19	1.01
Target function value (Å)	0.0	0.06	0.01

A total of 200 structures were generated with CYANA; only 20 structures (Fig. 4A) with the lowest target function are shown. The proton shift index is in good agreement with the secondary structure found (31). NOE correlations between HN_i/HN_{i+1}, H α _i/HN_{i+3}, and H α _i/HN_{i+4} indicate that κ -BUTX-Tt2b is mainly shaped by helical elements. The κ -BUTX-Tt2b structure consists of an antiparallel helix-loop-helix topology with a new fold pattern stabilized by three nonconventional disulfide bonds between C1-C5, C2-C4, and C3-C6 for scorpion toxins. The helices are from residues Pro⁴-Gln¹⁰ and Val¹⁵-Asn²³ and three disulfide bridges Cys²-Cys²⁴, Cys⁷-Cys²⁰, and Cys¹¹-Cys²⁶. A loop of four residues, Cys¹¹-Lys¹⁴, connects the two helices. κ -BUTX-Tt2b toxin adopts a cystine-stabilized helix-loop-helix fold (CS α / α). This is the first scorpion venom CS α / α peptide, which contains three disulfide bonds.

The structure with the lowest energy is shown in Fig. 4C, and its correspondent electrostatic potential surface diagram is

New Fold for Scorpion Venom Peptides

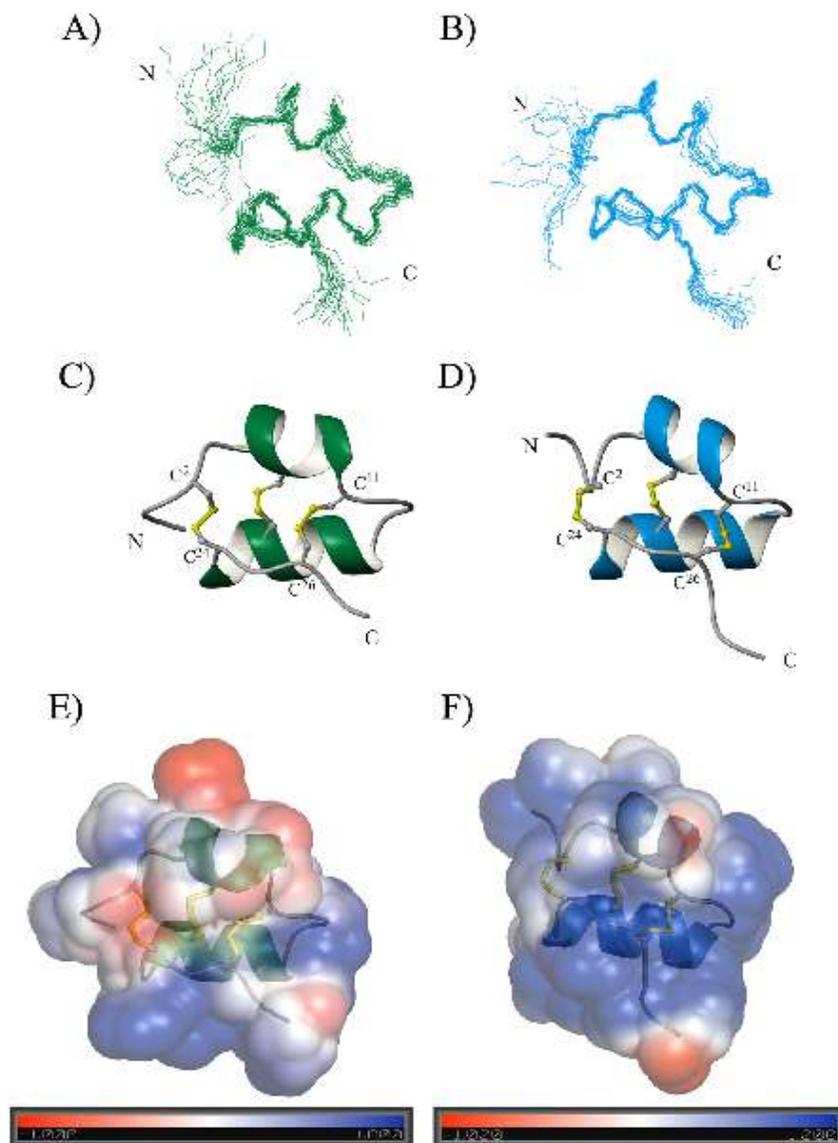


FIGURE 4. NMR solution structure of $\kappa\kappa$ -BUTX-Tt2b and rTs16. A and B, superimposed 20 lowest energy structures, only backbone atoms are displayed (44). C and D, ribbon representation of both minimized structure; backbone trace and disulfide bridges are shown. E and F, electrostatic surface potential diagram showing the positive region around the Tyr¹⁹ is in blue, and negative charge is printed in red. The ribbon shows the orientation of the molecule. N and C termini are labeled in panels A–D. A, C, and E correspond to $\kappa\kappa$ -BUTX-Tt2b, and B, D, and F correspond to Ts16.

shown in Fig. 4E. The $\kappa\kappa$ -BUTX-Tt2b atom coordinates and chemical shifts were deposited in the Protein Data Bank and Biological Magnetic Resonance Bank, with access codes 2LJ3 and 17876, respectively.

Native versus Recombinant κ -BUTX-Tt2b—Using the NMR assignments of $\kappa\kappa$ -BUTX-Tt2b as a reference, it was possible to identify all 28 spin systems for native κ -BUTX-Tt2b. However, it was not possible to solve the tridimensional structure from the native sample because of the absence of a significant number of NOE signals. Chemical shift assignments were used to compare HN and aliphatic region between native and recom-

binant κ -BUTX-Tt2b. Little difference in chemical shift was observed between native and recombinant peptides. Similar overlapped NOE peaks were used as spectroscopic evidence that both peptides have the same fold (Fig. 3). Furthermore, secondary structure prediction based on proton chemical shifts of native κ -BUTX-Tt2b shows helical patterns as described for the recombinant protein.

rTs16 Three-dimensional Structure—The high identity between κ -BUTX-Tt2b and Ts16 strongly suggests that the latter would also adopt a CS α/α structure. To verify this hypothesis, the $\kappa\kappa$ -BUTX-Tt2b gene was used as a template for Ts16

TABLE 2

RMSD between 20 CYANA calculated structures for Ts16 using only NOE restraints considering the novel DSB (nDSB): C1-C5, C2-C4, and C3-C6 pairs.

Ts16	nDSB C
Upper distance limits	
Total	421
Short range	251
Medium range	85
Long range	85
RMSD (3–30)	
Average backbone (Å)	0.35
Average heavy atom (Å)	1.00

cloning. Following the experimental procedures reported above, it was possible to obtain the NMR solution structure of rTs16.

All 31 rTs16 spin systems were identified (chemical shift completeness of 96.8%). The disulfide bridges positions for κ -BUTX-Tt2b were determined based on the presence of Cys²-Cys²⁴ and Cys⁷-Cys²⁰ H β -H β NOE cross-peaks; neither Cys²-Cys²⁰ nor Cys⁷-Cys²⁴ showed any NOESY correlation between β protons.

Final CYANA calculations were performed as for κ -BUTX-Tt2b considering 809 NOE distance restraints. rTs16 peptide has helical conformations between Lys⁴-Gln¹⁰ and Lys¹⁴-His²³ NOE correlations between HN_i/HN_{i+1}, H α _i/HN_{i+3}, and H α _i/HN_{i+4} indicate that Ts16 is mainly shaped by helical elements (see the supplemental data Fig. SM4). The rTs16 structure consists of an antiparallel helix-loop-helix topology with same fold pattern stabilized by three nonconventional disulfide bonds for scorpion toxins as for κ -BUTX-Tt2b. A loop of three residues, Cys¹¹-Gly¹³, is connecting the two helices. Ts16 toxin thus also belongs to the CS α / α (Fig. 4, B, D, and F), which shows the prevalence of the three disulfide bridged CS α / α peptides in different scorpion venoms. Atom coordinates and chemical shifts were deposited in the Protein Data Bank (2LKA) and the Biological Magnetic Resonance Bank (17987). Table 2 shows the statistics and RMSD values for Ts16.

DISCUSSION

New Structural Group of Scorpion Venom Peptides—The venom of the Argentinean scorpion *T. trivittatus* is quite toxic, having caused human fatalities (32). Although the interest on studying this venom started several years ago (33), very little is known about its components structure and function. There are only two publications describing components of this venom, both dealing with peptides that affect K⁺ ion permeability (19, 20). The former publication describes a new subfamily of α -KTx toxins. The reported peptide was called Tt28, with the systematic name α -KTx20.1. It has 29 amino acid residues with three disulfide bridges and is a fairly good blocker of K⁺ channels Kv1.2 (EC₅₀ = ~100 nM) and Kv1.3 (EC₅₀ = ~7 nM) but failed to have any effect on Kv1.1, Kv1.4, *Shaker* IR, or human ether- α -go-go related K⁺ channels. The three-dimensional structure of this toxin is not solved yet, and the positions of its disulfide bonds remain to be determined, but they were suggested to be similar to other α -KTx scorpion toxins based on the presence of the common cysteine spacing of the CS α / β proteins (19). The sequences of the two structures reported

here share large identity with Tt28 (Fig. 5), so they would also be accordingly classified as α -KTx 20 peptides; however, enzymatic studies, NMR assignments, and molecular calculations with both peptides showed that they do not correspond to the typical CS α / β scaffold of most scorpion toxins known to date. Rather, both peptides adopt a CS α / α scaffold in solution.

All α Variation of CS α / β Scaffold—The CS α / α fold is very uncommon among scorpion venom peptides; all of the described examples are highly similar and have been collectively named κ -KTx (9, 11, 14–17). Disulfide pairing of κ -KTx, C1-C4, and C2-C3 is different from the one assigned to κ -BUTX-Tt2b and Ts16, C1-C5, C2-C4, and C3-C6; thus it is not possible to align the sequences based on Tytgat criteria (9), which establish that toxins must be aligned based on their cysteine position. Likewise, structure-based alignments of κ -BUTX-Tt2b and Ts16 with κ -KTx produce rather poor matches, thus indicating that their structure define a novel structural fold of scorpion venom peptides. The founding member of this group, although so far unnoticed (see below), would be Tt28 (19).

Database searches with κ -BUTX-Tt2b and Ts16 sequences retrieved only Tt28 as a significant match. It was nonetheless possible to find other CS α / β peptides, mainly α -KTx, by remote homology searching within three rounds of PSI-BLAST against SwissProt database (34). The six cysteines could be satisfactorily aligned (Fig. 5). Similarly, Ts16 and Tt28 were retrieved within three PSI-BLAST rounds starting with typical α -KTx. Their low sequence similarity with α -KTx prevents an unambiguous homology assignment; thus further evidence, such as conserved gene structure, is needed to resolve whether or not there is an evolutionary link between these CS α / α peptides and the typical α -KTx.

Structural comparison with TopMatch (35) revealed fairly good overlaps for two regions of κ -BUTX-Tt2b and Ts16 with the α -helix and second β -strand of several α -KTx retrieved during PSI-BLAST searches. Fig. 6A shows the structural alignment of κ -BUTX-Tt2b (green) and a chimeric peptide based on two α -KTx subfamily 6 peptides (Protein Data Bank code 1wpd (36) in gray); the structural alignment of main chain atoms over 15 residues has a RMSD of 1.8 Å. Detailed analysis of this structural superposition unveiled a tight overlap, 1.4 Å over the main chain atoms, between the four cysteines defining the sequence signature of the CS α / β scaffold in both structures (Cys⁷, Cys¹¹, Cys²⁴, and Cys²⁶ in κ -BUTX-Tt2b and Cys⁹, Cys¹³, Cys²⁹, and Cys³¹ for the chimera). Although we favor the noncanonical disulfide pattern for Ts16 on the basis of NOE cross-peaks, structure calculations with rTs16 suggest that it could form the typical CS α / β disulfide pattern, while maintaining the CS α / α scaffold. Moreover, it has been previously shown that another scorpion venom peptide, maurotoxin, could accommodate two different disulfide patterns without major changes in its CS α / β three-dimensional structure (37). It thus seems that the same cysteine pattern could accommodate more than one disulfide connectivity, as previously shown for the cyclic peptide kalata B1 (38).

From the structural comparison it is also evident that the main difference between κ -BUTX-Tt2b and Ts16 with respect to CS α / β peptides is the second α -helix of the newly described

New Fold for Scorpion Venom Peptides

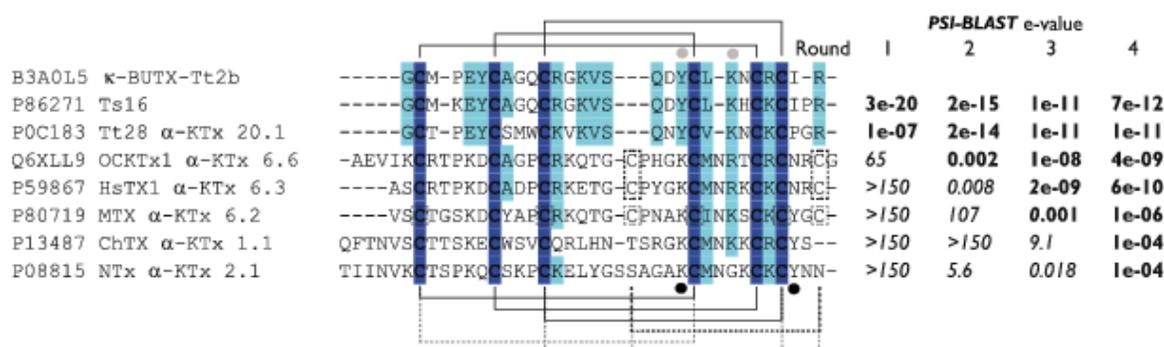


FIGURE 5. Multiple sequence alignment of scorpion venom peptides. Representative sequences retrieved during PSI-BLAST search (34) with κ -BUTX-Tt2b as query were aligned with COBALT (45). Conserved residues in κ -BUTX-Tt2b, Ts16, and Tt28 are highlighted (dark blue, complete conservation in all fourth round hits; light blue, partial conservation). PSI-BLAST columns indicate the expected values after a given number of rounds against SwissProt release of June 2011. The values in bold type indicate that the sequences were used for the next PSI-BLAST round. The values in italics indicate that the sequences were not used for the next round. Lines above the alignment connect the Cys residues according to the disulfides determined for κ -BUTX-Tt2b. The solid lines below the alignment connect the Cys residues according to the typical CS α / β scaffold. The dotted lines indicate the extra disulfide bridge of α -KTx subfamily α members. The gray dotted lines depict the unusual disulfide pattern of MTX (11).

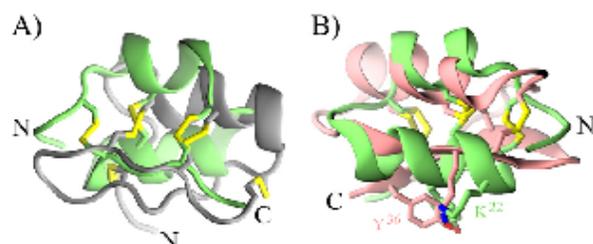


FIGURE 6. Structural comparison of κ -BUTX-Tt2b with α -KTx peptides. The structure of κ -BUTX-Tt2b (green) was aligned with the structures of a chimeric peptide based on HsTx1 and MTX (Protein Data Bank code 1wpl in gray) (A) and charybotoxin (Protein Data Bank code 2crd in pink) (B); both panels have the same orientation. Cysteine residues are depicted as sticks in both panels; notice the almost perfect overlap of the four cysteines, which define the sequence signature of typical CS α / β peptides (RMSD of 0.76 Å over C- α atoms of the chimeric peptide), even if they are making different disulfide bridges. Functional dyad residues of charybotoxin are shown as stick representation in B. In the superposition the distance between the side chain amino group of charybotoxin Lys²⁷ and κ -BUTX-Tt2b Lys²¹ is 1.43 Å, and the average distance of all side chain atoms of charybotoxin Tyr³⁶ and κ -BUTX-Tt2b Tyr¹⁹ is 1.3 Å.

structures. It occupies the place of the first β -strand of CS α / β peptides; therefore the CS α / α fold of κ -BUTX-Tt2b and Ts16 seems to be an all α version of the CS α / β scaffold where the second β strand is conserved as an extended conformation of the C-terminal residues. A thought-provoking possibility is the existence of a structural switch between CS α / α and CS α / β conformations. Indeed, two chromatographic peaks were consistently found during the reverse phase chromatography of the recombinant peptides described here; each peak presents the same molecular mass in MALDI-TOF results (data not shown). Such structural transitions have been previously found in a number of proteins that undergo major shifts in secondary structure (39). Further characterization ought to be done to test this hypothesis.

Hint about Convergent Molecular Determinants for K⁺ Channel Blockade—Like many other peptides targeting K⁺ channels, most scorpion α -KTx blocks ion conduction through a common pharmacophore composed by a pore-plugging lysine and an aromatic residue located \sim 7 Å apart, which has

been dubbed as the “functional dyad” (11, 40). Neither the peptides described here nor the homologous Tt28 present the most common variant of the functional dyad among α -KTx (see dots above and below the alignment in Fig. 5). However, structural superposition showed that the functional dyad residues of charybotoxin (ChTX), Lys²⁷ and Tyr³⁶ (Protein Data Bank code 2crd) (41), overlap with the nonhomologous residues Lys²² and Tyr⁴⁹ of κ -BUTX-Tt2b (Fig. 6B), two residues conserved in Ts16 and Tt28. Thus, although mutagenesis studies would be needed to corroborate this hypothesis, it might be possible that convergent evolution has led to the emergence of a novel variant of the functional dyad.

Note on Toxin Nomenclature and Classification—Here we followed the proposal of King *et al.* (18) about naming of novel toxins. Their classification scheme has the advantage of being systematic, although it intentionally let out the information about three-dimensional folding of the toxins. These authors stressed the fact that the knowledge about the three-dimensional scaffolds recruited into venoms is still “rudimentary” (18); the unexpected folding of peptides described here reinforces their cautionary remark. The newly described peptide was named κ -BUTX-Tt2b, acknowledging its activity against K⁺ channels (κ), the taxonomic classification of the original source (buthitoxin-Tt), and the fact that it is the second example of the second type of K⁺ channel blockers to be found in this species (2b, the first one would be Tt28).

Alternatively we could have followed the “KTx” classification scheme for scorpion toxins active on K⁺ channels proposed by an international panel of experts (9). This nomenclature has the virtues of recapitulating what is known about the phylogeny of many scorpion toxins and of mirroring to a certain extent their pharmacology (10). With the exception of κ -KTx, all other scorpion KTxs are supposed to fold according to the CS α / β scaffold, a conjecture largely supported by all of the structures known until now and the strict conservation of the cysteine pattern (11). Following this scheme, the amino acid sequence of the novel peptide described here would lead to classify it as another member of the α -KTx 20 subfamily, along with Tt28 (19) and Ts16. However, it was only until the κ -BUTX-Tt2b

structure was obtained that it was possible to realize that a new structural group of scorpion venom peptides has been found, a result corroborated by the solution structure of Ts16.

Assuming that Tt28 also folds into a CS α/α structure, the three similar peptides could be transferred to the only other group of scorpion venom peptides, which adopt the same structural pattern, the κ -KTx subfamily. However, we hesitate to do so because the helix-loop-helix topology of r κ -BUTX-Tt2b and Ts16 appear to be an elaboration of the most common CS α/β scaffold, rather than a variation of the κ -KTx α -hairpin. Such structural elaboration based on different cysteine patterns has been previously proposed to explain the emergence of the inhibitory cystine knot motif over an "ancestral" disulfide directed β -hairpin (42).

Concluding Remarks—The three-dimensional structures reported here highlight the structural versatility that could be attained by peptides sharing a common cysteine pattern, thus revealing a new trick of this old pattern. Further research would show whether or not they are unique examples of their kind, but providing that animal venoms are arsenal-like mixtures of bioactive compounds, among which a small number of disulfide rich scaffolds are highly prevalent (11, 43), we expect that other CS α/α peptides will be found in the future, thus helping to clarify their biological function in the venom and their relationships with other venom components.

Acknowledgments—We acknowledge the technical assistance given to the project by Dr. Fernando Zamudio Zúñiga, Carmen Marquez, and Eréndira García. We are grateful to Professors E. Wanke (Università di Milano-Bicocca) and L. Toro (David Geffen School of Medicine at UCLA) for Kv1.2 and Shaker-IR clones, respectively.

REFERENCES

- Froy, O., Sagiv, T., Poreh, M., Urbach, D., Zilberberg, N., and Gurevitz, M. (1999) Dynamic diversification from a putative common ancestor of scorpion toxins affecting sodium, potassium, and chloride channels. *J. Mol. Evol.* 48, 187–196
- Rodríguez de la Vega, R. C., Schwartz, E. F., and Possani, L. D. (2010) Mining on scorpion venom biodiversity. *Toxicon* 56, 1155–1161
- Mouhat, S., Andreotti, N., Jouirou, B., and Sabatier, J. M. (2008) Animal toxins acting on voltage-gated potassium channels. *Curr. Pharm. Des.* 14, 2503–2518
- Billen, B., Bosmans, F., and Tytgat, J. (2008) Animal peptides targeting voltage-activated sodium channels. *Curr. Pharm. Des.* 14, 2492–2502
- Norton, R. S., and McDonough, S. I. (2008) Peptides targeting voltage-gated calcium channels. *Curr. Pharm. Des.* 14, 2480–2491
- Duterte, S., and Lewis, R. J. (2010) Use of venom peptides to probe ion channel structure and function. *J. Biol. Chem.* 285, 13315–13320
- Lewis, R. J., and Garcia, M. L. (2003) Therapeutic potential of venom peptides. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 790–802
- Jenkinson, D. H. (2006) Potassium channels. Multiplicity and challenges. *Br. J. Pharmacol.* 147, 563–571
- Tytgat, J., Chandy, K. G., Garcia, M. L., Gutman, G. A., Martin-Eaucobre, M. F., van der Walt, J. J., and Possani, L. D. (1999) A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms. α -KTx molecular subfamilies. *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 444–447
- Rodríguez de la Vega, R. C., and Possani, L. D. (2004) Current views on scorpion toxins specific for K⁺ channels. *Toxicon* 43, 865–875
- Mouhat, S., Jouirou, B., Mosbah, A., De Waard, M., and Sabatier, J. M. (2004) Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochem. J.* 378, 717–726
- Diego-García, E., Abdel-Mottaleb, Y., Schwartz, E. F., Rodríguez de la Vega, R. C., Tytgat, J., and Possani, L. D. (2008) Cytolytic and K⁺ channel blocking activities of β -KTx and scorpine-like peptides purified from scorpion venoms. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 187–200
- Rodríguez de la Vega, R. C., Barazza, O., Restano-Cassulini, R., and Possani, L. D. (2009) *Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology* (M. E. Lima, ed), pp. 193–204, Editora UFMG, Belo Horizonte, Brazil
- Srinivasan, K. N., Sivasubja, V., Huys, I., Sasaki, T., Cheng, B., Kumar, T. K., Sato, K., Tytgat, J., Yu, C., San, B. C., Ranganathan, S., Bowie, H. J., Kini, R. M., and Gopalakrishnakone, P. (2002) κ -Hefutoxin I, a novel toxin from the scorpion *Heterometrus fulvipes* with unique structure and function. Importance of the functional diad in potassium channel selectivity. *J. Biol. Chem.* 277, 30040–30047
- Nithanan, S., Pil, J., Abdel-Mottaleb, Y., Sugahara, Y., Gopalakrishnakone, P., Joseph, J. S., Sato, K., and Tytgat, J. (2005) Assignment of voltage-gated potassium channel blocking activity to κ -KTx1.3, a non-toxic homologue of κ -hefutoxin-1, from *Heterometrus spinifer* venom. *Biochem. Pharmacol.* 69, 669–678
- Chagot, B., Pimentel, C., Dai, L., Pil, J., Tytgat, J., Nakajima, T., Corzo, G., Darbon, H., and Ferrat, G. (2005) An unusual fold for potassium channel blockers. NMR structure of three toxins from the scorpion *Opisithacanthus madagascariensis*. *Biochem. J.* 388, 263–271
- Camargos, T. S., Restano-Cassulini, R., Possani, L. D., Peigneur, S., Tytgat, J., Schwartz, C. A., Alves, E. M., de Freitas, S. M., and Schwartz, E. F. (2011) The new κ -KTx 2.5 from the scorpion *Opisithacanthus cayaporum*. *Peptides* 32, 1509–1517
- King, G. F., Gentz, M. C., Escoubas, P., and Nicholson, G. M. (2008) A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals. *Toxicon* 52, 264–276
- Abdel-Mottaleb, Y., Coronas, F. V., de Roodt, A. R., Possani, L. D., and Tytgat, J. (2006) A novel toxin from the venom of the scorpion *Tityus trivittatus*, is the first member of a new alpha-KTX subfamily. *FEBS Lett.* 580, 592–596
- Coronas, F. V., de Roodt, A. R., Portugal, T. O., Zamudio, F. Z., Batista, C. V., Gómez-Lagunas, F., and Possani, L. D. (2003) Disulfide bridges and blockage of Shaker B K⁺ channels by another butanotoxin peptide purified from the Argentinian scorpion *Tityus trivittatus*. *Toxicon* 41, 173–179
- Gobom, J., Schuezenberg, M., Mueller, M., Theiss, D., Lehlich, H., and Nordhoff, E. (2001) α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid affinity sample preparation. A protocol for MALDI-MS peptide analysis in proteomics. *Anal. Chem.* 73, 434–438
- Piotto, M., Soudék, V., and Sklenář, V. (1992) Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR* 2, 661–665
- Deaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A. (1995) NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR* 6, 277–293
- Bartek, C., Xia, T., Billeter, M., Güntert, P., and Wüthrich, K. (1995) *J. Biomol. NMR* 6, 1–10
- Güntert, P. (2004) Automated NMR structure calculation with CYANA. *Methods Mol. Biol.* 278, 353–378
- Case, D. A., Cheatham, T. E., 3rd, Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K. M., Jr., Onufriev, A., Simmering, C., Wang, B., and Woods, R. J. (2005) The AMBER biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* 26, 1668–1688
- Xia, B., Tsui, V., Case, D. A., Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2002) Comparison of protein solution structures refined by molecular dynamics simulation in vacuum, with a generalized Born model, and with explicit water. *J. Biomol. NMR* 22, 317–331
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., and Bairoch, A. (2005) "Protein Identification and Analysis Tool on the ExPASy Server," in *The Proteomics Protocols Handbook* (John M. Walker, ed) 2nd Edition, pp. 571–607, Humana Press, Totowa, NJ
- Wüthrich, K. (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York
- Fadel, V., Bettendorff, P., Hezmann, T., de Azevedo, W. F., Jr., Oliveira, E. B., Yamane, T., and Wüthrich, K. (2005) Automated NMR structure determination and disulfide bond identification of the myotoxin crota- mine from *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon* 46, 759–767

New Fold for Scorpion Venom Peptides

31. Wishart, D. S., Sykes, B. D., and Richards, F. M. (1992) The chemical shift index: A fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy. *Biochemistry* 31, 1647–1651
32. de Roodt, A. R., Coronas, F. I., Lago, N., González, M. E., Laskowicz, R. D., Beltramino, J. C., Saavedra, S., López, R. A., Reati, G. J., Vuchazhuk, M. G., Bazán, E., Varni, L., Salomón, O. D., and Possani, L. D. (2010) General biochemical and immunological characterization of the venom from the scorpion *Tityus trivittatus* of Argentina. *Toxicon* 55, 307–319
33. de Roodt, A. R., Gimeno, E., Portiansky, E., Varni, L., Dolab, J. A., Segre, L., Litwin, S., and Vidal, J. C. (2001) A study on the experimental envenomation in mice with the venom of *Tityus trivittatus* Kraepelin 1898 (Scorpiones, Buthidae) captured in Argentina. *J. Nat. Toxins* 10, 99–109
34. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402
35. Sippl, M. J., and Wiederstein, M. (2008) A note on difficult structure alignment problems. *Bioinformatics* 24, 426–427
36. Regaya, I., Beeton, C., Ferrat, G., Andreotti, N., Darbon, H., De Waard, M., and Sabatier, J. M. (2004) Evidence for domain-specific recognition of SK and Kv channels by MIX and HsTx1 scorpion toxins. *J. Biol. Chem.* 279, 55690–55696
37. Fajloun, Z., Mosbah, A., Cazier, E., Manuelle, P., Sandoz, G., Fathallah, M., di Luozio, E., Devaux, C., Rochat, H., Darbon, H., De Waard, M., and Sabatier, J. M. (2000) Maurotoxin versus P11/HsTx1 scorpion toxins. Toward new insights in the understanding of their distinct disulfide bridge patterns. *J. Biol. Chem.* 275, 39394–39402
38. Bryan, P. N., and Orban, J. (2010) Proteins that switch folds. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20, 482–488
39. Rosengren, K. J., Daly, N. L., Plan, M. R., Waine, C., Craik, D. J. (2003) Twists, knots, and rings in proteins. Structural definition of the cyclotide framework. *J. Biol. Chem.* 278, 8606–8616
40. Dauplais, M., Lecoq, A., Song, J., Cotton, J., Jamin, N., Gilquin, B., Roumestand, C., Vita, C., de Medeiros, C. L., Rowan, E. G., Harvey, A. L., and Ménez, A. (1997) 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.* 272, 4302–4309
41. Bontems, F., Roumestand, C., Gilquin, B., Ménez, A., and Toma, F. (1991) Refined structure of charybdotoxin. Common motifs in scorpion toxins and insect defensins. *Science* 254, 1521–1523
42. Smith, J. J., Hill, J. M., Little, M. J., Nicholson, G. M., King, G. F., and Alewood, P. F. (2011) Unique scorpion toxin with a putative ancestral fold provides insight into evolution of the inhibitor cystine knot motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 10478–10483
43. Fry, B. G., Roelants, K., Champagne, D. E., Scheib, H., Tyndall, J. D., King, G. F., Nevalainen, T. J., Norman, J. A., Lewis, R. J., Norton, R. S., Renjifo, C., and Rodriguez de la Vega, R. C. (2009) The toxicogenomic multiverse. Convergent recruitment of proteins into animal venoms. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 10, 483–511
44. Koradi, R., Billeter, M., and Wüthrich, K. (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graphics* 14, 29–32
45. Papadopoulos, J. S., and Agarwal, R. (2007) COBALT: Constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. *Bioinformatics* 23, 1073–1079
46. Bordon, K. C. F., Cologna, C. T., Tytgat, J., and Arantes, E. C. (2011) 17th Congress of the European Section of the International Society of Toxinology, Valencia, September 11–15, 2011 (Calvete, J. J., chairman), Poster 128, SOM Ciencia, Valencia, Spain



Solution structure of native and recombinant expressed toxin Cssl from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*, and their effects on Nav1.5 Sodium channels [☆]

Alma L. Saucedo ^{a,1}, Federico del Rio-Portilla ^{a,1}, Cristiana Picco ^b, Georgina Estrada ^c, Gianfranco Prestipino ^b, Lourival D. Possani ^c, Muriel Delepierre ^d, Gerardo Corzo ^{c,*}

^a Instituto de Química, Departamento de Química de Biomacromoléculas, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Ciudad Universitaria, D.F., 04510, México

^b Istituto di Biofisica, CNR, Via De Marini 6, 16149, Genova, Italy

^c Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Apartado Postal 510–3, Cuernavaca Morelos, 62210, México

^d Institut Pasteur, Unité de RMN des Biomolécules, CNRS URA 2185, 25 rue du Dr. Roux, 75724, PARIS Cedex 15, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 October 2011

Received in revised form 22 December 2011

Accepted 3 January 2012

Available online 11 January 2012

Keywords:

Centruroides suffusus suffusus

Disulfide bridge

Na_v1.5

NMR

Scorpion toxin

Recombinant expression

ABSTRACT

The three-dimensional structures of the long-chain mammalian scorpion β -toxin Cssl from *Centruroides suffusus suffusus* and of its recombinant form, HisCssl, were determined by NMR. The neurotoxin Cssl (nCssl) is a 66 amino acid long peptide with four disulfide bridges; it is the most abundant and deadly toxin from the venom of this scorpion. Both native and recombinant Cssl structures were determined by nuclear magnetic resonance using a total of 828 sequential distance constraints derived from the volume integration of the cross peaks observed in 2D NOESY spectra. Both nCssl and HisCssl structures display a mixed α/β fold stabilized by four disulfide bridges formed between pairs of cysteines: C1–C8, C2–C5, C3–C6, and C4–C7 (the numbers indicate the relative positions of the cysteine residues in the primary structure), with a distortion induced by two cis-prolines in its C-terminal part. The native Cssl electrostatic surface was compared to both the recombinant one and to the Cn2 toxin, from the scorpion *Centruroides novius*, which is also toxic to mammals. Structural features such N- and C-terminal differences could influence toxin specificity and affinity towards isoforms of different sub-types of Na_v channels.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Long-chain mammalian scorpion toxins affect ion permeability of excitable cells, where their main target is the voltage-gated sodium channel (Na_v) [1]. Na_vs are some of the most important receptors of the peripheral and central nervous system. Consequently, the sting of a scorpion containing these types of scorpion toxins in its venom could cause severe human intoxication due to primary and secondary systemic events, which might be fatal [2–4].

All known long-chain mammalian scorpion specific for Na_v are composed of 59 to 70 amino acid residues, generally stabilized by four disulfide bridges, and they have a highly conserved scaffold formed by an α -helix and a three-stranded β -sheet structure (reviews in: Possani et al., 1999; [4,5]). Among long-chain mammalian scorpion toxins, the β -type scorpion toxins are mainly found in the venom of the New World scorpions. Two genera are medically important: *Centruroides* in North America and *Tityus* in South America. As a matter of fact, individual species of the genus *Centruroides* are responsible for more than 250,000 intoxication accidents per year in Mexico and USA [6]. Among several toxins from the venoms of scorpions of the genus *Centruroides*, Cssl is one of the most important. It was isolated from the scorpion *Centruroides suffusus suffusus* (abbreviated *C.s. suffusus*) originally described by Martín et al. [7]. It belongs to the classification of β -type scorpion neurotoxins (here abbreviated β -ScTx) [8,9]. The main effect of Cssl and other β -ScTx is to allow the opening of Na_v channels at more negative potentials than the normal conditions, in opposition to the α -scorpion toxins (α -ScTx), found in the venoms of the Old World scorpions, that prolong the action potential by maintaining the channels open for longer time [10,11].

Abbreviations: TFA, trifluoroacetic acid; ESI, electrospray ionization; *C.s. suffusus*, *Centruroides suffusus suffusus*; HPLC, high performance liquid chromatography; rmsd, root mean standard deviation

[☆] The atomic coordinates of the family of twenty conformers of Cssl and HisCssl have been deposited in the Protein Data Bank as entry 2LJ7 and 2LJM, respectively, and the proton chemical shifts have been deposited in the BioMagResBank under the accession numbers 17882 and 17949, respectively.

* Corresponding author at: Instituto de Biotecnología, UNAM, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos, 62210, México. Tel.: +52 777 317 1209; fax: +52 777 317 2388. E-mail address: corzo@bi.ana.mx (G. Corzo).

¹ These authors contributed equally to this study.

There are several important reasons supporting studies aimed at expressing correctly folded toxic peptides by means of recombinant DNA techniques. One of them is to generate adequate immunogens for anti-venom production. Previously, it has been found that uncorrectly folded recombinant scorpion toxins leads to the generation of antibodies that cannot neutralize the activity of the native toxin. In other words, uncorrectly folded scorpion toxins do not present essential epitopes as those found in native scorpion toxins [12–14]. As mentioned above, human scorpion envenomation can be fatal. The production of neutralizing anti-venoms in experimental animals, by means of immunization procedures that relies on well folded recombinant toxins might be an alternative way for obtaining protective antibodies against specific toxins of arachnids [15]. In addition, well-folded scorpion toxins produced either by chemical synthesis or DNA recombinant techniques, certainly would substitute for the collection and use of thousands of scorpions alive, as it is currently done. In their natural environment scorpions play an important ecological role, mainly as predators of plagues in agricultural fields. Also, it is known that scorpion toxins affect with different affinities several subtypes of mammalian Navs; therefore, a recombinant system that produces a well-folded recombinant scorpion toxin and scorpion toxin variants would be important for conducting studies related to structure and functions of such peptides.

At this time, only the three-dimensional structure of two mammalian β -ScTx have been solved, Cn2 from *Centruroides noxius* and Ts1 from *Tityus semulatus* [16,17]; therefore, it is desirable to obtain more information on the three-dimensional structure (3D) of this kind of peptides. The knowledge of the 3D structure of other such toxins will certainly facilitate the understanding of the molecular interactions with Na_v channels. It will help examining the charge distribution, and the spatial arrangement of certain residues capable of interacting specifically with a complementary surface on the Na_v receptors. It is important not only for the understanding of the structure–function relationships of these β -ScTx with Na_v channels, but also for the possible development of therapeutic antibodies for clinical treatment for scorpion envenomations.

Thus far, the source used for 3D studies of long-chain scorpion toxins has been obtained from the venom of hundreds of specimens, which represents a difficult task. First, for the capture of scorpions alive needed in great numbers and then due to the several chromatographic steps required to obtain pure toxins [18–20]. In addition to this natural source of toxins, the heterologous expression of the genes coding for these peptides is an interesting alternative, as it offers the possibility of obtaining a relative high amount of peptides for research and for structural analysis. Additionally, heterologous expression of long-chain scorpion toxins provide the capability of producing mutants by replacing amino acid residues on the primary structure and consequently by producing toxin variants to understand the specific role of certain amino acids on the surface of a particular scorpion toxin [21–24]. However, the heterologous expression of these cysteine-rich peptides presents some problems for both the correct folding and disulfide pairing of the cysteine residues. For this reason it is important to gather examples where it can be demonstrated that the heterologously expressed recombinant peptides are structurally and functionally indistinguishable from its natural counterpart.

Because our research group is interested in studying the structure–function relationships of Na_v scorpion toxins [13,16,25–28], here we report for the first time the solution structure of both the native mammalian β -ScTx (CsslI from *Cs. suffusus*) and its recombinant form HlsrCsslI toxin (same amino acid sequence with a histidine tail to facilitate purification). Therefore, the present communication discusses the ¹H-NMR 3D solution structure of these two molecules, which permitted to confirm that the recombinant protein has similar structural features to the native CsslI. It also permitted to conduct structural comparison to similar mammalian β -ScTx and to

demonstrate that it is possible to produce active long-chain scorpion toxin variants, by heterologous expression.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains, enzymes and plasmids

E. coli DH5- α was used for plasmid propagation. The *E. coli* strain BL21(DE3) was used for the expression of the toxin-containing proteins. Plasmids pBluescript KS (+) (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands) and pQE30 (Qiagen Mexico, Mexico) were used respectively for cloning and production of the fused proteins with a 6His-tag. Restriction enzymes, *Vent* polymerase, Factor Xa protease and T4 DNA ligase were purchased from New England Biolabs (MA, USA).

2.2. Plasmid construction with CsslI

The gene encoding for CsslI was cloned into the expression vector pQE-30, which upon expression, could produce a hybrid protein containing a 6His-tag followed by the Factor Xa protease cleavage site and the mature toxin (HlsrCsslI). This construction was prepared for the production of a polypeptide named HlsrCsslI. The pQE30-toxin plasmid (pQE30XaCsslI) was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) individually, and the expressions were induced with isopropyl-beta-D-thiogalactoside (IPTG). The nucleotide sequence of the gene used and the recombinant protein extraction and purification were performed as reported earlier [12].

2.3. Separation procedures of nCsslI, HlsrCsslI and rCsslI

For native CsslI, the procedure earlier described by our group was used (Espino-Solis et al., 2011). In short, ten milligrams of soluble venom of *Cs. suffusus* were re-suspended in 0.1% aqueous TFA, and the insoluble materials were removed by centrifugation at 14,000 g for 5 min. The supernatant or soluble venom was used directly for HPLC separation, using a Waters system (NJ, USA). The diluted venom was fractionated using a reverse-phase semipreparative C₁₈ column (5C₁₈MS, 10 × 250 mm Nacal Tesque Japan) equilibrated in 0.1% TFA, and eluted with a linear gradient of acetonitrile from 0 to 60% in 0.1% TFA, run for 60 min at a flow rate of 2 ml/min. Effluent absorbance was monitored at 280 nm. Fractions were collected and dried on a Speed Vac, model SC110 apparatus (Savant Instruments, Farmingdale, NY, USA).

For HlsrCsslI, *E. coli* strain BL21 cells expressing the plasmid pQE30XaCsslI were harvested by centrifugation (4000 g for 20 min) using a Beckman centrifuges model J2-21, recovered in washing buffer (20 mM Tris–HCl, pH 8.0) and lysed with a French pressurizing device (900 psi). The recombinant toxin was extracted from the inclusion bodies using 6 M guanidinium chloride (GndHCl) in a 0.05 M TRIS–base buffer at pH 8.0 and centrifuged for 4000 g for 40 min in a refrigerated centrifuge (Hettich Universal 32R, Ramsey, MI, USA). The supernatant was purified by affinity column. Purification of the HlsrCsslI by Ni–NTA (Ni–nitrilotriacetic acid) affinity column chromatography was performed according to the instructions of the manufacturer (Qiagen Mexico, Mexico) using denaturing conditions with buffer A (6 M GndHCl in a 0.05 M TRIS–base buffer, pH 8.0) and buffer B (6 M GndHCl in 0.05 M TRIS–base buffer, containing 400 mM imidazole, pH 8.0). The HlsrCsslI product was reduced using 50 mM dithiothreitol (DTT) in buffer B, and it was separated by a second purification step under reverse-phase HPLC. The recombinant product was allowed to fold under controlled conditions using 2 M GndHCl in 0.05 M TRIS–base buffer, pH 8.0, containing 1 mM reduced glutathione (GSH)/0.1 mM oxidized glutathione (GSSG). The folded HlsrCsslI was cleaved using FXa under the conditions reported earlier [12]. The fractions containing the native CsslI or the folded rCsslI and HlsrCsslI were further purified by cation-exchange chromatography

on a TSK-gel sulfopropyl column (SP-5PW, 4.6 × 75 mm, Tosoh, Japan). The fractions were diluted to 200 μl with 20 mM ammonium acetate in 1 M acetic acid pH 2.9 and were separated using a first linear gradient from 10 to 50% of solution B in 40 min (1% B/min), and then a second gradient from 50 to 100% of B in 10 min, at a flow rate of 1.5 ml/min. Absorbance was monitored at 280 nm. The solution A was 1 M acetic acid (pH 2.9) and solution B was 1 M acetic acid in 2 M ammonium acetate (pH 5.9). A final purification step was performed using a C₁₈ reverse-phase column (4.6 × 250 mm, Nacal Tesque, Japan) equilibrated in 0.1% TFA, and eluted with a linear gradient of acetonitrile from 20 to 60% in 0.1% TFA, run for 60 min at a flow rate of 1 ml/min. Effluent absorbance was monitored at 280 nm. The mass identity of nC₅II, rC₅II and H₁rC₅II was confirmed by ESI-MS using a Finnigan LCQ²⁰⁰ ion trap mass spectrometer (San José, CA, USA).

The content of the native C₅II peptide within the soluble venom was approximately 2.6%; therefore, after all chromatographic steps (semipreparative reverse phase, cation-exchange and analytical reverse phase) from 80 to 100 mg of soluble venom were needed to obtain 2 mg of pure (>95%) native scorpion toxin for NMR experiments. Similarly, in a typical experiment, starting with 1 l of cell culture, the amount of recombinant H₁rC₅II obtained was 14 mg protein. After the DTT reduction (9 mg), *in vitro* folding (3 mg), cleavage with factor Xa and chromatographic purification steps, the amount of rC₅II obtained was 0.8 mg/l. Therefore, after all three chromatographic steps 2 l of bacterial culture were enough to obtain 2.2 mg of pure (>95%) recombinant H₁rC₅II scorpion toxin for NMR experiments.

2.4. Electrophysiology

2.4.1. Heterologous expression of sodium channel

Chinese hamster ovary (CHO) cells were grown in standard normal medium. Cells were transfected with the expression vector pcDNA3, containing the full-length cDNA coding for the human Na_v1.5 sodium channel, using the Effectene Transfection Kit (QIAGEN). For transfection, 2 μg of Na_v1.5 pcDNA and 25 μl of Effectene were used. Cells were co-transfected with pc-CD8 and the success of transfection was tested using CD-antigen coated microspheres (DynaBeads Dynal, Invitrogen, USA). Transient expression was tested electrophysiologically between 48 and 72 h after the transfection. Only cells that showed the expression of CD8 receptor by capturing the CD8-antigen covered microspheres were used for electrophysiological experiments.

2.4.2. Electrophysiological measurements

Sodium currents were measured with the patch-clamp technique in the whole cell configuration [29] using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). Borosilicate glass micropipettes were fired polished to a tip diameter yielding a resistance from 1.8 to 2.5 MΩ in working solution. The pipette was filled with (in mM): 10 NaF, 110 CsF, 20 CsCl, 2 EGTA, 10 HEPES buffer at pH 7.3. The external solution had the following composition (in mM): 145 NaCl, 4 KCl, 1 MgCl₂, 1.8 CaCl₂, 15 TEA, 10 HEPES at pH 7.3. The use of intracellular Cs⁺ and intra- and extracellular TEA⁺ abolished most of the endogenous potassium currents. The output of the patch-clamp amplifier was filtered by the low-pass 4-pole Bessel filter with a cut-off frequency of 5 kHz and sampled to 20 kHz. The membrane-patch was kept at a holding potential of −120 mV. Pulse stimulation and data acquisition used 16 bit D-A and A-D converters (NI PCI-6221, National Instruments, Austin, TX, USA) controlled by a personal computer with a custom acquisition program (Gepulse, Italy). The linear responses were partially compensated analogically, and digitally subtracted with a standard P/4 protocol. The access resistance was always less than 7 MΩ and the cell membrane capacitance and the series-resistance were carefully compensated (between 80 and 95%). All measurements were done at room

temperature 21 ± 1 °C. When toxins were used, aliquots of stock solutions were mixed with the extracellular working solution to obtain the desired concentration before each experiment. Data were analyzed using the Gepulse program with a custom software developed in the Igor platform (WaveMetrics, Portland, OR, USA). Conductance–voltage relationships were computed using the equation: $G = I / (V - V_{rev})$, where G is the conductance, I the current amplitude; V the test pulse and V_{rev} the Na⁺ reversal potential. Normalized conductance–voltage curves for voltage dependence of steady-state activation and inactivation were fitted to a Boltzmann function of the form $G = G_{max} / (1 + \exp[(V - V_{1/2})/k])$ where G_{max} is the maximal conductance, $V_{1/2}$ is the voltage at which the current is half activated/inactivated and k is the slope factor of voltage sensitivity. The results are expressed as mean values ± SEM.

2.5. ¹H NMR experiments

NMR experiments were recorded on an Inova 600 (Varian, Palo Alto, CA, USA) spectrometer with a 14.1 Tesla magnetic field. The spectrometer was equipped with a cryogenically cooled triple resonance ¹H[¹³C/¹⁵N] probe. Spectra were recorded, processed and analyzed using Vnmr 6.1C (Varian, Palo Alto, CA, USA), and NMRView 5.2 [30]. The lyophilized native and recombinant toxin, 2 and 2.2 mg, respectively, were dissolved each in 150 μl of H₂O/D₂O, 9:1 (v/v), (Euro-iso-Top, Saclay, France) representing the required volume for 3 mm Shigemi NMR tubes (Shigemi, Allison Park, PA, USA). The toxin concentration was approximately 1.9 mM in both H₂O and D₂O, and the solution pH was adjusted at 3.5. Experiments were run at 308 °K with a 7812 Hz sweep width. Spectra were calibrated on the residual water signal at 4.65 ppm relative to 3-trimethylsilyl-(2,2,3,3-2H₄) propionate (TMS⁺) as external reference. The 2D proton NMR spectra were collected in the phase sensitive mode [31] with 4K data points in the t₂ dimension and 512 t₁ increments, with typically 16–32 scans per increment. Zero-filling was applied prior to Fourier transformation and data were processed with shifted sine bell window functions in both dimensions. The 2D NMR experiments used for the identification of spin systems have the following pulse sequences; (a) total correlation spectroscopy or Clean TOCSY [32] recorded using a MLEV-17 pulse scheme with 100 ms and 60 ms isotropic mixing period [33,34], (b) two dimensional Double-Quantum Spectroscopy [35,36], (c) double-quantum filtered COSY spectra and NOESY [31]. NOESY spectra were acquired at 308 K in H₂O/D₂O, 9:1 (v/v) with mixing times of 100, 150 and 200 ms. The strong signal from the solvent (HDO and H₂O) was suppressed either by presaturation during the recycle delay or by means of double pulsed field gradient spin echo (DPFGSE) in the NOESY experiment [37,38]. All NMR data experiments were transformed using NMRpipe [39] using two times the number of points for zero filling and a cosine function for weighting. Assignment of signals to peptide protons was achieved by the standard method developed by Wüthrich and coworkers [40] using the CARA.1 software together with the XEASY module [41].

2.6. Structure calculation

All distance constraints were obtained from NOESY spectra in H₂O with a mixing time of 100 ms to avoid spin diffusion effects. After manually peak picking, all NOE intensities were evaluated using the semi-automated CYANA module [42]. Structure calculations were performed using the CYANA2.1 software using distance and torsion angle restriction. Disulfide bridge restrictions were used accordingly with earlier biochemical data and physiological results. C-terminal residue was treated to include its amidation. Structure calculations were run on a homemade AMD workstation under Linux environment using the standard protocol of the CYANA2.1 program. A total of 200 structures were calculated using the torsion angle dynamics protocol. The structures were sorted according to the lowest final

value of the target function; the procedure was repeated automatically as previous reported [43] and the best 20 structures were used for further refinement using molecular dynamics with an explicit solvent model performed with AMBER suite [44]. All dynamics simulations and energy minimizations described below were carried out with the topology and parameters of AMBER-99SB force field [45].

3. Results

3.1. Purification of native and recombinant CssiI

Purification of native CssiI from the soluble venom of *C.s. suffusus* was performed as mentioned [20]. In order to obtain the amount of 2 mg of purified native CssiI (nCssiI) used for the 3D structure determination, approximately 600 scorpions were milked for venom. Concerning the recombinant HisrCssiI, in representative experiments, the recombinant peptide was obtained in inclusion bodies (Fig. 1A) and starting from 1 l of cell culture, the overall yield of HisrCssiI was from 10 to 15 mg. After affinity chromatography separation, the purified recombinant peptide was first reduced using DTT (0.06 mg, 40 μ mol), and then, folded in vitro conditions according to Estrada et al. [12]. Therefore, only two to three liters of an *E. coli* strain BL21 culture medium expressing the recombinant toxin HisrCssiI was sufficient for obtaining enough material (2.2 mg) for determination of the 3D structure. Fig. 1B (dashed line) shows the elution profile of nCssiI using cation-exchange chromatography. The same figure (continuous line) shows the HisrCssiI component and the product of its digestion with enzyme (Factor Xa) providing a completely homogeneous peptide rCssiI. The chromatographic profile separation by cation-exchange chromatography shows that the recombinant rCssiI (without the 6 His tail and without the FXa cleavage site) peptide

elutes earlier than the native peptide CssiI because the C-terminal residue of the native toxin is amidated, whereas that of the recombinant peptide has a free carboxylic acid; therefore, the nCssiI is retained for a longer time into the column. The His-tag recombinant peptide (HisrCssiI) elutes at the end of the gradient, due to the Histidine tail. Finally, the native and recombinant peptides were desalted and purified by reverse phase. Fig. 1C shows the final purification of HisrCssiI. The molecular masses of the three peptides were confirmed by mass spectrometry analysis using a Finnigan LCQTM ion trap mass spectrometer (San Jose, CA, USA) and found to be as expected (Table 1). Since the recombinant HisrCssiI toxin is the parent peptide of the recombinant rCssiI, only HisrCssiI and the native CssiI were used for NMR experiments. All three peptides were shown to be toxic to mice when injected intracranially, but with different potencies as described by Estrada et al. [12].

3.2. In vitro biological activity of nCssiI and rCssiI

About 50% of the cells transfected with the Na_v1.5 isoform expressed high-density sodium currents. These cells exhibited large, rapidly activating voltage dependent inward sodium currents (typical peak current amplitude ranges 1–4 nA) in response to depolarizing test potentials (Fig. 2A–B). Endogenous inward currents larger than 0.2 nA were never observed in non transfected cells. Both recombinant and native CssiI scorpion toxin were tested in transfected CHO cells. External addition of 33 nM of native and recombinant CssiI toxins is shown in Fig. 2C and 2D. Compared with control conditions, both toxins nCssiI and rCssiI strongly decrease peak currents leaving unchanged the activation kinetics (Fig. 2E). The inactivation kinetics also remains unchanged; however, there was only a small negligible voltage shift induced by rCssiI toxin at positive potentials (Fig. 2F).

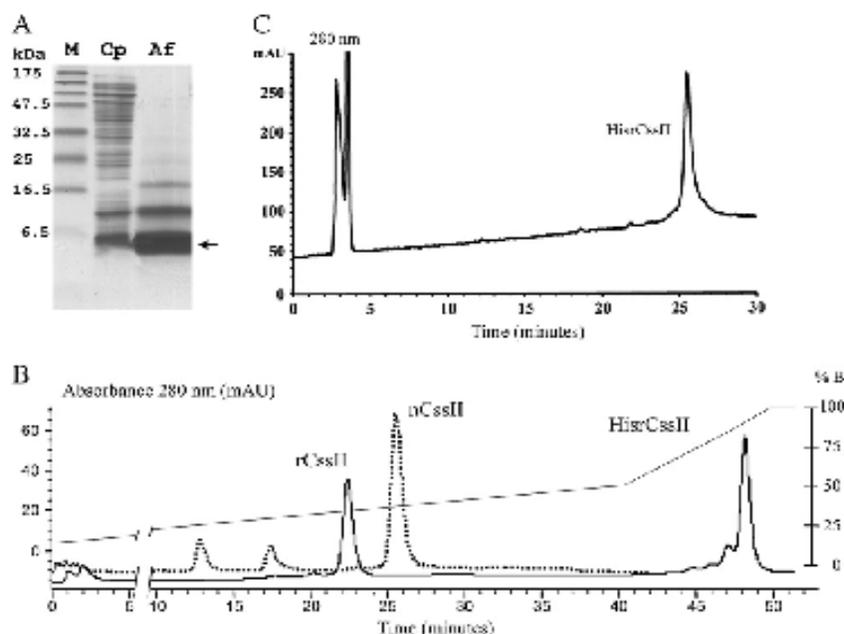


Fig. 1. Expression and purification of recombinant CssiI. A. SDS-PAGE showing the expression of HisrCssiI. Lane M shows the molecular weight markers, lane Cp shows the cellular profile of proteins after induction, and lane Af shows the recombinant protein after the purification by affinity chromatography. The protein band, corresponding to HisrCssiI, is indicated by an arrow. Higher molecular weight bands were shown to be polymeric forms of the HisrCssiI peptide. The content of protein applied in lane Cp was approximately 5 μ g. B. Cation-exchange chromatography separation of nCssiI (50 μ g), rCssiI (30 μ g) and HisrCssiI (50 μ g). Two cation-exchange chromatograms are overlaid under similar chromatographic conditions. The overlaid traces correspond to nCssiI (dashed line) and to rCssiI and HisrCssiI (continuous line). The linear gradient corresponds to a first gradient from 10 to 50% of B in 40 min, and then to a second gradient from 50 to 100% of B in 30 min, at a flow rate of 1.5 ml/min. C. Reverse phase chromatography of HisrCssiI from the previous step of cation-exchange chromatography (for details chromatographic conditions see the section of Separation procedures of nCssiI, HisrCssiI and rCssiI).

Table 1

Amino acid sequence of native Cssl, HisrCssl and rCssl.

Peptide	Amino acid sequence	MW _{calc} (Da)	MW _{exp} (Da)
nCssl	K E G V L V S K S T G C K Y R C L K L G D R D Y C L R E C R Q Q V G K S S G G Y C Y A F A C W C T H L Y E Q A V V W F L F M K T C N ^a	7537.6	7537.0
HisrCssl	M R G S H H H H H R G S I E G R K - - - - - C - - - - - C - - - - - C - - - - - C - - - - - C - - - - - C H	9392.6	9392.4
rCssl	K - - - - - C - - - - - C - - - - - C - - - - - C - - - - - C - - - - - C H	7538.6	7538.4

^aMeans that the C-terminal is amidated (CONH₂).

-Means that they have the same residue.

The sensitivity of Na_v1.5 channel to nCssl and rCssl toxins is shown in Fig. 3A and B, respectively, at different toxin concentrations. Currents were elicited by depolarizing pulses at -20 mV from a holding potential of -120 mV. The time course of the current decrement after the application of the toxins is shown in Fig. 3C. Sodium currents were elicited every 2 s by depolarizing pulses of 20 ms to a test potential of -20 mV in presence of nCssl and rCssl peptides. Peak sodium currents immediately decreased and stabilized in few seconds. After washout the currents recovered almost completely in less than 1 min. Fig. 3D shows the dose-response curve for both nCssl and rCssl toxins on Na_v1.5. The affinities of the two toxins for Na_v1.5 were almost identical with an IC₅₀ of 35 ± 3 nM for the native and of 40 ± 3 nM for the recombinant toxin, and the Hill coefficient = 1 is consistent with a 1:1 toxin binding to the channel.

3.3. NMR assignments and 3D structure of Cssl

Previous Cn2 assignments were used as a template to help the assignments of nCssl due to the close sequence identity (89%) between these two neurotoxins. Most of the atom chemical shifts of both HisrCssl and nCssl did not changed significantly. Additionally, well-dispersed resonance allowed identifying 65 spin systems in the nCssl, where only the first residue was missing (Fig. 4). For nCssl, 90% of assignment completeness was obtained for all amino acid residues, and CYANA structure calculations were performed using 828 distance constraints of which 479 were of short range ($|i-j| \leq 1$), 97 were medium range ($1 < |i-j| < 5$) and 252 were long-range ($|i-j| \geq 5$), also four disulfide bridge restrains between C1–C8, C2–C5, C3–C6, and C4–C7 cysteine pairs were included (the numbers indicate the relative

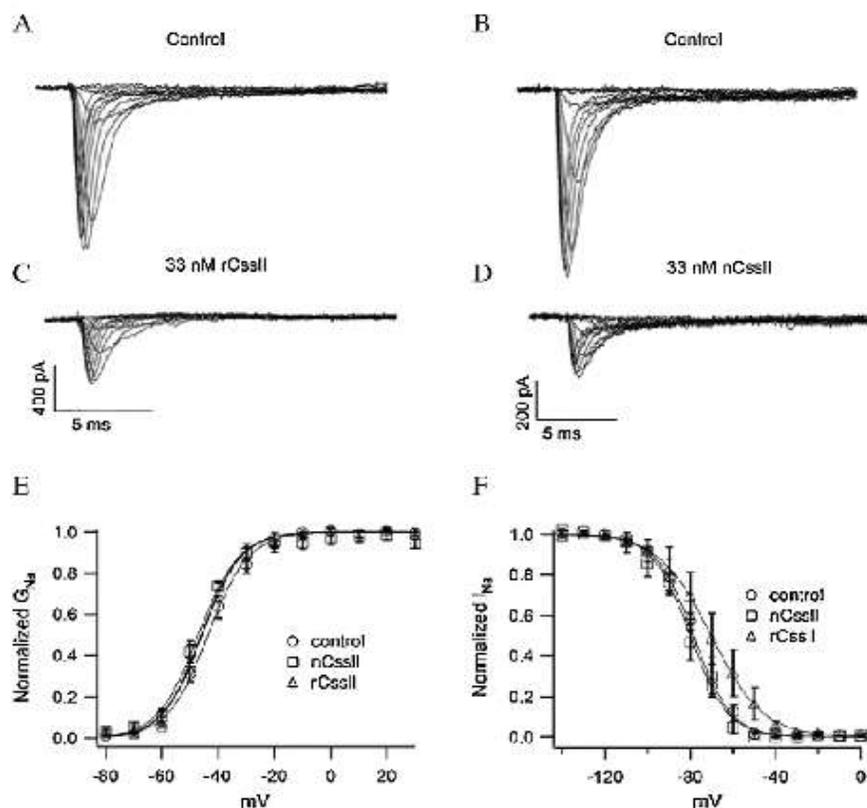


Fig. 2. Effects of nCssl and rCssl toxins on GHo cells expressing Na_v1.5 currents. Figures A and B show families of currents in response to step depolarization of 10 mV from -60 to 50 mV from a holding potential of -120 mV. Figures C and D show sodium currents after external addition of 33 nM of nCssl and rCssl, which strongly decrease peak currents leaving unchanged the activation kinetics (n = 6) (E) and the inactivation kinetics (n = 4) (F), respectively. Steady-state inactivations were obtained using a standard double-pulse protocol in control and in the presence of nCssl and rCssl (n = 4). Activation conductance and steady-state inactivation were fitted to standard Boltzmann functions. Half-maximal activation V_{1/2} occurred at -47.3 ± 0.4 mV for control, at -44.6 ± 0.5 mV for nCssl and -45.1 ± 0.5 for rCssl. Half maximal inactivation was reached at -78 ± 0.4 mV for control, at -80.0 ± 0.3 mV for nCssl and -72.1 ± 0.8 for rCssl.

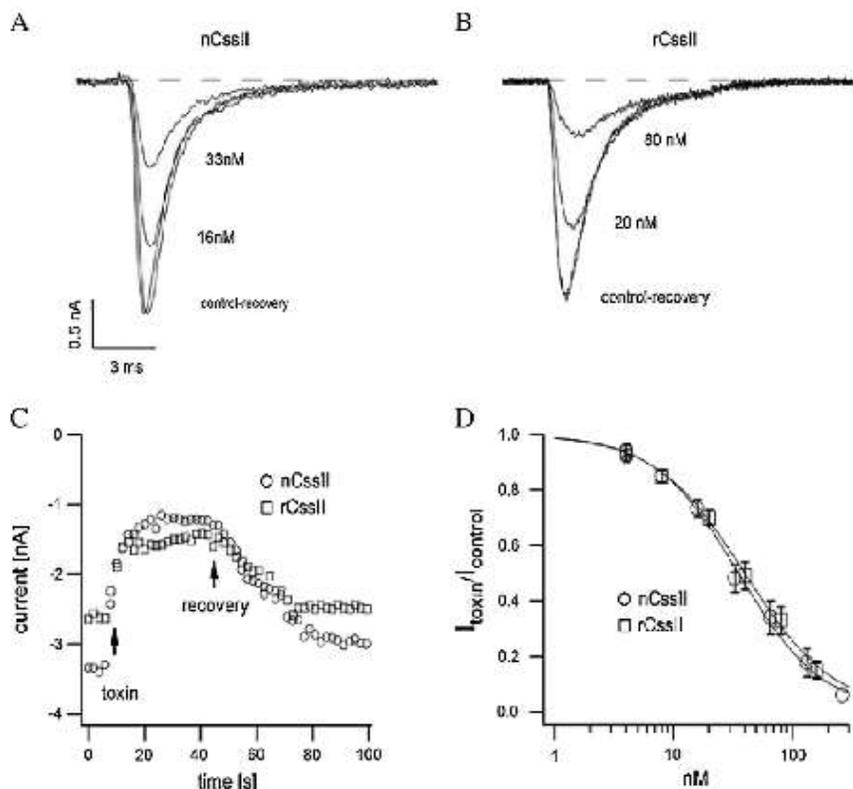


Fig. 3. Sensitivity of $\text{Na}_v1.5$ channel to nCssl and rCssl scorpion toxins. Figures A and B show the effect of different concentrations of nCssl and rCssl on $\text{Na}_v1.5$ currents. Currents were elicited by depolarizing pulses at -20 mV from a holding potential of -120 mV in presence of 16 and 33 nM of nCssl and in presence of 20 and 80 nM of rCssl toxins. Figure C shows the time course responses and current recoveries after washout of nCssl (\circ , 40 nM) and rCssl (\square , 20 nM). Data represent the peak currents elicited every 2 s by depolarizing pulses of 20 ms to a test potential of -20 mV and they were plotted vs time. The arrows indicate the application and the washout of the toxin. Figure D shows dose-response curves for both nCssl and rCssl scorpion toxins, on $\text{Na}_v1.5$ channels. The solid lines were the best fit of the data by the equation: $(I_{\text{toxin}}/I_{\text{control}}) = 1/(1 + I_{C_{50}}/C)$, where $I_{C_{50}}$ is the toxin concentration, which inhibits half of the maximal control current. The affinities of the two toxins for $\text{Na}_v1.5$ gave an $I_{C_{50}}$ of 35 ± 3 nM for nCssl and of 40 ± 3 nM for rCssl ($n \geq 4$).

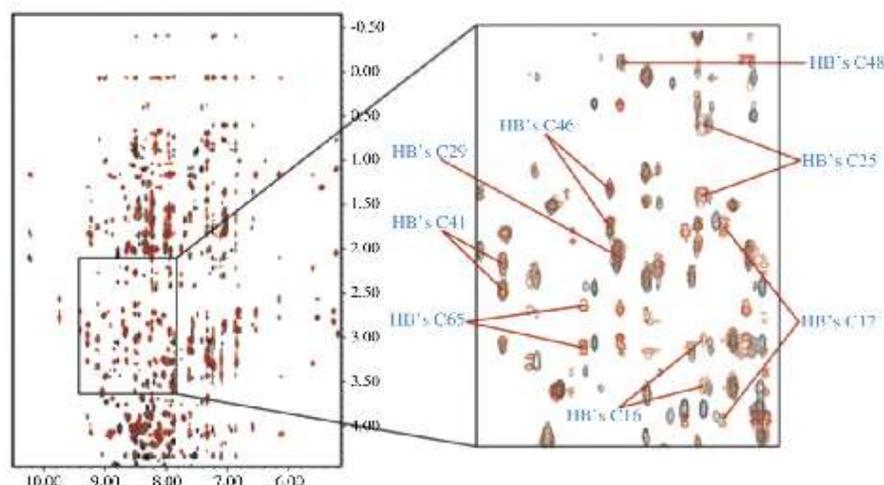


Fig. 4. NOESY spectra comparison between nCssl and HisCssl. The NOESY spectra of nCssl (red) and HisCssl (black) are superimposed showing their amide and aliphatic regions. A zoom of all eight cysteines assignments is shown. It can be observed that the cysteine positions are almost identical and no significant changes are observed. The residues C12, C16, C25, C29, C41, C46, C48 and C65 correspond to the disulfide pairing C1–C8, C2–C5, C3–C6, and C4–C7 (the numbers indicate the relative positions of the cysteine residues in the primary structure). The dimensional units of the x and y-axis are in ppm.

Table 2
Structural statistics for the 20 best structures of nCsslI and HisrCsslI.

Upper distance limits	nCsslI	HisrCsslI
Total	828	867
Short range	479	532
Medium range	97	108
Long range	252	227
rmsd range	2–65	17–81 (2–65)
Average backbone	0.69	1.06
Average heavy atom	1.26	1.65

Distance bounds	nCsslI		HisrCsslI	
	NOE signals	NOE %	NOE signals	NOE %
≤2.99 Å	91	11.0	83	9.6
3.00–3.99 Å	268	32.4	306	35.3
4.00–4.99 Å	189	22.8	239	27.6
5.00–5.99 Å	280	33.8	239	27.6
≥6.00 Å	0	0	0	0
Total	828	100	867	100

positions of the cysteine residues in the primary structure). A similar procedure was followed for HisrCsslI using 867 total distance constraints of which 532 were of short range ($|i-j| < 1$), 108 were medium range ($1 < |i-j| < 5$) and 227 were long-range ($|i-j| > 5$). Structural statistics for the 20 best structures calculated for both structures are reported in Table 2. Fig. 5 shows the diagrams of the constraints used to calculate the 3D structure of nCsslI and HisrCsslI. Both HisrCsslI and nCsslI structures were determined using a similar number of constraints despite the fact that HisrCsslI has 16 residues extra in the N-term region. CYANA output assemble of both molecules were used for explicit water refinement using the AMBER suite.

However, only the native molecule obtained convergent results, presumably the lack of constrains in the N-terminal region of HisrCsslI disrupted the algorithm calculations. The selected structures were visualized using MOLMOL [46]. The superposition of the 20 best structures is plotted in Fig. 6A, and the ribbon diagram of the best structure, with minimum energy and best fit is shown in Fig. 6B. The quality of both nCsslI and HisrCsslI structures were assessed using the PROCHECK-NMR utility [47] and MOLMOL. The secondary structure regions were defined as follows: strand 1, residues 2–4; strand 2, residues 38–42; strand 3, residues 45–51; and α -helix, residues 23–33. These regions define a scaffold of a α/β toxin as expected for similar long-chain mammalian β -scorpion toxins [16]. The global rmsd over all residues for refined nCsslI (2–65) using Amber was 1.52 Å for backbone atoms and 2.23 Å for all heavy atoms; the values calculated over secondary structure elements (residues 2–4, 23–33, 38–42, 45–51) were 1.11 Å and 1.83 Å for backbone and heavy atoms, respectively. The region between residues 34–39 was also well defined. Comparing the CYANA structure of the nCsslI with that of HisrCsslI, they showed small differences. The global rmsd of CYANA structures of rCsslI and HisrCsslI over all structured residues (2–65) was 0.69 and 0.87 Å for the backbone atoms and 1.29 and 1.44 Å for all heavy atoms, respectively. The HisrCsslI results are significantly equivalent in comparison to that of the native toxin. Therefore, it was possible to find for both molecules nOe's between the corresponding Cys residues (Fig. 4); that is, Cys3 HB₃ with Cys6 HB₂ and Cys6 HB₃ with Cys3 H α confirming the C3–C6 connectivity (the numbers indicate the relative positions of the cysteine residues in the primary structure). Also for both molecules, nOe's were found between Cys4 HB₂ with Cys7 HB₂. All these nOe's together with very small chemical shift differences support the fact that the native and the recombinant CsslI have similar fold and disulfide bridge pattern.

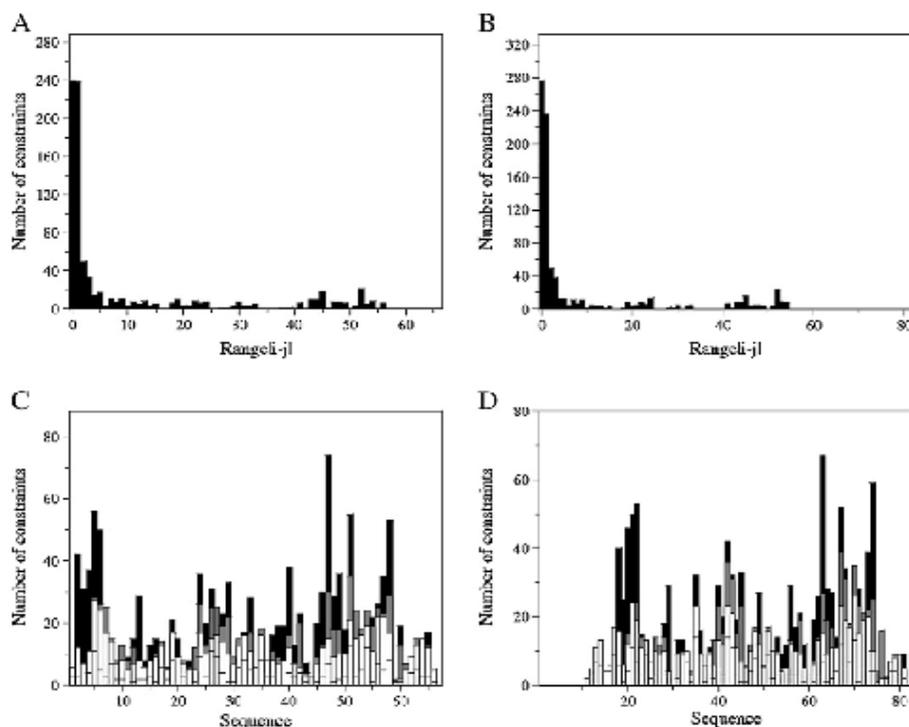


Fig. 5. NMR constraints for nCsslI and for HisrCsslI. The figures show the number of constraints per range for nCsslI (A) and for HisrCsslI (B), and number of constraints per residue for nCsslI (C) and for HisrCsslI (D).

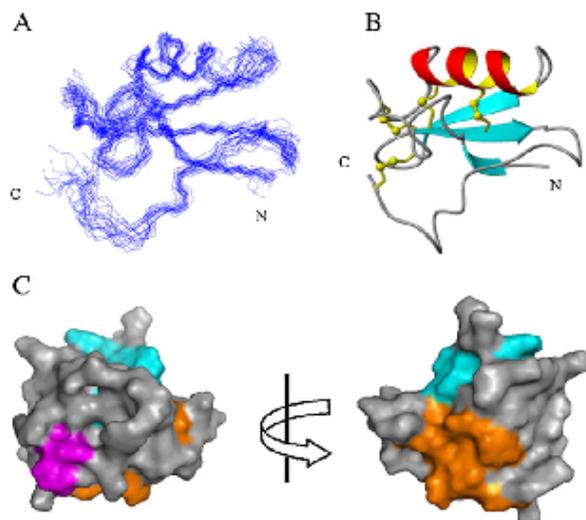


Fig. 6. NMR solution structure and hydrophobic patches of nCsslA) Ribbon diagram of the best 20 structures. B) Ribbon diagram of minimum energy and best fit. N and C stands for N- and C-terminal, respectively showing the α/β scaffold. C) The three main hydrophobic patches in Cssl are shown in orange, cyan and magenta.

Small differences found in both structure calculation were attributed to the extra 16 residues tail at the N termini.

Finally, the nCssl tridimensional structure exhibits three hydrophobic patches involving one third of all toxin residues. The first one is quite interesting because it contains a high number of aromatic residues, which includes: Y4, L19, Y40, Y42, A43, F44, A45, W47, W58 and L60, and it is located in the β -sheet face opposite to the α -helix. However, it also shows a highly buried region around W47 (Fig. 6C orange). The second hydrophobic patch is formed by L5, V6, Y33, L51, Y52, A55, V56, and V57, and it is located in the region between the α -helix and the β -sheet (Fig. 6C cyan). The loop next to the beginning of the α -helix has a hydrophobic patch formed by L17, L19 and Y24; nevertheless this region (17–21) also shows a high solvent accessibility (Fig. 6C magenta). Since one of the general hypothesis for protein folding implies the hydrophobic collapse, which is a relatively early event before formation of any secondary structure and it is referred to as a molten globule, which corresponds to a partially folded state of the protein [48], then, the hydrophobic core of Cssl may be important for correct folding. It could be interesting to find if any of the hydrophobic residues in the hydrophobic core of Cssl dictates the molecule folding. In addition, the hydrophobic core observed in Cssl is conserved in all beta scorpion toxins and it seems important for biological activity. According to Lee and MacKinnon (2004), polypeptide toxins that interact with voltage-sensitive cation channels are able to bind to phospholipid membranes, suggesting that these toxins could access the channel-binding site-4 of Nav that remains membrane-restricted [49]. Later the group of Blumenthal found that arachnid polypeptide toxins from *Thrixopelma* and *Centruroides* venoms, that access to the site 4 of Nav and modify activation, bind to phospholipid membranes suggesting that a hydrophobic region interact with the phospholipid membranes [50]. Besides, Cssl presents a larger patch exposed to solvent that includes residues Y4, L19, Y40, Y42, A43, F44, A45, W47, W58 and L60; four of them (Y40, Y42, F44, W58) being critical for toxin binding in the homologue toxin CsslV [21].

4. Discussion

This report describes structural features of the long-chain mammalian β -scorpion toxin Cssl from the soluble venom of the buthid scorpion *C. suffusus* and the recombinant forms HisrCssl and consequently the rCssl structure. The structural and functional information found on the native and the recombinantly produced peptide showed that HisrCssl is correctly folded and presents the right disulfide pairing as that of the native Cssl. In addition, the recombinant rCssl obtained from the parental HisrCssl structure has similar electrophysiological activity as that of the native Cssl on Na_v1.5 indicating indirectly that this cysteine-rich peptide was also folded properly.

One of the most important issues for heterologous expression of cysteine-rich proteins is to find the right in vitro folding conditions, in case the host cell does not produce the folded protein. The correct disulfide bridge formation of recombinant scorpion neurotoxins allows to conserve their secondary structures and to be biologically active. It is well known that the number of possible structural forms for a protein rich in cysteines increases with the number of disulfide bridges in the molecule; for example, the number of possible disulfide pairing forms for Cssl (4 cysteines), is 105 but only one biological active structural form exists in nature [7,12]. Therefore, NMR experiments are excellent techniques to investigate the correct disulfide pairing and secondary structure of cysteine-rich scorpion toxins. In this report, the NMR structure of HisrCssl was chosen to be determined instead of the rCssl because HisrCssl is the parental peptide of Cssl. That is, having the whole structure of HisrCssl the recombinant secondary structure and disulfide pairing of rCssl will be defined. In other words, we kill two birds with one stone. It was clearly shown that the cysteines C4, C5, C6 and C7 have identical chemical shifts for HN, Ha and HB's. Additionally, cysteines C1, C2, C3 and C8 chemical shifts were displaced less than 0.04 ppm, which are not significantly important for protein folding. For example, Cysteines C4 and C7 form a disulfide bridge and there are no chemical shift differences between the native and the recombinant toxin (Fig. 4). Consequently, the heterologous expressed Cssl conserves the same native cysteine scaffold, and besides the correct disulfide bridge formation, the secondary and three-dimensional structure is maintained. This structural data is supported by the fact that the Cssl expressed toxin is biologically effective as the native one (Figs. 2 and 3). The nCssl structure was calculated using 828 distance constraints, from which 479 were short, 97 were medium and 252 were long range. Although the best described region was the secondary structure with rmsd of 0.63 Å and 1.55 Å for the back bone and the whole molecule for Amber refined structure, respectively, the C-terminal domain was not well defined due to the absence of nOe's so this feature is important because the amidated C-terminal might play an important role in the biological activity of Cssl towards different isoforms of Nav.

Comparing β -scorpion neurotoxins, the native Cssl 3D structure is similar to the previous reported structure Cn2 (PDB:1CN2) and they belong to a medically important large family of long-chain mammalian toxins from the venom of the *Centruroides* genus. All these β -scorpion toxins conserve a high degree of similarity in their primary structure (Table 3). Comparing the NMR structures of Cn2 and Cssl it can be observed that they diverge in 9 out of 66 residues, which are differently positioned through their primary sequence. Just one residue could be considered a conservative substitution such I56V, because it maintains a similar hydrophobic character. Also, the substitutions GY for YG at positions 33 and 34 could be considered conservative because they maintain the same di-peptide chemistry in the structure. However, while substitutions such as G36S and A37S could be functionally important, more significant are the substitutions D7S and N9S on the N-terminal side, and the substitutions R64T and S66N on the C-terminal region of these two neurotoxins. Here, we should notice that these amino acid substitutions, at the

Table 3
Amino acid sequences of the main neurotoxins from species of the *Centruroides* genus.

Toxin ^a	Amino acid sequence ^b	Access ^c
CsII	1*****10*****20*****30*****40*****50*****60*****66 KEGYLVSRSTGCKYECLKLGDNDVCLRECKQVYKXS SGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWFLPKKTCN*	P08900
Cn2	-----D-N-----C-----C-----C-----G-Y-GA---C---C-C-----I-----RC S*	P01495
CII1	----I-NL---C---CY-----C-----C-----GA---C---GC-C-----K---CT*	P45666
CII2	-----NH---C---CF-----C-----C-----GA---C---GC-CN-----K---C-*	P59898
CII1	-----NL---C---CY-----C-----C-----GA---C---GC-C-----K---C-*	P59897
CII1	-----NH---C---CF-----C-----C-----GA---C---GC-C-----C-S*	P18926
Cn8	----I-NYY--C-FACA-----C---C---AR---GA---C---GC-C-----K-KCRA	Q9TWD

^a CsII from *Cs. suffusus*; Cn2 from *C. noxius*; CII1 and CII2 from *C. limpidus limpidus*; Gil from *C. infamatus infamatus* and CII1 from *C. limpidus tecomanus*.

^b Dashes (–) mean identical residue to CsII; * Means that the C-terminal is amidated (CONH₂).

^c Access means accession number.

N- and at the C-terminal regions, could be crucial for the specificity and affinity, respectively, of β -scorpion toxins for Na_v isoforms [28]. In this respect, Estrada et al. [27] reported that the C-terminal region in the native CsII is important for neurotoxin affinity, and they found that exchanging the residues T64 and S66 for basic residues at the C-terminal of CsII improved the affinity for Na_v1.6. They constructed a recombinant rCsII variant [T64R, S66R] and obtained a significant increase in activity for Na_v1.6. According to this C-terminal affinity hypothesis, Schiavon et al. [28,51] reported dose-responses (IC50s) using the Na_v1.6 of 39 and 307 nM for Cn2 and CsII, respectively; that is, 8 fold higher for Cn2, which has more positive charges at its C-terminal (see Table 3 and Fig. 7). Recently, the primary structure of a new neurotoxin named Cn8 from *C. noxius* was determined (Table 3). This toxin presents four positive charged residues at the C-terminal, and it seems to be more toxic to mice to that of Cn2 and CsII [51].

On the other hand, the amino acid residues that could be responsible for Na_v isoform specificity might be those at the N-terminal region, specifically at positions 7, 8 and 9 (Table 3). Such N-terminal region has the most diverse amino acid substitutions in all the long-chain mammalian β -scorpion toxins from the venom of the *Centruroides* species. This data also agrees with the recently reports from Schiavon et al. [51] in which electrophysiological assays were

performed with different β -scorpion toxins (CsII, CII1, CII2 and Cn8) on single expressed subtypes of Na_v from 1.1 to 1.7. They found that β -scorpion toxins affect differentially Na currents in Na_v isoforms (Nav1.1 to Nav1.7) even if they share a high degree of similarity (>78%). For example, CsII blocks more specifically Na_v 1.6 than Cn2, Cn8, CII1 and CII2, which also have significant blocking activities on Na_v 1.1 to 1.5 [28,51]. In this respect, Cn8, which has the most diverse residue differences at the N-terminal, was the neurotoxin with the most promiscuous activity to Na_v isoforms. Therefore, the preferences of the long-chain mammalian β -scorpion toxins for Na_v isoforms may be related to N-terminal differences and to the structural differences of certain amino acid residues found in that surface area. For example, although the N-terminal residues of both CsII and Cn2 are nearly identical (89%), we can observe a different distribution of electrostatic charges in the structural faces that shelter such residues contrary to the structural faces that house the C-terminal residues (Fig. 7). The surface area in CsII that encloses the residues S7 and S9, which might be involved into the specificity for Na_v isoforms, presents a more compact patch of positively charged residues (K8, K13, R27, K30 and K35) than that found in the similar molecular surface of Cn2 (Fig. 7). In addition, the molecular surface of Cn2 shelter an anionic residue (D7) that split the patch of basic residues K8 and K13 from the other basic residues (K18, R27 and K30) that are more dispersed in the same area. As a result, the overall differences in the position of the basic and anionic residues may be related to changes in the specificity for Na_v isoforms in these two β -scorpion toxins.

In general, this report confirms that a correct folded and biologically active recombinant β -scorpion toxin was obtained. As a result, the possibility of obtaining well-folded and correctly placed cysteine pairs, in recombinant β -scorpion toxins, such as HisrCsII and rCsII reported here, certainly will provide the means of producing substituted mutants at the N- and C-terminal regions of this peptide. In conclusion, this communication indicates the strategy to be followed for heterologous expression of mutants of this peptide for better understanding the molecular basis of the specificity and affinity of β -scorpion toxins for the various Na_v isoforms.

Acknowledgements

We acknowledge BSc Cipriano Balderas and Dr. Fernando Zamudio for “milk” scorpions and for mass spectrometry measurements, respectively. Also, we acknowledge Paolo Guastavino for technical assistance, and Dr. Michael Pusch for making available the GePulse software. This work was partially supported by a grant from the bilateral agreement between the Italian CNR and the Mexican CONACYT to GP and LDP, CONACYT CB-2010-153606 to GC and by grants from *Dirección General de Asuntos del Personal Académico* (DGAPA) of the National Autonomous University of Mexico, IN205110 to RR, IN204110 to LDP and IN220809 to GC.

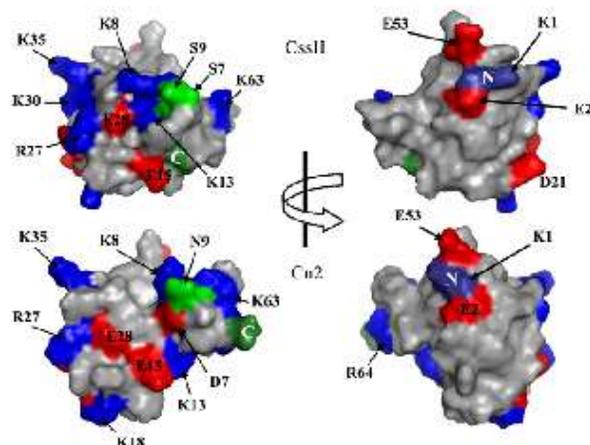


Fig. 7. Comparison of the electrostatic surfaces of CsII and Cn2. The structures of CsII (above) and Cn2 (below) are 180° rotated (from left to right). The polar hydrophilic side chains are shown in green (the polar C-terminals are colored in dark green). The positively-charged residues are shown in blue, and the negatively-charged residues are shown in red (the positively-charged N-terminals are colored in dark blue). Side chains were colored according to PyMOL (Delano, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System, 2002) Delano Scientific, San Carlos, CA.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at doi:10.1016/j.bbapap.2012.01.003.

References

- [1] L.D. Possani, B. Becerril, M. Delepierre, J. Tytgat, Scorpion toxins specific for Na⁺ channels, *Eur. J. Biochem.* 264 (1999) 287–300.
- [2] C.F.S. Amaral, N.A. de Rezende, L. Freire-Maia, Acute pulmonary edema after *Tityus serrulatus* scorpion sting in children, *Am. J. Cardiol.* 71 (1993) 242–245.
- [3] N. Osaya-Romero, T. De Jesús Medina-Hernández, S.S. Flores-Hernández, G. León-Rojas, Clinical symptoms observed in children envenomated by scorpion stings, at the children's hospital from the State of Morelos, México, *Toxicol.* 39 (2001) 781–785.
- [4] R.C. Rodríguez de la Vega, L.D. Possani, Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution, *Toxicol.* 46 (2005) 831–844.
- [5] L.D. Possani, R.C. Rodríguez de la Vega, Scorpion venom peptides, in: A.J. Kastin (Ed.), *Handbook of Biologically Active Peptides*, Elsevier, Amsterdam, 2006, pp. 339–354.
- [6] J.P. Chippaux, M. Goyffon, Epidemiology of scorpionism: a global appraisal, *Acta Trop.* 107 (2008) 71–79.
- [7] M.F. Martín, L.G. García y Pérez, M. el Ayeh, C. Kopeyan, G. Bechis, E. Jover, H. Rochat, Purification and chemical and biological characterizations of seven toxins from the Mexican scorpion, *Centruroides suffusus suffusus*, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 4452–4459.
- [8] E. Jover, N. Martín-Moutón, F. Couraud, H. Rochat, Binding of scorpion toxins to rat brain synaptosomal fraction, effects of membrane potential, ions, and other neurotoxins, *Biochemistry* 19 (1980) 463–467.
- [9] E. Jover, F. Couraud, H. Rochat, Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95 (1980) 1607–1614.
- [10] S. Cestele, W.A. Caterall, Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels, *Biochimie* 82 (2000) 883–892.
- [11] S. Cestele, Y. Qu, J.C. Rogers, H. Rochat, T. Scheuer, W.A. Caterall, Voltage sensor-trapping: enhanced activation of sodium channels by beta-scorpion toxin bound to the S3–S4 loop in domain II, *Neuron* 21 (1998) 919–931.
- [12] G. Estrada, B.J. Garcia, E. Schiavon, E. Ortiz, S. Cestele, E. Wanke, L.D. P. G. Corzo, Four disulfide-bridged scorpion beta neurotoxin CstII: heterologous expression and proper folding in vitro, *Biochim. Biophys. Acta* 1770 (2007) 1161–1168.
- [13] K. Hernandez-Salgado, G. Estrada, A. Olvera, F.J. Coronas, L.D. Possani, G. Corzo, Heterologous expressed toxic and non-toxic peptide variants of toxin CstII are capable to produce neutralizing antibodies against the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*, *Immunol. Lett.* 125 (2009) 93–99.
- [14] B.I. García-Gómez, T.C. Olamendi-Portugal, J. Paniagua, J. van der Walt, K. Dyason, L.D. Possani, Heterologous expression of a gene that codes for P88, a scorpion toxin of *Parabuthus granulatus*, capable of generating protecting antibodies in mice, *Toxicol.* 53 (2009) 770–778.
- [15] A. Olvera, R.P. Stock, B.M. Ramos, R. Sánchez, A. Alagón, Inmunógeno y antiveneno contra el veneno de la araña violinista, IMPI, UNAM-Silanes, México, 2007.
- [16] A. Pintar, L.D. Possani, M. Delepierre, Solution structure of toxin 2 from *Centruroides noxius Hoffmann*, a beta scorpion neurotoxin acting on sodium channels, *J. Mol. Biol.* 287 (1999) 359–367.
- [17] C.B. Pinheiro, S. Marangoni, M.H. Toyama, I. Polikarpov, Structural analysis of *Tityus serrulatus* Tst1 neurotoxin at atomic resolution: insights into interactions with Na channels, *Acta Crystallogr. D* 59 (2003) 405–415.
- [18] G. Corzo, E. Villegas, T. Nakajima, Isolation and structural characterization of a peptide from the venom of scorpion with toxicity towards invertebrates and vertebrates, *Protein Pept. Lett.* 8 (2001) 385–393.
- [19] G. Corzo, E. Villegas, L. Hon-Seok, T. Nakajima, Detection and purification of insecticidal peptides from scorpions and spiders: a rapid method for their isolation from their crude venoms using MALDI-TOF-MS analysis, *Protein Pept. Lett.* 8 (2001) 375–383.
- [20] G.P. Espino-Solis, G. Estrada, T. Olamendi-Portugal, E. Villegas, F. Zamudio, S. Cestele, L.D. Possani, G. Corzo, Isolation and molecular cloning of beta-neurotoxins from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*, *Toxicol.* 57 (2011) 739–746.
- [21] L. Cohen, I. Karbat, N. Gilles, N. Ilan, M. Benveniste, D. Gordon, M. Gurevitz, Common features in the functional surface of scorpion beta-toxins and elements that confer specificity for insect and mammalian voltage-gated sodium channels, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 5045–5053.
- [22] I. Karbat, L. Cohen, N. Gilles, D. Gordon, M. Gurevitz, Conversion of a scorpion toxin agonist into an antagonist highlights an acidic residue involved in voltage sensor trapping during activation of neuronal Na⁺ channels, *FASEB J.* 18 (2004) 683–689.
- [23] I. Karbat, R. Kahn, L. Cohen, N. Ilan, N. Gilles, G. Corzo, O. Froy, M. Gur, G. Albrecht, S.H. Heinemann, D. Gordon, M. Gurevitz, The unique pharmacology of the scorpion alpha-like toxin Lqh3 is associated with its flexible C-tail, *FEBS J.* 274 (2007) 1918–1931.
- [24] L. Cohen, I. Karbat, N. Gilles, O. Froy, G. Corzo, R. Angelovici, D. Gordon, M. Gurevitz, Dissection of the functional surface of an anti-insect excitatory toxin illuminates a putative “hot spot” common to all scorpion beta-toxins affecting Na⁺ channels, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 8206–8211.
- [25] F. Lebreton, M. Delepierre, A.N. Ramirez, C.L.D.P. Calderas, Primary and NMR three-dimensional structure determination of a novel crustacean toxin from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch, *Biochemistry* 33 (1994) 11135–11149.
- [26] A. Prochnicka-Chahouf, G. Corzo, H. Satake, M.F. Martin-Eauclaire, A.R. Murgia, G. Prestipino, G. D'Suze, L.D. Possani, M. Delepierre, Solution structure of discorpin, a new K⁺ channel blocking peptide from the alpha-KTx15 subfamily, *Biochemistry* 45 (2006) 1795–1804.
- [27] G. Estrada, R. Restano-Cassulini, E. Ortiz, L.D. Possani, G. Corzo, Addition of positive charges at the C-terminal peptide region of CstII, a mammalian scorpion peptide toxin, improves its affinity for sodium channels Nav1.6, *Peptides* 32 (2011) 75–79.
- [28] E. Schiavon, T. Sacco, R. Cassulini, G. Gurrola, F. Tempia, L.D. Possani, E. Wanke, Resurgent current and voltage sensor trapping enhanced activation by a beta-scorpion toxin solely in Nav1.6 channel. Significance in mice Purkinje neurons, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 20326–20337.
- [29] O.P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, F.J. Sigworth, Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches, *Pflügers Arch.* 391 (1981) 85–100.
- [30] B.A. Johnson, R.A. Blevins, NMRview: a computer program for the visualization and analysis of NMR data, *J. Biomol. NMR* 4 (1994) 603–614.
- [31] D.J. States, R.A. Haberkorn, D.J. Ruben, A two dimensional nuclear Overhauser experiment with pure absorption phase in four quadrants, *J. Magn. Reson.* 48 (1982) 286–292.
- [32] C. Griesinger, G. Otting, K. Wüthrich, R.R. Ernst, Clean Tocsy for ¹H spin system identification in macromolecules, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 7870–7872.
- [33] M.H. Levitt, R. Freeman, T. Frenkiel, Broadband heteronuclear decoupling, *J. Magn. Reson.* 47 (1982) 328–330.
- [34] A. Bax, D.G. Davis, MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy, *J. Magn. Reson.* 65 (1985) 355–360.
- [35] U. Piantini, O.W. Sørensen, R.R. Ernst, Multiple quantum filters for elucidating NMR coupling networks, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 6800–6801.
- [36] M. Rance, O.W. Sørensen, G. Bodenhausen, G. Wagner, R.R. Ernst, K. Wüthrich, Improved spectral resolution in COSY 1H NMR spectra of proteins via double quantum filtering, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117 (1983) 479–485.
- [37] C. Dahvit, Efficient multiple-solvent suppression for the study of the interactions of organic solvents with biomolecules, *J. Biomol. NMR* 11 (1998) 437–444.
- [38] T.L. Hwang, A.J. Shaka, Water suppression that works. Excitation sculpting using arbitrary waveforms and pulsed field gradients, *J. Magn. Reson.* A112 (1995) 275–279.
- [39] F. Delaglio, NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes, *J. Biomol. NMR* 6 (1995) 277–293.
- [40] K. Wüthrich, *NMR of proteins and nucleic acids*, John Wiley & Sons, New York, 1986.
- [41] C. Bartels, T.-H. Xia, M. Billeter, P. Güntert, K. Wüthrich, The program XEASY for computer-supported NMR spectral analysis of biological macromolecules, *J. Biomol. NMR* 6 (1995) 1–10.
- [42] P. Güntert, Automated NMR structure calculation with CYANA, *Methods Mol. Biol.* 278 (2004) 353–378.
- [43] B. Lopez-Mendez, P. Güntert, Automated protein structure determination from NMR spectra, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 13112–13122.
- [44] D.A. Case, T.E. Cheatham, T. Darden, H. Gohlke, R. Luo, K.M. Merz, A. Onufriev, C. Simmerling, B. Wang, R.J. Woods, The Amber biomolecular simulation programs, *J. Comput. Chem.* 26 (2005) 1668–1688.
- [45] B. Xia, V. Tsui, D.A. Case, H.J. Dyson, P.E. Wright, Comparison of protein solution structures refined by molecular dynamics simulation in vacuum, with a generalized Born model, and with explicit water, *J. Biomol. NMR* 22 (2002) 317–331.
- [46] R. Koradi, M. Billeter, K. Wüthrich, MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures, *J. Mol. Graphics* 14 (1996) 51–55.
- [47] R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Crystallogr.* 26 (1993) 283–291.
- [48] K.A. Dill, Theory for the folding and stability of globular proteins, *Biochemistry* 24 (1985) 1501–1509.
- [49] S.Y. Lee, R. MacKinnon, A membrane-access mechanism of ion channel inhibition by voltage sensor toxins from spider venom, *Nature* 430 (2004) 232–235.
- [50] J.J. Smith, S. Alphy, A.L. Seibert, K.M. Blumenthal, Differential phospholipid binding by site 3 and site 4 toxins. Implications for structural variability between voltage-sensitive sodium channel domains, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 11127–11133.
- [51] E. Schiavon, M. Pedraza-Escalona, G.B. Gurrola, T. Olamendi-Portugal, G. Corzo, E. Wanke, L.D. Possani, Negative-shift activation, current reduction and resurgent currents induced by beta-toxins from *Centruroides* scorpions in sodium channels, *Toxicol.* 59 (2011) 283–293.