



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Consecuencias de mutaciones en residuos aminoacídicos de la neurotoxina Magi4 en su actividad biológica y especificidad hacia insectos y mamíferos.

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Doctor en ciencias

PRESENTA:
M. en C. Jesús Angel Borrego Terrazas

DIRECTOR DE TESIS
Dr. Gerardo A. Corzo Burguete
Instituto de Biotecnología, UNAM.

COMITÉ TUTOR
Dr. Lourival Domingos Possani Postay
Instituto de Biotecnología, UNAM.

Dr. Christian Sohlenkamp
Centro de Ciencias Genómicas, UNAM.

Cuernavaca, Morelos. Abril de 2020.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la asesoría del Dr. Gerardo A. Corzo Burguete. Investigación realizada gracias al financiamiento de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM), número IN203118, y el apoyo de CONACyT-México (Beca No. 415092).

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ponerme frente a las personas indicadas y en los momentos adecuados.

Al Dr. Gerardo A. Corzo Burguete, director de este trabajo, por su disponibilidad y amabilidad, por sus enseñanzas, por su confianza y por todo el tiempo dedicado a esta tesis.

A la Dra. Herlinda Catalina Clement Carretero, la Dra. Ligia Luz Corrales García, el Dr. Iván Arenas Sosa y el M.C. Alejandro Olvera Rodríguez, por ayudarme a aprender algunas de las cosas necesarias para realizar el viaje llamado doctorado.

A mis tutores el Dr. Lourival Domingos Possani Postay y el Dr. Christian Sohlenkamp, por ayudar a sacar adelante este trabajo con la mejor disposición.

Al comité evaluador del presente trabajo conformado por: la Dra. Adela Rodríguez Romero, la Dra. Verónica Quintero Hernández, el Dr. José Federico Del Rio Portilla, el Dr. Enrique Rudiño Piñera y el Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete, por las excelentes críticas aportadas al trabajo, las cuales ayudaron a mejorar sustancialmente el mismo.

A mis amigos y compañeros del consorcio Possani-Alagón-Becerril-Corzo y a los demás repartidos por el IBT, por toda la ayuda brindada, por compartir un momento de su vida conmigo, por todos esos buenos momentos disfrutados juntos y por su siempre fiel e incondicional apoyo. Por la gran amistad que nos une y sus buenos consejos.

A la Sra. Manuela, a Ricardo, a Carmen y a Angélica, que de manera directa o indirecta ayudaron en la realización de este trabajo.

Un agradecimiento especial al Dr. Fernando Zamudio y a la Dra. Gloria Saab del Instituto de Biotecnología UNAM por las determinaciones de espectrometría de masas y dicroísmo circular, respectivamente. También se reconoce el apoyo del Dr. Paul Gaytán, M.C. Eugenio López-Bustos y Q.I. Santiago Becerra de la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología.

Y, por último, pero no menos importante, a toda mi familia, porque a pesar de estar lejos, siempre se esfuerzan por hacerme sentir cerca mostrándome su cariño.

A todos, ¡Gracias!

DEDICATORIA

A mis padres:

Quienes, con su apoyo incondicional, consejos y amor me han ayudado a lograr todas mis metas, y quienes siempre dan su mayor esfuerzo para ayudarme a crear un mejor futuro.

A mis hermanos:

Con los que he pasado momentos inolvidables, quienes incondicionalmente me brindan su cariño y su amistad, deseándoles los mayores éxitos futuros.

ÍNDICE

1) RESUMEN	1
2) ABSTRACT	2
3) INTRODUCCIÓN	3
3.1) Las arañas y su veneno	3
3.2) Toxinas de arañas.....	4
3.3) Canales de sodio dependientes de voltaje (Na _v)	5
3.3.1) Canal de Na _v de mamíferos	5
3.3.2) Canal de Na _v de insectos	7
3.3.3) Sitios de unión de neurotoxinas en los canales de Na _v	9
3.4) Toxinas de araña que afectan los canales de Na _v	11
3.5) Arañas tela de embudo y δ-Atracotoxinas (δ-ACTXs)	11
3.5.1) δ-HXTX-Mg1a, Magi4.....	13
3.6) Importancia del estudio de toxinas y su relación con canales de Na _v	14
3.7) Expresión de toxinas recombinantes en <i>E. coli</i>	16
4) JUSTIFICACIÓN	17
5) HIPÓTESIS	17
6) OBJETIVO GENERAL.....	17
6.1) Objetivos específicos.....	17
7) MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
7.1) Análisis de secuencias de la familia de las δ-ACTXs	18
7.2) Generación de las mutantes de Magi4.....	18
7.3) Expresión y caracterización de las variantes de Magi4	22
7.4) Plegamiento <i>In vitro</i>	23
7.5) Análisis biológicos	23
7.5.1) Cálculo de la DL ₅₀ y la DP ₅₀	23
7.6) Análisis estructural mediante dicroísmo circular.....	24
7.7) Alineamientos estructurales entre α-toxinas	25
8) RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
8.1) Análisis de secuencias de la familia de las δ-ACTXs	26
8.2) Generación de las mutantes de Magi4.....	26
8.3) Expresión y caracterización de las variantes de rMagi4.....	28
8.4) Plegamiento <i>In vitro</i>	30
8.5) Análisis biológicos	33
8.5.1) Toxicidad en ratones y en grillos.....	33
8.6) Análisis estructural mediante dicroísmo circular.....	36

8.7) Análisis de alineamientos estructurales entre α -toxinas	38
9) CONCLUSIONES.....	44
10) REFERENCIAS	45
11) ANEXOS	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Especies de arañas de importancia médica para el ser humano.	3
Figura 2. Canal de sodio dependiente de voltaje.	8
Figura 3. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de la familia de las δ -ACTXs.....	13
Figura 4. Diseño de oligonucleótidos utilizados en la PCR mutagénica.	19
Figura 5. PCR mutagénica.....	27
Figura 6. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la rMagi4 y todas las mutantes.	27
Figura 7. Caracterización de la expresión de rMagi4 y sus variantes.	29
Figura 8. Caracterización de la expresión de K4AR5A.....	29
Figura 9. Purificación de los plegamientos in vitro de la toxina rMagi4 y sMagi4.....	30
Figura 10. Purificación de la toxina rMagi4 no mutada por HPLC fase reversa.	32
Figura 11. Efecto tóxico de rMagi4 y sus variantes en ratones y grillos.	34
Figura 12. Dicroísmo circular de rMagi4 y variantes.....	37
Figura 13. Superficies bioactivas presentes en las α -toxinas de alacrán.	38
Figura 14. Alineamiento estructural entre las α -toxinas de alacrán y Magi4.	42
Figura 15. Alineamiento estructural de Magi4 con Cg1a y Axm1b.....	43

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Sitios de unión de neurotoxinas y agentes tóxicos en canales de Na_v	10
Cuadro 2. Códigos de acceso de UniProt de las secuencias de las δ -ACTXs.	18
Cuadro 3. Oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis.	20
Cuadro 4. Condiciones de amplificación para la PCR mutagénica.....	21
Cuadro 5. Condiciones de amplificación para la PCR de colonia.	21
Cuadro 6. Códigos de acceso de α -toxinas.....	25
Cuadro 7. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de las δ -ACTXs.....	26
Cuadro 8. Masas moleculares de rMagi4 y sus variantes.	29
Cuadro 9. Efecto tóxico de rMagi4 y sus variantes en ratones y grillos.....	33
Cuadro 10. Alineamientos estructurales de Magi4 y otras α -toxinas.....	39

1) RESUMEN

Las δ -atractoxinas (δ -ACTXs) son péptidos neurotóxicos de araña, letales tanto para vertebrados como para insectos. Similar a las α -toxinas de alacrán, su mecanismo de acción implica la unión al sitio 3 de los canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v). Debido a la dificultad para sintetizar δ -ACTXs plegadas correctamente, los estudios para determinar y confirmar el farmacóforo de dichos péptidos han sido limitados. La expresión recombinante de péptidos en *E. coli*, representa una excelente oportunidad para producir y estudiar este tipo de toxinas. En este trabajo, exploramos la expresión recombinante de la δ -ACTX-Mg1a (Magi4) y algunas de sus variantes para dilucidar y verificar qué residuos de aminoácidos juegan un papel clave en la actividad tóxica contra vertebrados e insectos. La selección de los aminoácidos a mutar se basó en el alineamiento de las secuencias de las toxinas que pertenecen a la familia de las δ -ACTXs. Es bien sabido que la toxina Hv1b carece de actividad insecticida y tiene una actividad tóxica muy baja contra mamíferos. Por lo tanto, los aminoácidos conservados en la familia que no están presentes en la toxina Hv1b representan una muy buena oportunidad para encontrar los farmacóforos de esta familia. Después de la expresión, del proceso de plegamiento *in vitro* y de la purificación, los péptidos se probaron *in vivo* usando ratones y grillos. Más tarde, la topología estructural de los aminoácidos que afectaron la toxicidad se comparó en otras toxinas animales de especies relacionadas y no relacionadas mediante análisis bioinformáticos para encontrar motivos conservados involucrados en la toxicidad de las α -toxinas. Los residuos aminoacídicos mutados se agruparon en dos dominios, uno con una naturaleza catiónica y el otro con una naturaleza hidrofóbica y polar sin carga. Las mutaciones en los aminoácidos encontrados en el parche catiónico afectaron solo la actividad tóxica sobre los grillos, mientras que, las mutaciones en los aminoácidos encontrados en el parche hidrofóbico afectaron a ambos modelos (ratones y grillos). Nuestros hallazgos corroboran que estas dos superficies bioactivas comparten un área similar con las superficies bioactivas previamente reportadas para las α -toxinas de alacrán (dominio-NC y dominio-Core). Además, también se encontró que estos dominios son similares a los encontrados en otras toxinas de araña y de anémonas, las cuales afectan el mismo sitio en el canal de Na_v , lo que indica que estos dominios son importantes no solo para las α -toxinas de alacrán sino también para varias toxinas animales que afectan el sitio 3 del canal de Na_v .

2) ABSTRACT

δ -atracotoxins (δ -ACTXs) are spider neurotoxic peptides, lethal to both vertebrates and insects. Similar to scorpion α -toxins, their mechanism of action involves the binding of the voltage-gated sodium channels (Na_v) to receptor site-3. Because of the difficulty for synthesizing correctly folded δ -ACTXs, studies to determine and confirm the pharmacophore of such peptides have been limited. Recombinant expression of peptides, in *E. coli*, represents an excellent opportunity to produce and study these kinds of toxins. Here, we explored the recombinant expression of the δ -ACTX-Mg1a (Magi4) and several variants in order to elucidate and verify which amino acid residues play a key role in the toxic activity against vertebrates and insects. The selection of the amino acids to be mutated was based in the alignment of the sequences of the toxins belonging to the δ -ACTXs family. It is well known that the Hv1b toxin lacks insecticidal activity and has a very low toxic activity against mammals. Therefore, conserved amino acids in the family not present in the toxin Hv1b represent an excellent opportunity to find the pharmacophores of this family. After the expression, *in vitro* folding and purification processes, peptides were tested *in vivo* using mice and house crickets as animal models. Later, structural topology of amino acids that affected the toxicity was compared with other animal toxins from related and unrelated species by bioinformatic analyses in order to find conserved motifs involved in the toxicity of α -toxins. Mutated amino acid residues are clustered in two domains, one with a cationic nature and the other with a hydrophobic and polar but uncharged nature. Meanwhile, mutations in amino acids found in the cationic cluster affected only the toxic activity over house crickets, mutations in amino acids found in the hydrophobic cluster affected both models (mice and crickets). Furthermore, our findings corroborate that these two bioactive surfaces share a similar area with previously reported bioactive surfaces for scorpion α -toxins (NC- and Core-domain). Moreover, these clusters were also found to be similar to those found in related spider and anemone toxins, which affect the same Na_v receptor, indicating that these domains are important not only for scorpion but also for several animal toxins that affect site-3 of the Na_v .

3) INTRODUCCIÓN

3.1) Las arañas y su veneno

Las arañas pueden ser encontradas en casi todos los hábitats del planeta, desde el desierto hasta los bosques tropicales. Muchos de estos arácnidos no son naturalmente agresivos y son inofensivos para los humanos [1]. De hecho, de los 4,154 géneros de arañas descritos (120 familias, 48,394 especies) [2], solo hay 5 géneros de importancia médica (cuya mordedura puede desembocar en un envenenamiento severo) los cuales son: *Latrodectus* (viuda negra), *Loxosceles* (araña violinista o reclusa), *Atrax* y *Hadronyche* (arañas tela de embudo) y *Phoneutria* (araña bananera) [3] (figura 1). Aunque las arañas de importancia médica son las más reconocidas, otras especies también han sido identificadas como potencialmente peligrosas, la *Missulena spp.* (araña ratón), *Lampona spp.* (araña de cola blanca) y *Neosparassus spp.* (araña cangrejo gigante o araña de la madera) [4].

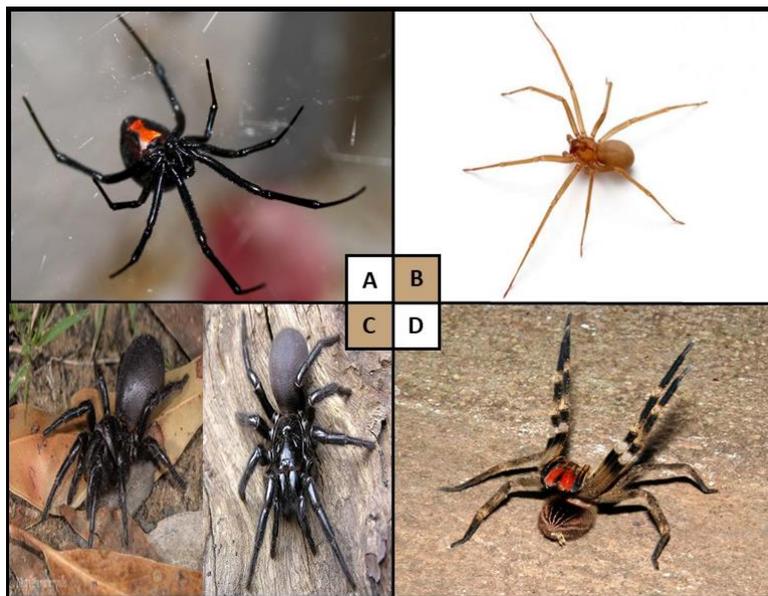


Figura 1. Especies de arañas de importancia médica para el ser humano. A) *Latrodectus mactans*¹, B) *Loxosceles reclusa*², C) *Atrax robustus*³ y *Hadronyche versuta*⁴, D) *Phoneutria nigrivente*⁵.

1) <https://www.flickr.com/photos/76790273@N07/24413039777>

2) <https://www.flickr.com/photos/76790273@N07/24413039777/in/photostream/>

3) <https://www.pinterest.ca/pin/346143921333904513/>

4) <https://www.flickr.com/photos/mattsummerville/16851572060>

5) <https://www.flickr.com/photos/pedrohmartins/28478138154>

La mayoría de las arañas se alimentan de insectos u otros artrópodos, aunque especies grandes pueden llegar a comer ranas, lagartijas, serpientes, pequeñas aves y roedores. Para esto, las arañas emboscan a sus presas y las sujetan con sus colmillos (arañas cazadoras) o las capturan utilizando trampas de seda (constructoras de telarañas). Cualquiera que sea el método de caza, la mayoría de las veces las presas mueren por la inyección de veneno. Este veneno es utilizado para paralizar y/o matar a la presa, y puede tener actividad como agente pre-digestor de los tejidos de la misma, además puede ser utilizado como mecanismo de defensa contra depredadores [5]. A pesar del gran número de especies de araña que se conocen, solo una pequeña parte de ellas ha sido estudiada con relación a la composición y propiedades de sus venenos [6], sin embargo, las investigaciones demuestran que estas sustancias están conformadas por una compleja mezcla de componentes con actividad biológica, siendo los componentes que se encuentran en mayor proporción: las proteínas, polipéptidos y poliacilaminas, enzimas, ácidos nucleicos, aminoácidos libres, monoaminas y sales inorgánicas [1].

3.2) Toxinas de arañas

El término veneno ha sido usado desde tiempos muy antiguos y refiere a cualquier sustancia o mezcla de sustancias, capaz de inducir una respuesta adversa en un sistema biológico. El término toxina refiere a productos altamente tóxicos del metabolismo de organismos vivos independientemente de su naturaleza: toxinas bacterianas, fitotoxinas (plantas), zootoxinas (animales) y micotoxinas (hongos) [7]. La mayoría de las toxinas identificadas en venenos de araña son péptidos y proteínas ricos en enlaces disulfuro. En combinación con las toxinas de masa molecular baja (poliaminas), los péptidos representan el mayor arsenal tóxico en el veneno de las arañas, seguidos por proteínas que incluyen neurotoxinas y enzimas de peso molecular alto como: proteasas, hialuronidasas, esfingomielinansas, isomerasas y fosfolipasas [6]. Debido a que el veneno de una araña puede contener hasta 1,000 péptidos, se ha estimado que existen más de 10 millones de péptidos bioactivos, de los cuales solo se han caracterizado el 0.01% [8], muchos de los cuales exhiben un amplio rango de actividades farmacológicas, afectando los canales iónicos receptores de potencial transitorio (TRP, transient receptor potential), receptores mecanosensitivos, canales iónicos sensibles a la concentración de protones (ASIC, acid-sensing ion channels), receptores de glutamato, canales de potasio activados por calcio (K_{Ca}) y canales iónicos activados por voltaje de K_v , Ca_v y Na_v [9].

Debido a que el propósito principal del veneno de las arañas es paralizar a sus presas, muchos de los componentes del veneno tienen como objetivo receptores celulares del sistema nervioso central y periférico (cerebro y cordón nervioso central en insectos), afectando los axones, las

sinapsis nerviosas o las uniones neuromusculares, modificando la generación y propagación del potencial de acción al actuar en múltiples sitios moleculares [6] como receptores neuronales, canales iónicos o proteínas membranales presinápticas involucradas en la liberación de neurotransmisores [1]. De acuerdo a su modo de acción, las neurotoxinas dentro de los venenos de araña pueden ser clasificadas de la siguiente forma: toxinas que afectan la transmisión glutamatérgica, toxinas que afectan canales de calcio (Ca^{+2}), sodio (Na^{+}), potasio (K^{+}) y cloro (Cl^{-}), toxinas que estimulan la liberación de neurotransmisores y toxinas que bloquean receptores colinérgicos postsinápticos [1]. Muchas de estas toxinas tienen una alta selectividad para modular subtipos específicos de receptores y canales iónicos, lo cual es crucial para encontrar objetivos terapéuticos para tratar diversas fisiopatologías [9]. Este trabajo se centra en el estudio de toxinas que afectan los canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v).

3.3) Canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v)

Los canales iónicos dependientes de voltaje son proteínas intermembranales que permiten el flujo de iones a través de las membranas celulares, regulados por las diferencias de voltaje de la membrana en la que se encuentran. El flujo de iones cargados, como sodio, potasio, calcio y cloro, así como la dependencia de voltaje del canal, les permite producir y responder a una señal eléctrica dentro del organismo. En particular los canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v) son proteínas glicosiladas que rápidamente se activan ante la despolarización de la membrana para permitir el flujo de iones Na^{+} antes de su rápida inactivación. Este proceso es indispensable para la generación del potencial de acción en células eléctricamente excitables [10]. Sin embargo, también participan en otros procesos biológicos como la liberación de catecolaminas por células neuroendocrinas, contracción de músculo liso, esquelético y cardíaco, melanogénesis e invasión, fagocitosis y maduración de células inmunes [11].

3.3.1) Canal de Na_v de mamíferos

Los canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v) en mamíferos están compuestos por dos subunidades: la subunidad α y la subunidad β . La subunidad α es la subunidad que conforma el canal y por sí sola es suficiente para el flujo de los iones de sodio, mientras que la subunidad β está relacionada con mecanismos de modulación del canal [12].

En el humano se conocen nueve genes (SCN1A, SCN2A, SCN3A, SCN4A, SCN5A, SCN8A, SCN9A, SCN10A y SCN11A) que codifican para nueve isoformas de la subunidad α ($\text{Na}_v1.1$ - $\text{Na}_v1.9$), las cuales ya han sido caracterizadas funcionalmente. Se sabe que existe un décimo gen (SCN7A) que codifica para un canal de sodio (Na_x o $\text{Na}_v2.1$); sin embargo, después de su caracterización,

se concluyó que este canal difiere mucho en las características que presentan los otros canales Na_v [13]. Las nueve isoformas son expresadas de forma tejido-específica; mientras que los canales $Na_v1.1$ - $Na_v1.3$ se expresan mayormente en el sistema nervioso central, los canales $Na_v1.6$ - $Na_v1.9$ se localizan principalmente en el sistema nervioso periférico y los canales $Na_v1.4$ y $Na_v1.5$ en el músculo esquelético y cardíaco respectivamente. Además, las distintas isoformas también pueden ser clasificadas según su sensibilidad al efecto de la tetrodotoxina (TTX) (toxina que posee un efecto de bloqueo en los canales de Na_v) siendo los canales de $Na_v1.5$, $Na_v1.8$ y $Na_v1.9$ resistentes a la TTX a concentraciones micromolares y el resto de los canales sensibles a la toxina a concentraciones nanomolares [14].

La subunidad α es un polipéptido de una sola cadena de aproximadamente 2,000 aminoácidos que forma cuatro dominios (I-IV) diferentes entre sí, cada uno de ellos conformados a su vez, por seis segmentos transmembranales helicoidales (S1-S6). Los primeros cuatro segmentos, S1 al S4, conforman el dominio sensible al voltaje del canal, mientras que los dominios S5 y S6 junto con el segmento extracelular que une estos dos segmentos (asa-P) conforman el poro del canal [15] (figura 2), donde se encuentra el anillo de selectividad, conformado por los aminoácidos Asp, Glu, Lys y Ala (DEKA) en los DI, DII, DIII y DIV, respectivamente [16]. Dentro de los segmentos encargados de censar los cambios de voltaje en la membrana (S1-S4), los segmentos S4 de cada dominio poseen una característica anfipática, con motivos repetidos de aminoácidos cargados positivamente, usualmente Arg, seguidos por dos residuos hidrofóbicos. En respuesta a cambios en el campo eléctrico producidos por la despolarización de la membrana, inician cambios conformacionales que desembocan en la apertura del poro del canal [15, 17]. Los sensores de voltaje de los dominios I, II y III muestran las cinéticas más rápidas y permiten que el flujo de iones comience [18]. El sensor de voltaje del dominio IV responde más lentamente. Este movimiento libera un segmento intracelular llamando compuerta de inactivación que conecta la hélice S6 del DIII con la hélice S1 del segmento IV [19] el cual posee tres aminoácidos hidrofóbicos altamente conservados indispensables para esta actividad Ile, Phe y Met (motivo IFM) [16]. Como resultado, la compuerta de inactivación se mueve para obstaculizar el poro y llevar al canal al estado inactivado. Así la activación e inactivación de los canales de Na_v está ligada estructural, mecánica y funcionalmente [20].

La mayoría de las subunidades α de los canales de Na_v están asociadas a una o dos subunidades β (30 kDa), las cuales se requieren para regular las cinéticas del canal y la dependencia de voltaje para la apertura del mismo, pero no son requeridas para el flujo de los iones, la selectividad iónica o la modulación farmacológica [21]. Existen cuatro genes para las subunidades β , *Scn1b*-*Scn4b*, los cuales codifican para cuatro proteínas $\beta1$ - $\beta4$ respectivamente. Al igual que con la

subunidad α , la expresión individual de las subunidades β es tejido específica. Todas las subunidades β se consideran proteínas integrales de membrana del tipo 1. La región N-terminal extracelular posee un dominio simple de inmunoglobulina (Ig) tipo V y un asa pequeña que conecta un dominio α hélice transmembranal seguido por la región C-terminal intracelular. Mientras que las subunidades β_1 y β_3 se unen no covalentemente a la subunidad α , las subunidades β_2 y β_4 lo hacen de forma covalente por medio de un enlace disulfuro [22].

3.3.2) Canal de Na_v de insectos

En contraste con los mamíferos, los insectos poseen un solo gen que codifica para el canal de Na_v , el gen *para*, después llamado *DmNa_v* (*Dm: Drosophila melanogaster*). Este gen codifica para una proteína cuyas características estructurales, incluyendo la selectividad iónica y la apertura del canal, las cuales son críticas en los canales de sodio de mamíferos, están bien conservadas [23].

Este gen está altamente conservado a través de diversos órdenes de insectos, con un nivel de identidad que va del 87 al 98%, razón por la cual los insecticidas que afectan los canales de Na_v en insectos tienen una amplia actividad, caso contrario en los mamíferos, donde los canales de Na_v entre diferentes tipos de mamíferos tienen una identidad típicamente de entre 50 a 60% [14]. Además, a diferencia de los genes que codifican para los canales de Na_v en mamíferos, el transcrito primario del gen *DmNa_v* sufre un complejo patrón de “*splicing*” alternativo y que, junto con al menos cinco sitios de edición del RNA (cambio de una base por otra, principalmente adenina por inosina y deleciones o inserciones), potencialmente generan más de 100 diferentes variantes funcionales y tejido específicas del canal de Na_v [21].

Al igual que los canales de Na_v en mamíferos, el canal de Na_v en insectos también presenta una subunidad auxiliar codificada por el gen *TipE* y cuatro genes homólogos (TEH 1-4). Las proteínas codificadas por estos genes poseen dos segmentos transmembranales, un asa que conecta ambos segmentos y la región C-terminal y N-terminal intracelular y al igual que la subunidad β en mamíferos, estas subunidades auxiliares modulan la expresión y las propiedades de apertura del canal [23].

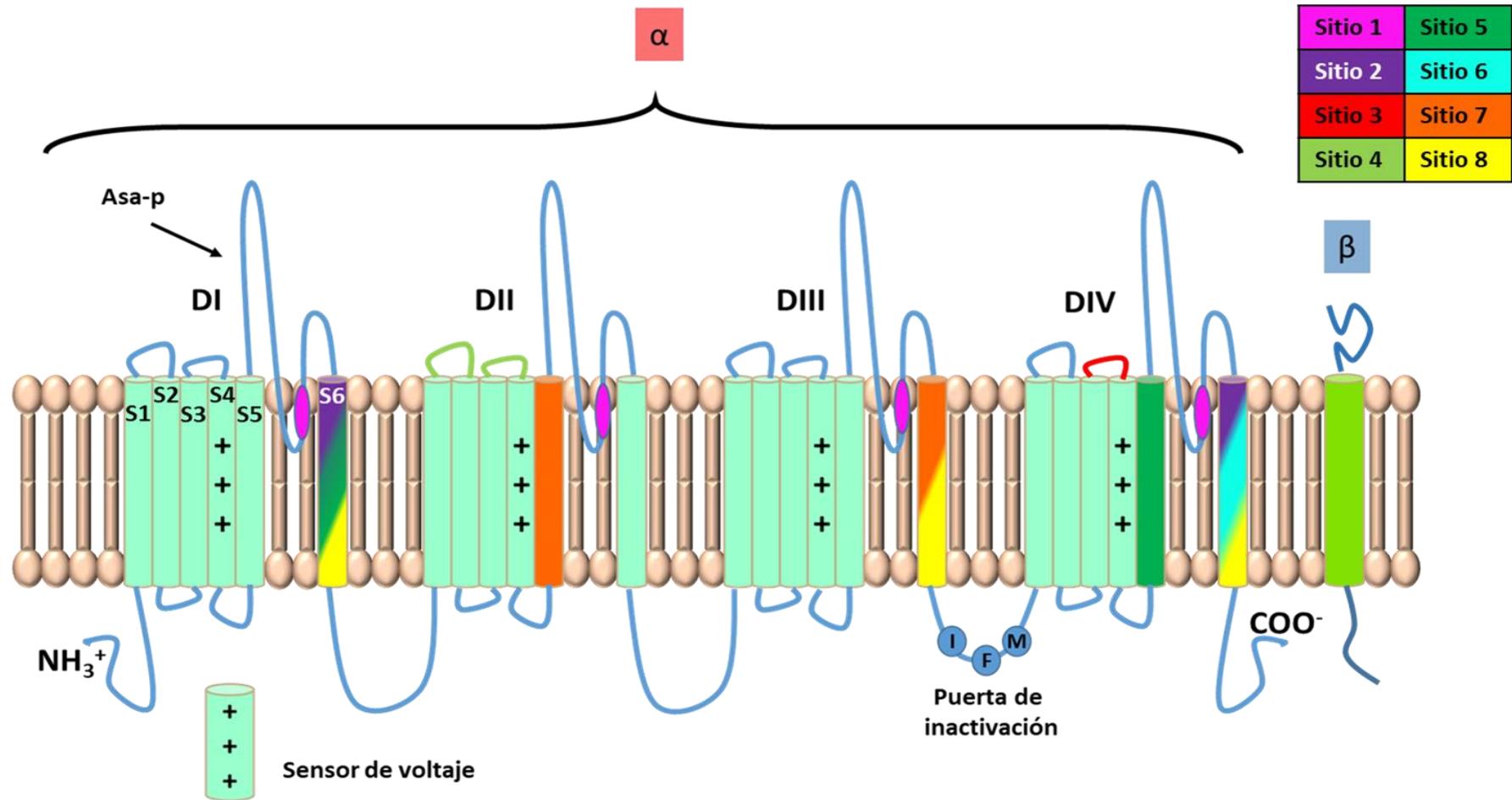


Figura 2. Canal de sodio dependiente de voltaje.

Representación esquemática del canal de Na_v. Se muestran los cuatro dominios del canal (DI-DIV), cada uno con sus seis segmentos (S1-S6), el asa-p y su respectivo sensor de voltaje representado por símbolos + (S4). Así mismo se muestra la puerta de inactivación (IFM) y las regiones de interacción de toxinas y agentes tóxicos con el canal, algunos de los cuales son mostrados en el cuadro 1.

3.3.3) Sitios de unión de neurotoxinas en los canales de Na_v

Como se mencionó anteriormente la estructura de los canales de Na_v en mamíferos e insectos es muy parecida, pudiera ser debido a que los canales de Na_v se han conservado a través de la evolución, por lo cual los sitios de unión de toxinas que afectan estos canales son similares. En algunos casos solo distinguibles farmacológicamente por insecticidas agroindustriales como el DDT, piretroides, N-alquilamidas, etc. y algunas neurotoxinas, las cuales pueden ser selectivas hacia los canales de Na_v de insectos o de mamíferos [21]. Las neurotoxinas unidas al canal de Na_v modulan la actividad del mismo mediante dos mecanismos principales: en el primero pueden ocluir físicamente el poro del canal, lo que obstruye el paso de los iones de sodio por el poro, mientras que en el segundo se unen a un sitio alostérico que induce un cambio conformacional en el canal que altera la cinética del equilibrio entre el estado abierto, inactivado y cerrado y la dependencia de voltaje del canal [16].

Actualmente se reconocen seis sitios de unión de neurotoxinas en los canales de Na_v y dos sitios reconocidos por compuestos sintéticos (insecticidas y anestésicos), distinguibles no solo por la localización del lugar de unión, sino por los efectos que tienen la unión de la toxina en ese sitio específico sobre el canal (figura 2). Estos sitios han sido revelados mediante una combinación de mutagénesis sitio dirigida, estudios de unión y aproximaciones electrofisiológicas, donde se han utilizado toxinas y alcaloides como sondas farmacológicas [8]. En el cuadro 1 se resumen los sitios de unión de algunas toxinas y agentes tóxicos y los efectos originados.

Cuadro 1. Sitios de unión de neurotoxinas y agentes tóxicos en canales de Na_v.

Sitio	Neurotoxina/Agente tóxico	Ejemplos	Área de unión	Efecto principal
1	Toxinas de guanidinio	Tetrodotoxina, saxitoxina	Asa-p intramembranal que conecta S5 y S6 de todos los dominios (DI-DIV)	*Bloqueo de la entrada de Na ⁺
	μ-Conotoxinas	KIIIA, SIIIA, PIIIA		
2	Toxinas liposolubles pequeñas	Batracotoxina, Veratridina, Aconitina	S6 de DI y DIV	*Cambio negativo en la dependencia de voltaje para la activación *Inactivación más lenta *Bloqueo de la entrada de Na ⁺ *Alteración en la selectividad iónica
3	α-toxinas de alacrán	AaHII, LqhaIT	S3-S4 en DIV	*Inactivación más lenta
	Toxinas de anémona β-toxinas de alacrán	ATX-II, AFTII Css4, AahIT		
4	β-toxinas de araña	Magi 5, HWTX-IV	S1-S2 y S3-S4 en DII	*Cambio negativo en la dependencia de voltaje para la activación *Bloqueo de la entrada de Na ⁺
	μ O-Conotoxinas	MrVIA		
5	Compuestos cíclicos poliéteres	Brevetoxina, Ciguatoxina	S6 DI y S5 DIV	*Cambio negativo en la dependencia de voltaje para la activación *Inactivación más lenta
6	δ-Conotoxinas	TxVIA, δ-SVIE	S6 DIV	*Inactivación más lenta
7	Piretroides	DDT, Deltametrina	S5 DII y S6 DIII	*Inactivación más lenta
8	Analgésicos locales Anticonvulsionantes Antiarrítmicos Antidepresivos	Lidocaína	S6 del DI, DIII y DIV	*Bloqueo de la entrada de Na ⁺

Stevens *et al* 2011., <http://www.guidetopharmacology.org/>

3.4) Toxinas de araña que afectan los canales de Na_v

Como se mencionó anteriormente, los venenos de araña poseen un gran número de toxinas que afectan los canales de Na_v. Estas toxinas fueron ampliamente revisadas por Klint et al. [8] quienes hicieron una clasificación de todas las toxinas de araña conocidas con actividad en los canales de Na_v tanto de vertebrados como de invertebrados, en función del nivel de identidad de su secuencia y espacios entre cisteínas. De esta clasificación surgieron doce familias, NaSpTx 1-12 (Na⁺ spider toxins). En general, las toxinas de araña reportadas tienen alrededor de 28 a 50 residuos aminoacídicos, pero hay algunos ejemplos de toxinas de hasta 77 residuos. Nueve de las doce familias presentan tres puentes disulfuro que forman un motivo llamado nudo inhibidor de cistina (ICK), que brinda a las toxinas una alta estabilidad química, térmica y biológica. De forma interesante, a pesar de que las toxinas clasificadas en una misma familia comparten un cierto nivel de identidad, la actividad biológica y la selectividad para los distintos subtipos de canales de Na_v varían drásticamente [8].

3.5) Arañas tela de embudo y δ -Atracotoxinas (δ -ACTXs)

Las arañas tela de embudo australianas son un grupo grande de arañas agresivas y nocturnas (Araneae: Mygalomorphae: Atracidae) clasificadas en tres géneros *Atrax*, *Hadronyche* e *Illawarra* [24]. Estas arañas se consideran las más peligrosas conocidas hasta la fecha. Entre las especies que conforman este grupo, se encuentra la que posiblemente es la araña más venenosa del mundo, el macho de la especie *Atrax robustus* (figura 1C) [4]. Los síntomas que se presentan después de la mordedura de estas arañas, pueden ser desde neurotoxicidad local (entumecimiento, parastesia, etc.) hasta efectos clínicos severos, caracterizados por excitación del sistema nervioso autónomo (taquicardia, hipertensión, lagrimeo, diaforesis, etc.) y excitación neuromuscular (fasciculación muscular y espasmos), acompañados de síntomas sistémicos como dolor abdominal, náuseas, dolor de cabeza y agitación, que eventualmente culminan en presión intracraneal elevada, fasciculación muscular generalizada, edema pulmonar y craneal, coma y muerte; estos síntomas pueden desarrollarse dentro de 15 minutos [3]. Afortunadamente, hay clara evidencia de que estas arañas no liberan veneno en la mayoría de las mordidas (mordida seca), típicamente los casos severos de envenenamiento que requieren tratamiento están entre el 10 y 25% [25].

Una de las características más interesante del veneno de estas arañas es su toxicidad específica hacia primates, presentando efectos tóxicos muy leves en otros mamíferos solo al inyectar altas dosis o al inyectar de forma intracraneal. Esta resistencia natural ha sido reportada para animales tan diversos como perros, gatos, caballos, conejos, cobayos, e incluso siendo probadas

en pollos y sapos. La primera vez que se observó este efecto biológico fue en 1934, cuando Kellaway notó la falta de toxicidad en ratones y conejillos de indias al ser mordidos por *Atrax robustus* [26]. La razón de la especificidad hacia primates es aún desconocida, pero trabajos realizados con suero de conejos no inmunizados, mostraron tener anticuerpos antitoxinas contra el veneno del macho de la especie *A. robustus*. Estas observaciones sugieren la presencia de factores inactivadores endógenos en la forma de inmunoglobulina G (IgG) que neutralizan el veneno, o en general una unión no específica de inmunoglobulinas debido a la naturaleza altamente básica de las toxinas que se encuentran en el veneno [25].

Hoy en día no se han reportado más muertes causadas por la mordedura de estas arañas gracias a la introducción de un antiveneno elaborado a partir de IgG purificadas de conejos, inmunizados con el veneno del macho de la especie *A. robustus*. Estas inmunoglobulinas son capaces de neutralizar la toxina δ -HXTX-Ar1 (robustoxina), que al ser inyectada en monos es la responsable del síndrome de envenenamiento observado por la mordedura de esta araña [25].

La robustoxina fue la primera toxina aislada del veneno de las arañas tela de embudo australianas. Posteriormente se descubrió otra toxina llamada δ -HXTX-Hv1a (versutoxina) aislada del veneno de *H. versuta*. Esta toxina originaba la misma sintomatología observada con la robustoxina al ser inyectada en primates. A la fecha se han reportado otros 5 péptidos con características similares a las dos primeras toxinas reportadas (figura 3), para dar un total de 7 péptidos, que juntos conforman la familia hoy denominada como δ -atraxotoxinas (δ -ACTXs) clasificados en la familia NaSpTx 4 [8]. Seis de estos péptidos han sido aislados de venenos de arañas tela de embudo (familias Atracidae y Hexathelidae) y solo uno ha sido aislado del veneno de la araña ratón (familia Actinopodidae). Los péptidos pertenecientes a la familia de las δ -ACTXs se caracterizan por tener un tamaño de entre 42 a 44 aminoácidos, en cuya estructura terciaria se pueden observar cuatro enlaces disulfuro, tres de los cuales conforman el arreglo ICK [8], este arreglo conservado en muchas toxinas de diferentes especies, comprende un anillo conformado por dos enlaces disulfuro en las inmediaciones del péptido y un tercer enlace disulfuro que divide el anillo para crear un pseudonudo, lo que confiere a las toxinas una alta resistencia a las proteasas, pH ácidos, altas temperaturas y solventes orgánicos [9]. Además, poseen un inusual motivo de tres residuos de cisteína consecutivos en el centro de la estructura primaria y una proporción alta de aminoácidos básicos.

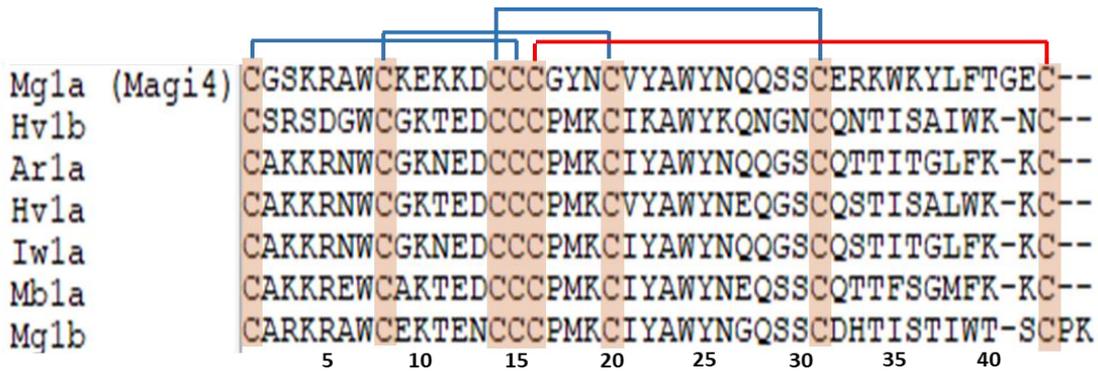


Figura 3. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de la familia de las δ -ACTXs. Se muestran los enlaces disulfuro presentes en la familia. En color azul se muestran los enlaces que conforman el motivo ICK. Los números de acceso para la base de datos UniProt de cada toxina se muestran en el cuadro 2.

Todos los péptidos de esta familia son letales para mamíferos y todos a excepción de la toxina δ -HXTX-Hv1b, también exhiben actividad insecticida causando parálisis y/o letalidad en ortópteros, lepidópteros y dípteros. Su efecto biológico se debe a la unión de estas toxinas a los canales de Na_v [8]. El mecanismo molecular de esta acción biológica se basa en la unión de las δ -ACTXs en el sitio 3 del canal de Na_v , modo de acción que fue elucidado al observar que las δ -ACTXs inhibían la interacción de la toxina Lqh2 (una α -toxina de alacrán que se une al sitio 3 en los canales de Na_v) con el canal de sodio [27]. Esta unión disminuye la velocidad de conversión del estado abierto al estado inactivo del canal, lo que mantiene la conductancia a un potencial de membrana donde comúnmente la inactivación del canal debería ser total. Este efecto se debe a que una vez que la toxina está unida al sitio 3, previene el cambio conformacional requerido para la rápida inactivación del canal [3]. Además, el canal también se recupera más rápido del estado inactivo al estado de reposo (pasa al estado de reposo con un potencial de membrana más hiperpolarizado) [28].

3.5.1) δ -HXTX-Mg1a, Magi4

Macrothele gigas conocida también como araña tela de embudo japonesa (descrita por Shimojana y Haput en 1998) es una araña perteneciente a la familia Hexathelidae. Esta araña habita los bosques de las islas Ryukiu y Taiwán. Cobró importancia ya que su mordida causaba un dolor severo y entumecimiento. La víctima presentaba sudoración profusa, náuseas, vómito y colapso (https://www.japan-acad.go.jp/en/publishing/pja_b/cover/82/82_8.html). Posteriormente al analizar el veneno de esta araña se encontraron varios péptidos con capacidad de afectar canales dependientes de voltaje en mamíferos e insectos. Entre estos péptidos se encontraba la toxina δ -HXTX-Mg1a, también conocida como Magi4, con una masa molecular de 5,150 Da y con un total de cuatro enlaces disulfuro, la cual hoy en día está

catalogada dentro de la familia de las δ -ACTXs. Esta toxina al igual que las otras δ -ACTXs afecta tanto a mamíferos como a insectos. En larvas del gusano del tabaco (*Spodoptera litura*) causa parálisis flácida al ser inyectada y tiene la capacidad de matar con una DL_{50} de 1.2 nmol/g, mientras que en ratones (C57/Bl6), utilizando la vía de inoculación intracraneal, se observaron síntomas como sudoración, micción, salivación, agitación, convulsiones y finalmente la muerte, con una DL_{50} de 0.15 pmol/g [29]. En trabajos posteriores utilizando “patch clamp”, Magi4 mostró tener selectividad a los canales de Na_v sensibles a TTX, afectando a los subtipos $Na_v1.6$, $Na_v1.1$ y $Na_v1.3$ y afectando al canal $DmNa_v1/TipE$ (canal de Na_v expresado en *Drosophila*). Además, también se observó que al igual que las otras δ -ACTXs, Magi4 se une al sitio 3 de los canales de Na_v en insectos; sin embargo, no compite por este sitio con la toxina Lqh2 (toxina específica para el sitio 3 en canales de Na_v de mamífero) en sinaptosomas de rata [29]. Aunque ya se ha visto que varias toxinas pueden afectar un mismo sitio de unión debido a que se unen a diferentes micrositios en esta región.

Debido a que esta toxina se ha trabajado anteriormente en nuestro grupo de investigación en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, y que ya se tiene el gen que codifica a la toxina en un vector de expresión bacteriano, Magi4 es un excelente modelo de estudio para comprender la interacción de las δ -ACTXs con los canales de Na_v . Además, es de importancia debido a que los estudios de relación estructura-función de esta familia de toxinas han sido muy limitados debido a la dificultad de producir eficientemente toxinas correctamente plegadas, ya sea de forma sintética o recombinante. Por lo que el farmacóforo de estas toxinas aún requiere ser determinado y confirmado [4].

3.6) Importancia del estudio de toxinas y su relación con canales de Na_v

A la fecha existen pocos ejemplos de péptidos o proteínas obtenidas a partir de venenos de animales (captopril, eptifibatida, tirofiban, ziconotida, bivalirudina, exenatida) aprobadas por la FDA (Food and Drug Administration) para su uso como fármacos [30]. A pesar de que se han descubierto cientos de toxinas de animales, su uso terapéutico decae debido a diversos problemas que se presentan para implementarlas como fármacos. Uno de los principales problemas con este tipo de moléculas es la vía de administración, y es que, al encontrarse en los venenos, la mayoría de los animales evolucionaron de tal forma que estas sustancias venenosas encontraron sus sitios de acción al ser inyectadas por medio de estructuras especializadas en sus presas o depredadores evitando barreras fisiológicas que disminuyeran la efectividad de las toxinas en los venenos. Esto implica que el uso de estas biomoléculas como fármaco tiene pocas posibilidades de utilizar vías de administración poco invasivas como la tópica u oral.

Otro problema que recae en este tipo de toxinas es su especificidad. A través del tiempo, la evolución ha originado que algunas de las toxinas en los venenos animales tengan una alta especificidad hacia sus receptores, lo que las convierte en valiosas herramientas farmacológicas; sin embargo, en la mayoría de los casos las toxinas pueden afectar de forma promiscua varios receptores de la misma familia (ejemplo: diversos subtipos de canales de Na_v), receptores de distintas familias (ejemplo: canales de Na_v y canales de K_v) y en algunos casos hasta pueden tener promiscuidad hacia los mismos receptores, pero en distintas especies (ejemplo: canales de Na_v en mamíferos e insectos). La afinidad de las toxinas conlleva otra problemática; en algunos casos, la afinidad que presentan este tipo de moléculas no es la suficiente como para avanzar a una etapa de desarrollo clínico. Sin embargo, a través del tiempo se han desarrollado diversas técnicas que se han conjuntado para crear la ingeniería de proteínas; con estas técnicas se busca mejorar la afinidad y la selectividad de los péptidos. Para ello se requiere tener un conocimiento previo de las interacciones toxina-receptor, para lo cual la técnica de “alanine-scanning” es muy utilizada. En esta técnica se reemplaza cada aminoácido nativo en la secuencia primaria uno a la vez por alanina, así la importancia de cada aminoácido en la interacción de la toxina y su receptor es revelada. Posteriormente, los aminoácidos directamente involucrados con la interacción toxina-receptor pueden ser sustituidos por otros para optimizar la afinidad y selectividad de los péptidos [31].

Un ejemplo de la necesidad de este tipo de estudios sobre toxinas es el que a continuación se presenta. Como ya se mencionó anteriormente, la superfamilia de los canales de Na_v comprende nueve subtipos (1.1 al 1.9) que difieren en su estructura primaria, así como en sus propiedades farmacológicas y funcionales. Diferentes subtipos están involucrados en funciones especializadas, dependiendo de su distribución, propiedades biofísicas y densidad. Estas diferencias proveen una oportunidad para la inhibición tejido específica de un subtipo, sin afectar otros [1]. El veneno de arañas es una de las mayores fuentes de inhibidores del canal de $Na_v 1.7$, el cual es uno de los mayores objetivos de toxinas que inhiben el dolor. Se han reportado numerosas toxinas (ProTx-I, GTx-1, VSTX3, HwTx-IV) que poseen un potente efecto inhibitor sobre este canal. A pesar de estos descubrimientos no existen reportes en un enfoque preclínico en el cual se utilicen estas toxinas para inhibir el dolor por medio de la inhibición del funcionamiento del canal de $Na_v 1.7$. El principal desafío que se presenta con estas toxinas es el alcanzar una alta selectividad hacia el subtipo 1.7 sobre sus otras isoformas con las cuales posee una alta homología. En particular, con el bloqueo de los canales de $Na_v 1.4$ y $Na_v 1.5$, los cuales se expresan en el músculo esquelético y cardíaco respectivamente, lo que puede conllevar al riesgo de déficit motor, parálisis y un mal funcionamiento cardíaco [31]. Aquí es donde las investigaciones se centran en encontrar las modificaciones necesarias para mejorar la

selectividad y la afinidad de estos péptidos para la generación de nuevos analgésicos basados en toxinas peptídicas.

3.7) Expresión de toxinas recombinantes en *E. coli*

Los péptidos ricos en cisteínas provenientes de venenos de arañas están emergiendo como compuestos valiosos con aplicación potencial en la agricultura y en la salud humana [32]. Sin embargo, aislar toxinas específicas de un veneno crudo con el objetivo de obtener cantidades suficientes de proteína para cubrir las demandas de la investigación puede resultar complicado debido a la naturaleza del proceso de extracción del veneno y las cantidades que se obtienen del mismo [33, 34], por lo que se necesita contar con un proceso químico o biológico eficiente para obtener el material necesario para la experimentación. Estos péptidos ricos en cisteínas generalmente contienen de uno a ocho enlaces disulfuro los cuales deben ser oxidados en un patrón correcto para obtener un péptido con actividad biológica [35]. Por lo que, durante la expresión recombinante, la probabilidad de obtener una conformación bioactiva disminuye con el aumento del número de residuos de cisteínas, debido al número de isoformas posibles aunado a la complejidad de los enlaces disulfuro requeridos [36]. La producción de péptidos recombinantes en *E. coli* presenta varias ventajas sobre otros sistemas biológicos, incluyendo la reducción de costos, el crecimiento rápido, alta producción de biomasa, el fácil escalamiento del cultivo y una bien establecida regulación para la producción de proteínas terapéuticas. Sin embargo, una de las desventajas es que *E. coli* no posee el sistema adecuado para la formación de los enlaces disulfuro nativos debido a que su citoplasma presenta un ambiente reductor particular [37]. Por lo tanto, las proteínas con enlaces disulfuro son propensas a la agregación como resultado de un emparejamiento de los enlaces intra- e intermoleculares diferentes a los de la proteína nativa [38]. Además, la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* regulada por promotores fuertes, favorece la acumulación de proteína recombinante mal plegada en forma de agregados insolubles o cuerpos de inclusión. Sin embargo, estos agregados pueden ser disueltos con agentes caotrópicos para posteriormente llevar a cabo la reacción fisicoquímica del plegamiento de los péptidos. Esta reacción se lleva a cabo gracias a la adición de algunos aditivos químicos dentro de los cuales los agentes redox presentes en la mezcla afectan fuertemente la formación de los enlaces disulfuro y la correcta conformación de la proteína. Por lo que la estandarización de los reactivos y protocolos utilizados para llevar a cabo la reacción del plegamiento *in vitro* resulta fundamental para lograr los mejores resultados [39].

4) JUSTIFICACIÓN

Las δ -ACTXs son neurotoxinas peptídicas provenientes del veneno de arañas de los géneros *Atrax* y *Hadronyche*, principalmente, las cuales son letales tanto para mamíferos como para insectos, presentando una alta afinidad por sus receptores, los canales de Na_v . Debido a la dificultad de obtener estas toxinas de forma natural o por síntesis química, se ha retrasado la comprensión de los mecanismos moleculares que están involucrados entre la interacción de estas toxinas y los canales de Na_v .

Dentro de la familia de las δ -ACTXs podemos encontrar una toxina que carece de actividad biológica, la toxina Hv1b, por lo que es una excelente oportunidad para evaluar la importancia de los aminoácidos que se encuentran en regiones conservadas de las δ -ACTXs los cuales no están presentes en la Hv1b. Por tanto, es de nuestro interés analizar el papel de estos aminoácidos, utilizando como modelo de estudio la neurotoxina Magi4 expresada de forma heteróloga en *E. coli*. Desde el punto de vista de ciencia básica, encontrar estos residuos clave podría ayudar a revelar los mecanismos moleculares en la interacción de estas toxinas con los canales de Na_v en insectos y mamíferos, así como los posibles farmacóforos involucrados en el reconocimiento entre ellos. Esta información podría ser de relevancia para el estudio de otras familias de toxinas que puedan ser clasificadas (al igual que con las toxinas de alacrán) como α -toxinas de araña.

5) HIPÓTESIS

Los aminoácidos conservados en las toxinas de la familia de las δ -ACTXs, los cuales no están conservados en la toxina Hv1b, están directamente relacionados con la actividad biológica de estas toxinas hacia los canales de Na_v y juegan un papel muy importante en la letalidad hacia insectos y mamíferos.

6) OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del cambio en los aminoácidos conservados en la familia de las δ -ACTXs en la toxina Magi4 sobre su actividad biológica.

6.1) Objetivos específicos

- Generar variantes de la toxina Magi4 sustituyendo los aminoácidos conservados en la familia de las δ -ACTXs.
- Evaluar la actividad biológica y la especificidad de estas variantes en insectos y mamíferos.

7) MATERIALES Y MÉTODOS

7.1) Análisis de secuencias de la familia de las δ -ACTXs

En el presente trabajo se analizaron todas las secuencias aminoacídicas que conforman a la familia de las δ -ACTXs, las cuales cuentan con actividad biológica reportada. En el cuadro 2 se muestran cada una de las toxinas con sus respectivos códigos de acceso en la base de datos UniProt (<https://www.uniprot.org/>). Con estas secuencias se realizó un alineamiento utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0.5 con la aplicación ClustalW, en el cual se analizaron las regiones conservadas de la familia de las δ -ACTXs. Las mutaciones posteriores se realizaron en base a algunos aminoácidos encontrados en las regiones conservadas.

Cuadro 2. Códigos de acceso de UniProt de las secuencias de las δ -ACTXs.

δ -ACTX	Código de acceso
δ -Hexatoxin-Mg1a	P83560
δ -Hexatoxin-Ar1a	P01478
δ -Hexatoxin-Iw1a	P0C1R3
δ -Hexatoxin-Hv1a	P13494
δ -Hexatoxin-Hv1b	P81885
δ -Hexatoxin-Mg1b	Q75WG5
δ -Actinopoditoxin-Mb1a	P83608

7.2) Generación de las mutantes de Magi4

La secuencia codificante para la toxina Magi4 se clonó previo a este trabajo en el vector de expresión pQE30 (QIAGEN) (Anexo 1). Algunas de las características de este vector son: la expresión de la proteína recombinante está regulada por el promotor T5 reprimido por el operador *lac*, posee un gen de resistencia a ampicilina (AmpR) para facilitar la selección clonal y además adiciona un “tag” de poli-His en el N-terminal de la proteína recombinante el cual facilita el proceso de purificación. El plásmido pQE30/Magi4 se utilizó como base para realizar todas las variantes de la toxina Magi4. La construcción de las mutantes se llevó a cabo mediante el reemplazamiento de codones en el gen blanco. Para ello se utilizó la metodología propuesta por Liu y Naismith [40] de la siguiente manera: se elaboró un par de oligonucleótidos para reemplazar cada uno de los aminoácidos seleccionados en la secuencia de la toxina Magi4. Los oligonucleótidos tenían un tamaño de entre 35 y 46 pb y estaban conformados por una región que era complementaria entre el oligonucleótido directo, el oligonucleótido reverso y el templado (región PP [primer-primer]) y una región que no era complementaria entre ellos, pero si con el templado (región NO “No overlapping”). En la región PP se encuentra el codón de

reemplazo, el cual en todos los casos fue el codón GCG que codifica para alanina, además de dos casos particulares donde también se generaron los oligonucleótidos para reemplazar la Tyr22 y la Asn26 por el codón AAA que codifica para lisina (figura 4). La T_m de la región NO de los oligonucleótidos fue de 5 a 10°C superior a la T_m de la región PP. En el cuadro 3 se muestran los oligonucleótidos elaborados.

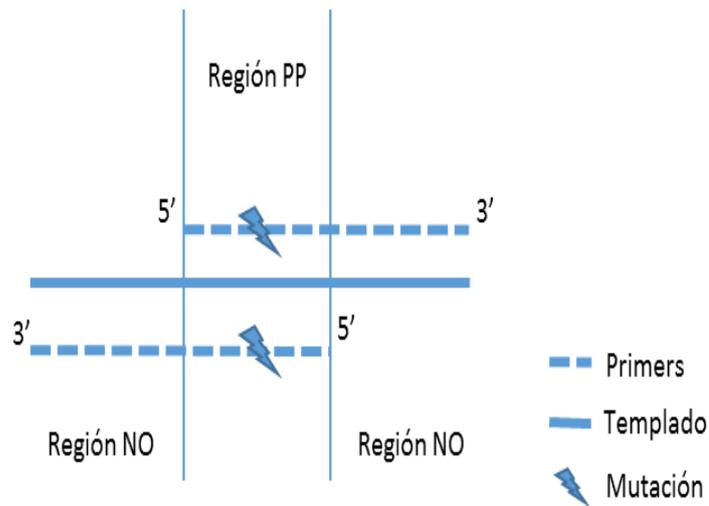


Figura 4. Diseño de oligonucleótidos utilizados en la PCR mutagénica.

Con los oligonucleótidos generados se realizó la PCR mutagénica. La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L con una concentración de 10 ng de pQE30/Magi4 utilizado como templado, oligonucleótidos 1 μ M, dNTPs 200 μ M y 3 unidades de Pfu Ultra High-Fidelity DNA polimerasa. Las condiciones de amplificación se muestran en el cuadro 4.

Cuadro 3. Oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis.

Oligos	Secuencia ^a	T _{m pp} ^b (°C)	T _{m no} ^c (°C)
K4AF	<u>GGCAGCGCGAGAGCTTGGT</u> GTAAAGAAAAGAAAGACTGCTGCTG	54.9	61.2
K4AR	CAAGCTCTCGCGCTGCCGCAACCACGACCTTCGATGGATC	54.9	62.6
R5AF	<u>CAGCAAGGCGGCTTGGT</u> GTAAAGAAAAGAAAGACTGCTGCTGCG	55	62.6
R5AR	<u>CACCAAGCCGCCTTGCTG</u> CCCGCAACCACGACCTTCGATG	55	63
Y22AF	<u>CTGCGTCGCGGCCTGGT</u> ACAATCAACAGTCTTCTTGCGAAAGG	55.8	60.9
Y22AR	ACCAGGCCGCGACGCAGTTATATCCGCAGCAGCAGTCTTTCT	55.8	61.2
Y22KF	<u>CTGCGTCAAAGCCTGGT</u> ACAATCAACAGTCTTCTTGCGAAAGG	55.8	60.9
Y22KR	ACCAGGCTTTGACGCAGTTATATCCGCAGCAGCAGTCTTTCT	55.8	61.2
N26AF	<u>CTGGTACGCGCAACAGT</u> CTTCTTGCGAAAGGAAATGGAAA	49.1	56
N26AR	GACTGTTGCGGTACCAGGCATAGACGCAGTTATATCCG	49.1	55.2
N26KF	<u>CTGGTACAAACAACAGT</u> CTTCTTGCGAAAGGAAATGGAAA	49.1	56
N26KR	GACTGTTGTTGTACCAGGCATAGACGCAGTTATATCCG	49.1	55.2
Q28AF	<u>CAATCAAGCGTCTTCTTG</u> CGAAAGGAAATGGAAATATCTTTTCACAGG	51.1	58.1
Q28AR	GCAAGAAGACGCTTGATTGTACCAGGCATAGACGCAGTTATA	51.1	57.8
S30AF	<u>CAGTCTGCGTGCGAA</u> AGGAAATGGAAATATCTTTTCACAG	46.3	54.5
S30AR	<u>TTCGCACGCAGACTGTT</u> GATTGTACCAGGCATAGAC	46.3	57.8
K4AR5AF	<u>GGCAGCGCGGCAGCTTGGT</u> GTAAAGAAAAGAAAGACTGCTGCTG	54.9	61.2
K4AR5AR	<u>CACCAAGCTGCCGCGCTG</u> CCCGCAACCACGACCTTCGATGGATCC	54.9	62.6

^a Primer-primer. La secuencia traslapada se muestra en itálica y subrayada. La secuencia mutagénica se muestra en negritas.

^b T_{m pp} (°C) calculada a partir de la secuencia traslapada del primer-primer.

^c T_{m no} (°C) calculada a partir de la secuencia que empalma con el templado.

Cuadro 4. Condiciones de amplificación para la PCR mutagénica.

	°C	Min	# de Ciclos
Pre-desnaturalización	95	5	1
Desnaturalización	95	1	
Alineamiento 1	Tm NO -5	1	12
Extensión	72	10	
Alineamiento 2	Tm PP -5	1	1
Extensión	72	30	1

Una vez realizada la amplificación (cuyo producto es el plásmido con la toxina ya mutada), se trató con 5 unidades de la enzima DpnI (para degradar el ADN metilado, plásmido con la toxina no mutada) por 2 h a 37°C. Terminado el tiempo de incubación, se tomaron 10 µL de la mezcla de reacción para correr un gel de agarosa al 1% y evaluar la amplificación del plásmido.

Con el producto de la PCR se transformaron bacterias *E. coli* XL1 Blue utilizando 2 µL de la mezcla de reacción, las células transformadas se sembraron en placas de agar LB adicionado con ampicilina y se incubaron toda la noche a 37°C. Con las colonias presentes en las placas se realizó una PCR de colonia en una mezcla de reacción de 10 µL con una concentración de dNTPs de 200 µM, MgCl₂ 2 mM, oligonucleótidos 10 µM y 2.5 unidades de *Taq* polimerasa. Las condiciones de reacción se muestran en el cuadro 5.

Las colonias que mostraban un amplificado aproximado de 317 pb se crecieron durante toda la noche a 37°C en medio LB adicionado con ampicilina. Posteriormente se extrajo el plásmido mutante con el kit “High Pure Plasmid Isolation” de ROCHE y fue secuenciado para verificar que la mutación deseada fue llevada a cabo.

Cuadro 5. Condiciones de amplificación para la PCR de colonia.

	°C	Tiempo	# de Ciclos
Pre-desnaturalización	95	5 min	1
Desnaturalización	95	40 s	
Alineamiento	55	40 s	30
Extensión	72	40 s	
Extensión	72	10 min	1

7.3) Expresión y caracterización de las variantes de Magi4

Una vez que se corroboraron las mutaciones por el análisis de secuencias, se transformó la cepa *E. coli* SHuffle con cada uno de los 10 vectores portadores de la secuencia de Magi4 o sus mutantes. Para continuar el proceso, las colonias obtenidas de la transformación se cultivaron en 10 mL de medio LB hasta alcanzar una DO_{600} de entre 0.6 y 0.7 unidades, y posteriormente se indujo la expresión de la proteína con 0.1 mM de IPTG seguido de la incubación a 16°C durante toda la noche. Al finalizar el periodo de incubación, se tomó 1 mL del cultivo y se centrifugó a 6,000 rpm por 2 min. El pellet se resuspendió en 200 μ L de Tris-HCl 50 mM y se tomaron 10 μ L para observar las proteínas de las bacterias inducidas en un gel de poliacrilamida (se realizaron dos geles, uno para teñir con azul de Coomassie y otro para un ensayo de “western-blot” el cual fue revelado con anticuerpos Anti-His Tag).

Una vez confirmada la expresión de cada una de las variantes proteicas por medio del gel de poliacrilamida y del “western-blot”, se escaló el cultivo bacteriano para producir una mayor cantidad de proteína. Cabe mencionar que en un inicio del proyecto se evaluaron distintas cepas de *E. coli* (M15, origami, BL21, Shuffle y Rosseta-gami) para seleccionar la cepa con la cual se obtuviera un mejor rendimiento de la toxina. En ninguno de los casos fue posible obtener la proteína de interés soluble en el citoplasma, aun después de evaluar distintas condiciones de temperatura, tiempo de cultivo, cantidad de agente inductor y DO_{600} de inducción, toda la proteína de interés se encontraba en cuerpos de inclusión. La cepa *E. coli* Shuffle fue elegida, ya que, a pesar de expresar la proteína en cuerpos de inclusión, expresaba mayores cantidades de proteína que las cepas anteriormente probadas, por lo que el protocolo de expresión es referente a esta cepa.

Para obtener una mayor cantidad de proteína, la cepa *E. coli* SHuffle se creció en 1 litro de medio LB adicionado con ampicilina. Una vez que el cultivo llegó a una DO_{600} de 0.7 unidades, la expresión de la proteína fue inducida con 0.1 mM de IPTG y se incubó a 37°C a 150 rpm por 16 h. Posteriormente el cultivo fue centrifugado a 6,000 rpm por 15 min, el pellet celular se resuspendió en Tris-HCl 50 mM pH 8. Los cuerpos de inclusión se obtuvieron por rompimiento de las membranas celulares mediante lisis mecánica, utilizando el disruptor mecánico con una presión de 30 psi. La muestra fue centrifugada a 8,000 rpm por 25 min, posteriormente el pellet se resuspendió en cloruro de guanidinio 6 M en Tris-HCl 50 mM pH 8 por 16 h a 4°C.

Como primer paso de purificación de la proteína obtenida a partir de los cuerpos de inclusión disueltos en la solución de cloruro de guanidino 6 M, se utilizó resina de agarosa con Ni-NTA afin al “tag” de histidinas que fue previamente adicionado a la proteína de interés. Después de la

purificación por afinidad, la proteína se redujo durante 1 h a 37°C con DTT. Como segundo paso de purificación se realizó un HPLC fase reversa con una columna semi-preparativa C₁₈ con un gradiente de acetonitrilo (ACN) de 20 a 60 % en 30 min a 2 mL/min. Cada una de las variantes reducidas ya purificadas se analizaron por espectrometría de masas.

7.4) Plegamiento *In vitro*

Para la oxidación de las cisteínas, y plegamiento final de la proteína Magi4 y sus variantes, 10 µM de la proteína reducida se colocaron en una solución de acetato de amonio 0.1 M pH 7.6, GSH:GSSG relación 1:0.1 mM, GndHCl 2 M, y acetonitrilo 2%. La proporción final de proteína reducida, GSSG y GSH fue de 1:10:100 respectivamente. Esta solución se mantuvo a 4°C durante 4 días. Después se realizó una dilución 1:2 con agua a 4°C para una concentración final de la proteína de 5 µM. Pasados 3 días a 4°C, la mezcla se acidificó a pH 2 utilizando ácido trifluoroacético. Para desalar y concentrar las isoformas, la reacción de plegamiento fue pasada por HPLC fase reversa utilizando una columna analítica C₁₈ en un gradiente de 17 a 37 % de ACN en 80 min a un flujo de 1 mL/min. Una vez que se colectaron cada una de las fracciones, aquellas que mostraron toxicidad (la actividad se describe en la sección de ensayos biológicos) se sometieron a un segundo paso de purificación en una columna analítica C₁₈ a un gradiente de 17 a 37 % de ACN en 100 min a un flujo de 1 mL/min. Posteriormente, se realizó un análisis de masa molecular a cada fracción para evaluar la oxidación de los residuos de Cys.

7.5) Análisis biológicos

Para evaluar la actividad biológica de las fracciones obtenidas en el plegamiento después de ser purificadas por HPLC fase reversa, 10 µg de cada fracción fueron resuspendidos en solución salina isotónica (NaCl 0.15 M) y se inyectaron de forma intracraneal en ratones de la cepa CD1 (previamente anestesiados con cloroformo) utilizando una microjeringa de 10 µL. Posteriormente se calculó la dosis letal media (DL₅₀) en ratones y la dosis paralizante media (DP₅₀) en grillos de la fracción que presentó toxicidad de cada una de las variantes.

7.5.1) Cálculo de la DL₅₀ y la DP₅₀

Para realizar el cálculo de la DL₅₀ se utilizó el método Up and Down [41]. Brevemente, se seleccionaron 6 dosis de la variante en cuestión, con una dilución entre ellas de 2.5 veces. Se seleccionaron 6 individuos (ratones de la cepa CD1 de entre 17 y 22 g). Se inyectó el primer individuo con la dosis intermedia. Durante 24 h se observó si el individuo sobrevivía o moría. Si sobrevivía, se inyectaba un nuevo individuo con la siguiente dosis por arriba de la utilizada, si moría, se inyectaba con la dosis por debajo de la utilizada. Después de inyectar a 6 ratones, se generó una matriz de 6 símbolos, donde "O" representa vivo, y "X" representa muerto. La matriz

se utilizó para obtener el valor “k” mostrado en el cuadro del anexo 2, que posteriormente se utilizó para sustituir y resolver la fórmula de acuerdo con el método:

$$DL_{50} = Xf + kd$$

Donde:

Xf = Valor logarítmico de la última dosis utilizada

k= Valor logarítmico de la tabla

d= Diferencia logarítmica entre las dosis

Para evaluar la actividad en insectos se utilizaron grillos (*Acheta domesticus*) de entre 100 a 160 mg, la toxina se resuspendió en agua estéril, y la inoculación se realizó en el segundo segmento en la parte izquierda del tórax, utilizando una microjeringa de 10 µL (en este modelo se utilizaron 8 individuos).

Para calcular la DP₅₀ se utilizó el método descrito anteriormente con las siguientes modificaciones: una vez que el grillo era inyectado se evaluaban los efectos de parálisis durante 10 min. Si el grillo mostraba síntomas de parálisis durante por lo menos 1 min en el transcurso del tiempo de evaluación se asignaba una “X”, si no presentaba síntomas se asignaba un “O”. Para obtener la DP₅₀ se utilizó la misma ecuación descrita en la sección de dosis letal media (DL₅₀) en los ratones.

7.6) Análisis estructural mediante dicroísmo circular

Para evaluar la integridad estructural de los péptidos recombinantes, se llevaron a cabo experimentos de dicroísmo circular (DC). Los experimentos fueron realizados en un espectropolarímetro modelo Jasco J-720 (Jasco, Tokio, Japón). Los espectros fueron adquiridos midiendo de 260 a 190 nm en muestras diluidas en agua y trifluoroetanol al 60% (TFE), a temperatura ambiente, con una celda de espesor de 1 mm. Los datos fueron recolectados a 1 nm con una velocidad de exploración de 50 nm/min y con una constante de tiempo de 0.5 s. La concentración de cada péptido fue de 30 µM. Los datos obtenidos del promedio de tres adquisiciones diferentes fueron analizados en línea utilizando el software Bestsel (<http://bestsel.elte.hu/index.php>). Como control positivo se utilizó la toxina Magi4 sintética (sMagi4) previamente caracterizada por RMN [14].

7.7) Alineamientos estructurales entre α -toxinas

Los alineamientos estructurales se llevaron a cabo utilizando el servidor TM-align [42] y la visualización de las estructuras se realizó con el software PyMol v2.3.2. En el cuadro 6 se muestran los códigos de acceso y los PDB de las toxinas utilizadas para la realización del análisis. Para este análisis se utilizaron toxinas que fueron reportadas como ligando el sitio 3 de los canales de Na_v (α -toxinas).

Cuadro 6. Códigos de acceso de α -toxinas.

α -toxina	No. de acceso UniProt	No. De acceso PDB
δ -Hexatoxin-Mg1a	P83560	2ROO
α -insect toxin LqhalT	P17728	2ASC
α -mammal toxin AaH2	P01484	1AHO
κ -TRTX-Cg1a	POC247	2A2V
δ -actitoxin-Axm1b	P01531	1APF

8) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1) Análisis de secuencias de la familia de las δ -ACTXs

En el cuadro 7 se muestra el alineamiento de las δ -ACTXs reportadas hasta el momento. Se puede observar que en esta familia de toxinas existen 2 regiones conservadas, una región con cargas catiónicas y otra región con aminoácidos hidrofóbicos y polares sin carga. De forma interesante, la toxina Hv1b (la única de las siete que carece de actividad insecticida y con actividad letal reducida en mamíferos) posee seis cambios en aminoácidos que se encuentran conservados en las demás δ -ACTXs dentro de estas regiones. Por este motivo estos aminoácidos fueron los seleccionados para evaluar su efecto en la actividad y selectividad de la toxina Magi4.

Cuadro 7. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de las δ -ACTXs.

Nombre común	Nomenclatura	Secuencia	Identidad (%)	No. de acceso
Magi4	δ -Hexatoxin-Mg1a	CGSKRAWCKEKKDCCC GYN CVYAWYNQQSS CERKWKYLFTGEC--	100	P83560
Mg1b	δ -Hexatoxin-Mg1b	CAR**AWCEKTENCCC PMKCI*AWY*G*S*CDHTISTIWTS-CPK	46.5	Q75WG5
Mb1a	δ -Actinopoditoxin-Mb1a	CAK**EWC AKTEDCCC PMKCI*AWY*E*S* CQTTFSGMFKK-C--	47.6	P83608
Hv1a	δ -Hexatoxin-Hv1a	CAK**NWC GKTEDCCC PMKCV*AWY*E*G* CQSTISALWKK-C--	50.0	P13494
Ar1a	δ -Hexatoxin-Ar1a	CAK**NWC GKNEDECCC PMKCI*AWY*Q*G* CQTTITGLFKK-C--	52.3	P01478
Iw1a	δ -Hexatoxin-Iw1a	CAK**NWC GKNEDECCC PMKCI*AWY*Q*G* CQSTITGLFKK-C--	50.0	P0C1R3
Hv1b	δ -Hexatoxin-Hv1b	CSRSDGWCGKTEDCCC PMKCIKAWYKQNGNCQNTISAIWKN-C--	33.3	P81885

↑↑
↑
↑
↑
↑

★Aminoácidos conservados; ↑ cambios aminoacídicos en Hv1b.

8.2) Generación de las mutantes de Magi4

Se sintetizaron nueve pares de oligonucleótidos para generar las mutantes de Magi4 sustituyendo los aminoácidos antes mencionados, como se muestra más adelante, todos los oligonucleótidos dieron buenos resultados durante la amplificación. En la figura 5A se muestran las amplificaciones de todas las PCR. Se puede observar una banda que corresponde con el tamaño esperado de 3,576 pb (plásmido con el gen de la secuencia codificante de la toxina) y otra banda correspondiente a los dímeros de oligonucleótidos. Una vez que se obtuvo el producto amplificado, se transformaron bacterias de *E. coli*: cepa XL1 Blue y se sembraron en placas de agar LB. Con las colonias presentes en la placa se realizó una PCR de colonia, donde se utilizaron oligonucleótidos que amplifican un segmento del vector pQE30 y toda la secuencia del inserto (pQE30Fw y pQE30Rv) dando un fragmento 317 pb. En la figura 5B se muestra un ejemplo del gel de agarosa de una PCR de colonia de la variante R5A, donde se pueden observar que las cinco colonias que se probaron dieron positivo para la PCR.

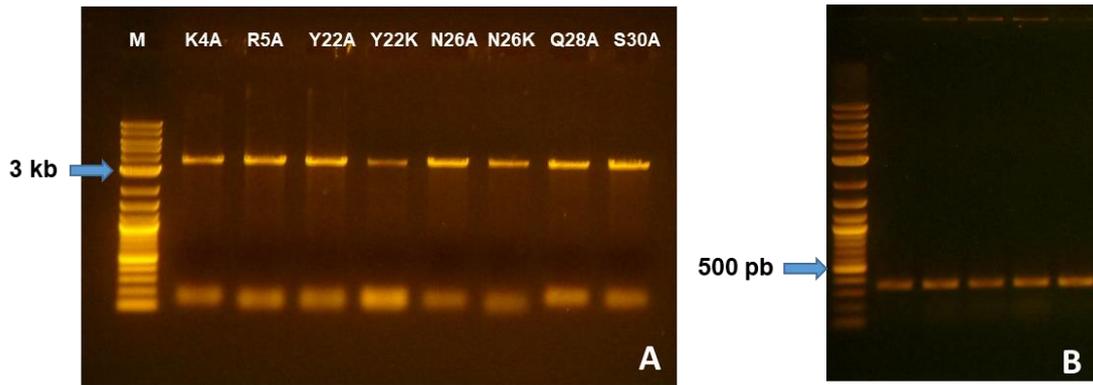


Figura 5. PCR mutagénica. A) PCR mutagénica de cada variante. **B)** PCR de colonia de la variante R5A. Se muestran el amplicón de cinco colonias tomadas al azar.

Gracias a la secuenciación se observó el remplazamiento de los codones blanco por el codón correspondiente a la alanina (GCG) o lisina (AAA), cambio que se observa de la misma forma en la secuencia aminoacídica (figura 6). Todas las secuencias mutantes fueron comparadas con la secuencia no mutada para verificar que solo se haya realizado el cambio deseado.

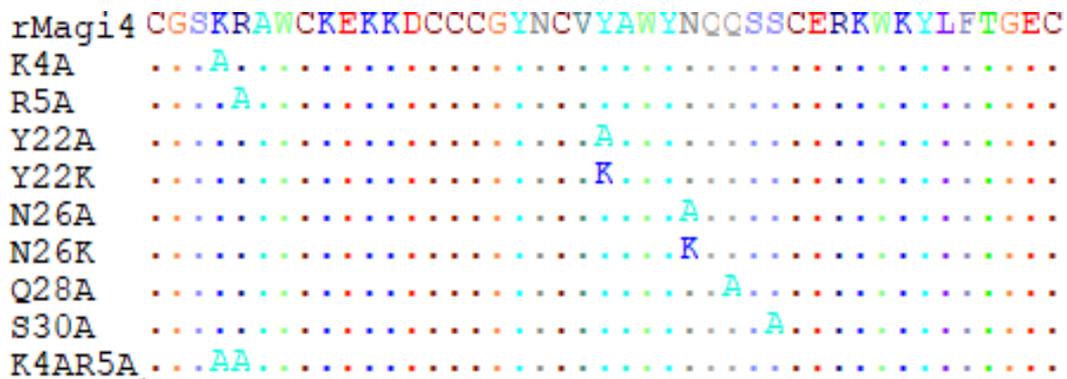


Figura 6. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la rMagi4 y todas las mutantes.

8.3) Expresión y caracterización de las variantes de rMagi4

Los estudios para determinar y confirmar el farmacóforo de las δ -ACTXs se han visto limitados por la incapacidad de producir eficientemente péptidos sintéticos o recombinantes plegados correctamente [4]. Anteriormente, las δ -ACTXs Ar1a y Magi4 se sintetizaron químicamente y se plegaron en condiciones *in vitro* [14, 43]. Sin embargo, la desventaja del proceso fue el rendimiento extremadamente bajo (10-15%) de este tipo de toxinas después del plegamiento. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue producir la δ -ACTX Magi4, especialmente algunas variantes de ésta, para dilucidar los aminoácidos clave implicados en su toxicidad para mamíferos e insectos. Una vez que la toxina rMagi4 fue mutada y que las mutaciones fueron corroboradas por secuenciación, el siguiente paso fue evaluar la expresión de cada toxina en *E. coli*. Desafortunadamente, después de varios intentos, no fue posible expresar las δ -ACTXs en forma soluble, obteniendo las proteínas en cuerpos de inclusión, los cuales posteriormente fueron solubilizados. Por lo tanto, se requirió realizar un plegamiento *in vitro* (detallado más adelante), que trajo dificultades de plegamiento similares a las reportadas para la síntesis química de las δ -ACTXs; es decir, bajos rendimientos debido a la fuerte tendencia de los péptidos a adherirse a las paredes del vidrio o plástico, y a la escasa solubilidad de los péptidos reducidos en los amortiguadores oxidantes durante el proceso de plegado [43]. Tales problemas fueron superados con una sobreproducción de péptidos recombinantes usando el sistema de *E. coli* (1.5-3 mg/L), y los pasos de plegamiento posteriores. En las figuras 7 y 8 se muestra el gel de poliacrilamida donde aparecen la toxina rMagi4 y todas sus variantes, de la misma forma se muestra el “Western-blot” donde se reconoce el “tag” de His de cada una de las toxinas. Todos los péptidos mostraron un patrón de migración en el SDS-PAGE similar a la toxina rMagi4 y todos fueron reconocidos por el anticuerpo anti-Histidinas. De la misma manera, el análisis realizado utilizando espectrometría de masas mostró que todos los péptidos tenían la masa teórica reducida esperada, y la masa teórica oxidada esperada (obtenida después del plegamiento *In vitro* mostrado en la siguiente sección) (cuadro 8).

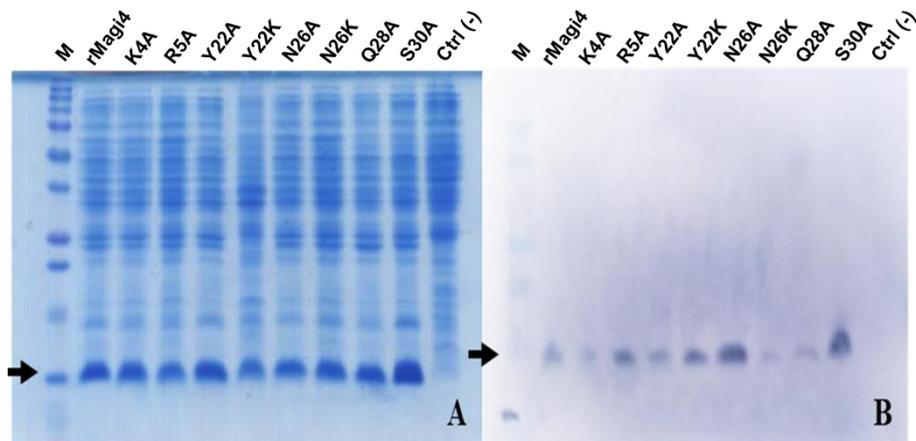


Figura 7. Caracterización de la expresión de rMagi4 y sus variantes. A) SDS-PAGE 16%. **B)** Westernblot. **M)** Marcador de peso molecular. La flecha representa la banda de 10 kDa.

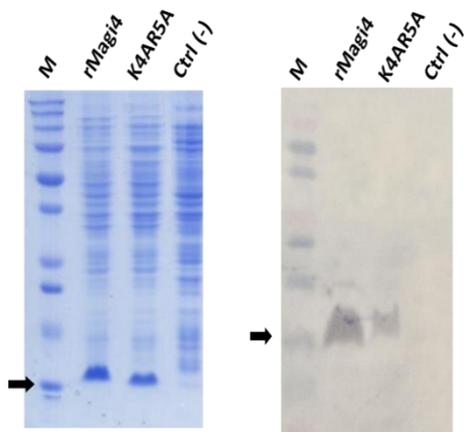


Figura 8. Caracterización de la expresión de K4AR5A. A) SDS-PAGE 16%. **B)** Westernblot. **M)** Marcador de peso molecular. La flecha representa la banda de 10 kDa.

Cuadro 8. Masas moleculares de rMagi4 y sus variantes.

Toxina	Masa reducida teórica (Da)	Masa reducida experimental (Da)	Masa oxidada teórica (Da)	Masa oxidada experimental (Da)
rMagi4	7068.9	7066.9	7060.9	7060.7
K4A	7011.8	7011.3	7003.8	7004.0
R5A	6983.8	6985.7	6975.8	6975.5
Y22K	7033.9	7032.5	7025.9	7025.4
Y22A	6976.8	6975.8	6968.8	6968.4
N26K	7083.0	7080.9	7075.0	7074.8
N26A	7025.2	7023.5	7017.2	7016.9
Q28A	7011.9	7010.9	7003.9	7003.0
S30A	7052.9	7052.3	7044.9	7043.6
K4AR5A	6926.8	6926.7	6918.8	6918.2

8.4) Plegamiento *In vitro*

Una vez que se confirmó la masa molecular esperada de todas las variantes, se realizó una reacción de plegamiento *in vitro*. Para evaluar el correcto plegamiento, y así facilitar la ubicación de la fracción correspondiente a la de una proteína adecuadamente plegada, se realizó una separación por FR-HPLC utilizando como control a la toxina sMagi4 (Magi4 sintética) usando el mismo gradiente de separación para la purificación de las toxinas presentes en las reacciones de plegamiento. Posteriormente, se purificó la reacción de plegamiento de la rMagi4 y de sMagi4, las cuales se redujeron y se oxidaron (plegaron) *in vitro*. En la figura 9 se muestran los cromatogramas de la separación por cromatografía en fase reversa antes mencionados. Las fracciones del plegamiento de la toxina rMagi4 y de la toxina sMagi4 fueron probadas vía intracraneal en ratones. La fracción marcada con rojo en cada uno de los cromatogramas representa la fracción con actividad tóxica. Se puede observar en los patrones cromatográficos de rMagi4 y sMagi4 una gran cantidad de fracciones, pero lo más interesante es que de todas las fracciones en ambos plegamientos solo una fracción presentó actividad tóxica. El tiempo de retención observado para la toxina sMagi4 sin reducir ni plegar fue de 47.8 min, mientras que para la fracción tóxica de la sMagi4 reducida y luego plegada fue de 47.9min y para la rMagi4 reducida y luego plegada de 48.1 min.

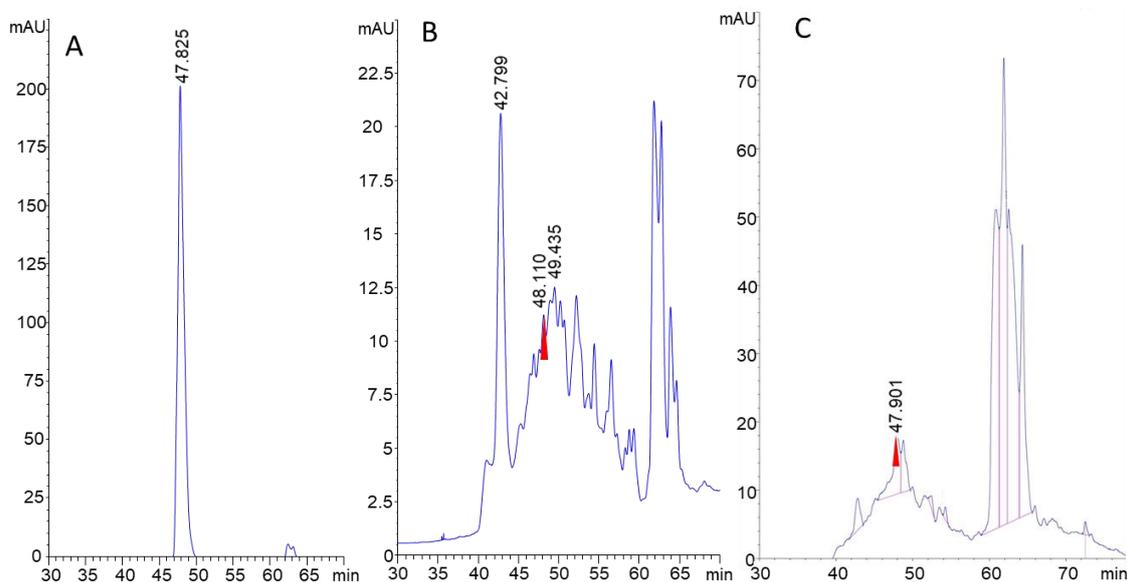


Figura 9. Purificación de los plegamientos *in vitro* de la toxina rMagi4 y sMagi4.

A) Toxina sMagi4, control. **B)** Plegamiento de toxina rMagi4. **C)** Plegamiento de toxina sMagi4.

Estos tiempos de retención con diferencias de 0.3 min sugieren que la conformación de la isoforma tóxica observada en el plegamiento de la rMagi4 y sMagi4 es muy similar a la conformación nativa de la proteína.

En el anexo 3 se muestran los cromatogramas de la purificación de la toxina rMagi4 y sus variantes después del plegamiento. Poco se conoce acerca del proceso de plegamiento en péptidos con nudo de cisteínas en artrópodos. Sin embargo, estudios con este tipo de péptidos de origen vegetal, han mostrado que diferencias en la secuencia de aminoácidos tienen un gran impacto en el proceso del plegamiento [44]. Además, en nuestro grupo de investigación, trabajos con neurotoxinas recombinantes de arácnidos ricas en puentes disulfuro, no necesariamente con nudo de cisteínas, a las cuales se le han modificado residuos en su estructura primaria, también han mostrado cambios en su perfil de plegamiento comparado con las proteínas sin modificar [45-48]. Este hecho podría explicar la diferencia en la cantidad de isoformas observadas en cada una de las variantes de rMagi4, siendo claramente las variantes donde se sustituyen los aminoácidos catiónicos (Lys4 y Arg5) las que modifican más drásticamente su plegamiento y el patrón de isoformas.

Las fracciones mayoritarias se recolectaron y analizaron por espectrometría de masas, mostrando en todos los casos la masa teórica esperada correspondiente al péptido oxidado, indicando que las ocho Cys se encontraban formando enlaces disulfuro (cuadro 8). Sin embargo, cuando se probaron 10 µg (hasta 40 µg en el caso de la Y22K y N26K) de cada fracción en ratones y grillos, solo una fracción mostró actividad tóxica (el mismo efecto observado en los primeros plegamientos). Existen otros reportes de expresión recombinante de toxinas en donde no importando el número Cys y el número de enlaces disulfuro, la toxina no pudo ser producida de forma soluble y después de la solubilización de los cuerpos de inclusión tuvieron que ser plegadas *in vitro*, obteniendo pocas isoformas, en algunos casos sola una isoforma con actividad biológica [33, 49-51]. En las reacciones de plegamiento realizadas en este trabajo se observaron hasta nueve isoformas mayoritarias (anexo 3), esto podría ser explicado por el inusual triplete de Cys que posee esta familia de toxinas. Se podría hipotetizar que la cercanía de estos tres aminoácidos dificulta la correcta interacción con cada una de sus contrapartes para formar el enlace disulfuro nativo, por lo que la cantidad de isoformas producidas aumentaría. Sin embargo, al igual que en los resultados antes mencionados, solo una fracción presenta la actividad tóxica. Esta fracción se purificó para usarla en experimentos posteriores (Anexo 4). En la figura 10 se muestra como ejemplo la purificación de la fracción tóxica de la toxina rMagi4 (no mutada).

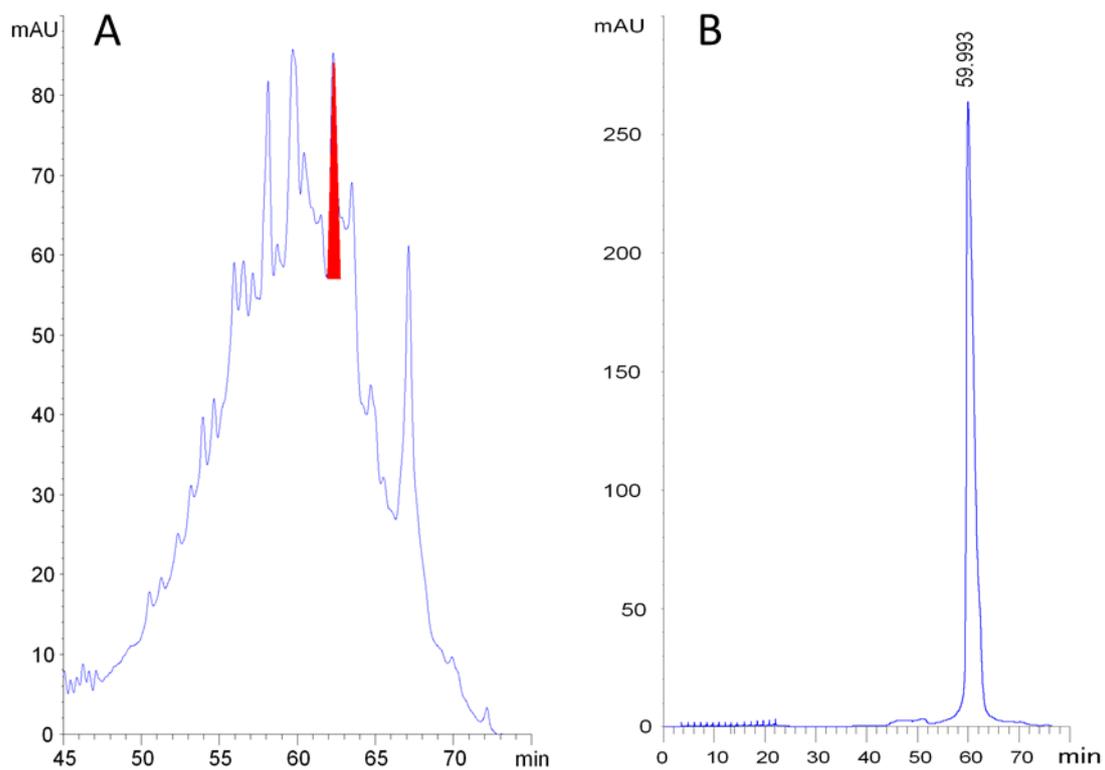


Figura 10. Purificación de la toxina rMagi4 no mutada por HPLC fase reversa.

A) Primer paso de purificación (desalación y concentración de fracciones). La fracción tóxica se muestra en rojo. **B)** Purificación final de la fracción tóxica.

8.5) Análisis biológicos

8.5.1) Toxicidad en ratones y en grillos

Una vez que se obtuvo de forma pura la fracción tóxica de rMagi4, y de cada una de las variantes, se evaluaron sus efectos tóxicos en ratones y grillos. Los ratones inyectados con las variantes tóxicas presentaron agitación, convulsiones, parálisis espástica y finalmente la muerte. Por otro lado, los grillos inyectados con las variantes tóxicas presentaron una parálisis inmediata. Los grillos paralizados podían mover lentamente sus extremidades y sus antenas, pero no saltaban ni se movían al recibir un estímulo. En el caso de los grillos la DL₅₀ de la toxina rMagi4 fue de 2 a 3 veces más alta que la dosis media paralizante (DP₅₀). En algunos casos los grillos podían estar paralizados por más de 24 h y posteriormente recuperarse de la parálisis. Por estos motivos, el efecto de las toxinas en los grillos se evaluó mediante la DP₅₀. En el cuadro 9 se muestran las DL₅₀ de los ratones y las DP₅₀ de los grillos, mismas que se pueden comparar en los histogramas mostrados en la figura 11.

Cuadro 9. Efecto tóxico de rMagi4 y sus variantes en ratones y grillos.

Toxina	DL ₅₀ Ratón (µg/20g)	EE (µg)	IC 95%	DP ₅₀ Grillo (µg/g)	EE (µg)	IC 95%
rMagi4	0.9	0.4	0.2 a 1.9	4.8	1	4.3 a 6.2
K4A	1.6	0.4	0.2 a 1.9	10.3	2.3	9.7 a 18.3
R5A	2.1	1.1	0.6 a 4.6	7.8	1.4	5.5 a 10.9
Y22A	2.6	1.2	1.2 a 5.8	6	1	4.3 a 8.2
Y22K	>39.1	N/C	N/C	34.8	4.4	27.3 a 43.6
N26A	4	1.2	2.2 a 6.5	10.3	2.3	9.7 a 18.3
N26K	13.4	6.7	3.8 a 29	32.9	4.9	18.4 a 36.6
Q28A	3.5	1.1	0.6 a 4.6	7.8	1.2	2.7 a 7.1
S30A	4	1.2	2.2 a 6.5	6.9	0.9	5.4 a 8,6
K4AR5A	1.6	0.5	0.9 a 2.6	23.1	2.9	18.2 a 29

EE: Error estándar, N/C: No calculado

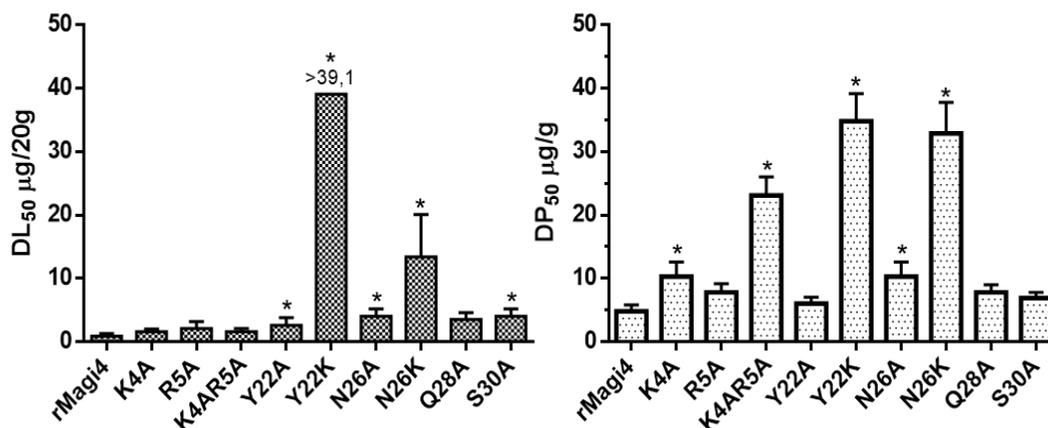


Figura 11. Efecto tóxico de rMagi4 y sus variantes en ratones y grillos. A) La DL₅₀ se calculó mediante inyección intracerebroventricular (icv) en solución salina en ratones adultos. **B)** La DP₅₀ se calculó mediante inyección torácica lateroventral en agua en grillos. Las barras representan el error estándar de la media. La significancia estadística (*) se definió con un valor P < 0.05.

En el caso de los ratones, el reemplazo de Tyr22 o Asp26 por Ala disminuyó la toxicidad del péptido 3 y 4 veces, respectivamente. Asimismo, la variante S30A mostró una disminución en su toxicidad de 4 veces. Cuando la Tyr22 o la Asn26 fueron reemplazadas por Lys, la toxicidad se redujo sustancialmente 43 y 15 veces, respectivamente. En el caso de los grillos, las variantes Y22K y N26K también presentaron la toxicidad más baja, 8 y 7 veces, respectivamente, en comparación con rMagi4 no mutada. Sin embargo, cuando la Tyr22 o la Asp26 fueron reemplazadas por Ala, a diferencia de los ratones, la actividad de la toxina se recuperó para Y22A, pero no totalmente para N26A, que todavía mostró una disminución de la toxicidad de 2 veces, similar al valor de toxicidad de la variante K4A. Además, las variantes R5A y Q28A mostraron un efecto ligeramente tóxico tanto en ratones como en grillos; sin embargo, no fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en comparación con el control rMagi4. Reportes previos mencionan que la Lys4 y la Arg5 podrían desempeñar un papel importante en la toxicidad y selectividad hacia mamíferos e insectos. Estas hipótesis se basan en la comparación entre las estructuras de las δ -ACTXs y las α -toxinas de alacranes [14, 27], junto con la falta de dichos residuos en Hv1b [52]. Cuando se probaron las mutantes K4A y R5A, la disminución en la toxicidad no estuvo presente en ratones, pero en los grillos la variante K4A mostró una disminución en su DP₅₀ de 2 veces. Una explicación a esto es la posibilidad de que para la toxicidad de Magi4 hacia ratones (mamíferos) no es suficiente eliminar solo una carga catiónica porque la restante (Arg5) puede interactuar con el canal de Na_v de mamíferos con la misma eficiencia que cuando se tenían los dos residuos catiónicos. De la misma manera, este efecto también podría extrapolarse con la interacción de la toxina con canal de Na_v en insectos. Sin

embargo, aquí hay que tomar en cuenta que la sustitución de Lys4 por Ala tuvo un efecto estadísticamente significativo en la reducción de la DP_{50} , por lo que en el caso de insectos este aminoácido estaría afectando de una manera más específica la interacción con el canal de Na_v . Para comprobar estas hipótesis, se realizó y probó la mutante K4AR5A. Se puede observar que la doble mutante no presenta diferencia significativa en la DL_{50} . Contrario a lo que se pensaba, en la toxicidad hacia mamíferos no se necesita solo una carga catiónica para interactuar con el canal, en realidad la toxina no requiere de estos residuos catiónicos para poder presentar el efecto tóxico en mamíferos. Caso muy distinto el observado con los grillos, donde la doble mutante presentó una reducción en la DP_{50} de 5 veces. Al parecer, al remplazar la Lys4 o la Arg5 por Ala, la carga restante era suficiente y el efecto en la toxicidad no fue tan drástico (siendo solo significativo el cambio K4A), sin embargo, al quitar ambas cargas la interacción se vio drásticamente afectada. Como se mencionó, δ -ACTX-Hv1b carece de los aminoácidos Lys4 y Arg5, pero a diferencia de Magi4, Hv1b tiene una carga positiva adicional, Arg3. Debido a esa proximidad, Arg3 podría proporcionar la carga positiva necesaria para interactuar con el canal de Na_v de insectos al no estar presentes ni la Lys4 ni la Arg5. Aun con esta carga positiva extra, el efecto de suplemento de carga no se observa en la toxina Hv1b, lo que da un poco de sustento a la hipótesis de la importancia de la Lys4 con el canal de Na_v de insectos. Cabe mencionar que la Arg5 en Hv1b es remplazada por un Asp (R5D), el cual podría ocasionar un efecto de repulsión de cargas que sobrepasa el efecto del suplemento de la carga positiva de la Lys4 por la de la Arg3. El efecto de adición de esta carga aniónica (Asp5) en la sección del N-terminal también pudiera explicar la baja actividad insecticida que posee la toxina δ -AOTX-Mg1b, una más de las toxinas de la familia de las δ -ACTXs. La toxina Mg1b conserva los residuos Lys4 y Arg5 (al igual que las otras toxinas de la familia de las δ -ACTXs), sin embargo, en la posición 6 posee un residuo aniónico, Glu, el cual es sustituido por una Ala o Asn en las otras δ -ACTXs más tóxicas a insectos. Por lo tanto, la cercanía de esta carga negativa a los residuos catiónicos en el N-terminal pudiera ser la culpable de su baja actividad insecticida [53].

Con respecto a las otras variantes, encontramos que la Tyr22 y la Asn26 mostraron la mayor disminución de la toxicidad en ambos modelos animales (aproximadamente 43 y 15 veces respectivamente, para ratones y 7 veces en ambas para grillos) cuando fueron reemplazados por Lys. Sin embargo, el efecto tóxico no fue estadísticamente significativo cuando dichos residuos fueron reemplazados por Ala, lo que implica que la adición de cargas positivas en la superficie ocupada por la Tyr22 y la Asn26 afecta drásticamente la toxicidad de Magi4. En el pasado, se descubrió que la Tyr22 y otros aminoácidos que ocupaban dicha posición espacial son necesarios para la toxicidad de las α -toxinas de alacrán [14]. La Tyr22 y la Asp26, así como

los otros residuos estudiados, se encuentran en una región muy bien conservada dentro de la familia de las δ -ACTXs, conformada principalmente por residuos hidrofóbicos y polares sin carga. Cuando uno de estos aminoácidos fue reemplazado por Ala, el efecto en la toxicidad fue muy bajo, la sustitución no tuvo un gran impacto en la interacción de la toxina con su receptor. Sin embargo, cuando los aminoácidos Tyr22 y Asp26 fueron reemplazados por Lys (sustituciones encontradas en la toxina δ -ACTXs-Hv1b), la adición de cargas positivas en esta región pudo significar un amplio efecto de repulsión, haciendo imposible que la toxina variante interactuara con el receptor.

8.6) Análisis estructural mediante dicroísmo circular

Las toxinas recombinantes expresadas y plegadas mostraron tiempos de retención cromatográficos similares durante su separación hidrofóbica por FR-HPLC, lo cual indirectamente indica que exponen superficies moleculares similares, obviamente variando los tiempos de retención de manera leve por las modificaciones en los aminoácidos llevadas a cabo. Sin embargo, fue importante confirmar que presentan una estructura secundaria similar a las toxinas de la familia δ -ACTXs. Los espectros de dicroísmo circular (DC) de las proteínas expresadas se compararon con el espectro de DC de la δ -ACTX-Mg1a nativa (Magi4) (figura 12A). Todos los péptidos recombinantes mostraron patrones de DC similares a los de Magi4 nativa. Presentaron porcentajes altos de lámina β antiparalela representada por un espectro mínimo y máximo a 208 nm y 194 nm, respectivamente. Es importante mencionar que las láminas β antiparalelas son la principal estructura secundaria de las δ -ACTXs [27]. Además, también se encontraron estructuras de hélice α con mínimos de absorbancia a 220 nm. Todos los espectros de DC se evaluaron utilizando el software de deconvolución "Bestsel" para poder comparar los porcentajes de estructura secundaria de todos los péptidos recombinantes. La figura 12B muestra que los porcentajes de las estructuras secundarias entre los péptidos recombinantes y el nativo fueron muy similares. Las mayores desviaciones en la estructura secundaria se observaron en la variante K4A, la cual tuvo una proporción ligeramente menor de láminas β en comparación con los otros péptidos recombinantes. En el caso opuesto la variante Q28A mostró un aumento en la proporción de la misma estructura secundaria. Además, la proporción de hélice α fue la estructura secundaria más conservada entre todos los péptidos recombinantes. Aunque la Lys4 (variante K4A) no es parte de la horquilla β dentro de la estructura de la δ -ACTX, se sabe que la propensión a la generación de la lámina β en una proteína se ve afectada no solo por los aminoácidos dentro de la estructura de la lámina β , sino por todos los aminoácidos que la rodean en la estructura [54]. Es decir, el residuo catiónico (Lys4) se encuentra muy cerca de dicha lámina β ; entonces, el efecto de la carga positiva podría ayudar a mantener la estabilidad

de la lámina β en la toxina, y cuando fue reemplazada por Ala, de alguna manera se modificó la organización de la estructura de la horquilla β . Por otro lado, la Gln28 (variante Q28A) se encuentra detrás del primer residuo incluido en la lámina β , aunque la Gln y la Ala tienen una propensión similar a generar láminas β [54], el contexto de los residuos circundantes podría generar un aumento en la fracción de lámina β cuando la Gln28 fue reemplazada por Ala. Aunque se esperaba que la variante K4AR5A se comportara de manera similar a la de la variante Lys4A, su estructura secundaria fue más similar a la de la variante Gln28A pero con un aumento menor en el porcentaje de láminas β .

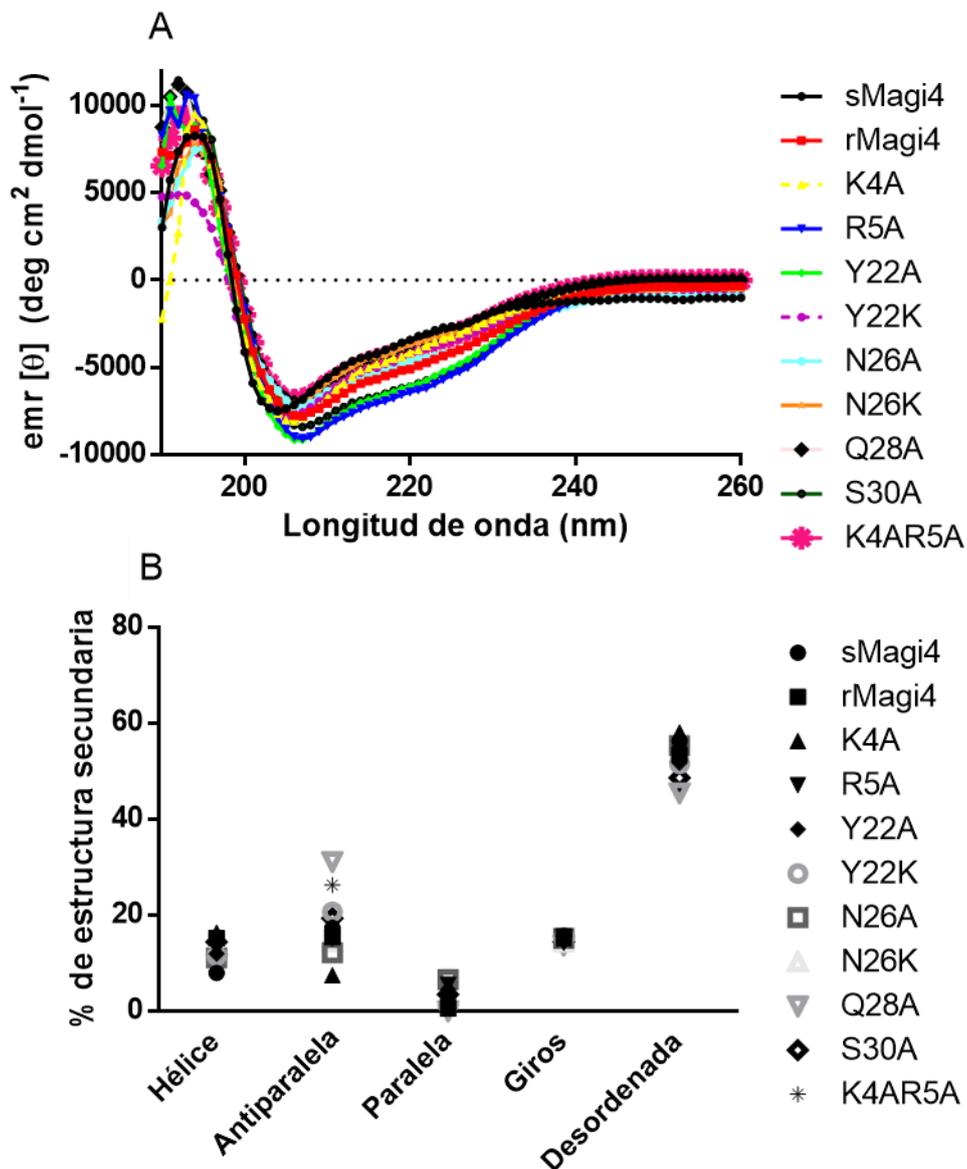


Figura 12. Dicroísmo circular de rMagi4 y variantes. A) Comparación del espectro de DC de Magi4 sintética (sMagi4) con el espectro de rMagi4 y variantes. B) Comparación del porcentaje de estructura secundaria de sMagi4 y recombinantes.

8.7) Análisis de alineamientos estructurales entre α -toxinas

Gordon *et al.* [55] reportan que para las α -toxinas de alacrán, los aminoácidos involucrados en la toxicidad y la selectividad se encuentran agrupados estructuralmente en dos dominios muy marcados. El primero es el dominio núcleo (Core-Domain), conformado predominantemente por aminoácidos catiónicos, aromáticos e hidrofóbicos. Este dominio juega un papel importante en el reconocimiento y la selectividad. El segundo es el dominio NC, conformado por una variedad más amplia de aminoácidos el cual juega un rol importante en la selectividad. Estas superficies bioactivas están conservadas entre α -toxinas de alacrán que afectan ya sea a insectos, a mamíferos o ambos (figura 13).

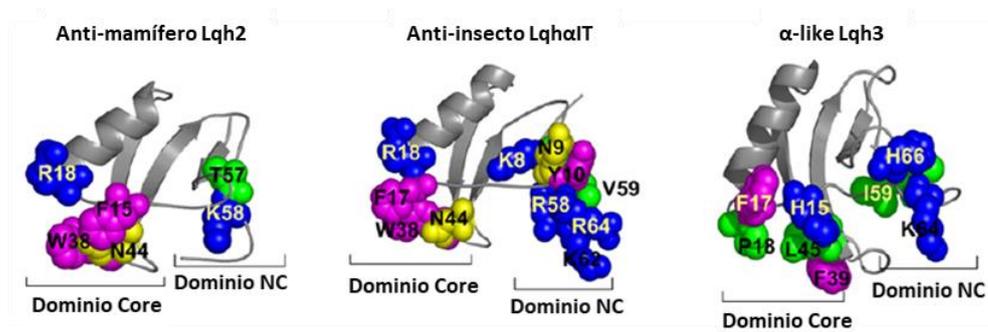


Figura 13. Superficies bioactivas presentes en las α -toxinas de alacrán.

En este trabajo fue interesante probar si estos dominios estaban presentes en las δ -ACTXs en función de los resultados de las sustituciones de aminoácidos en rMagi4. El cuadro 10 muestra los alineamientos estructurales realizados con el algoritmo TM-align. Un TM-score $>0,5$ representa toxinas con estructuras altamente homólogas. El alineamiento entre Magi4 y Cg1a fue el único en superar este valor. Sin embargo, incluso con la diferencia estructural entre las toxinas de alacrán, anémona y Magi4, se muestra (como se observa en las estructuras descritas más adelante) que el parche hidrofóbico de Magi4 se superpone con aminoácidos que forman el dominio Core de las toxinas de alacrán y con el parche de importancia para la actividad en la toxina de anémona.

Anteriormente, Clairfeuille *et al.* [56] mostraron mediante criomicroscopía electrónica los aminoácidos que interactúan en la unión entre la toxina AaH2 y el canal de Na_v, debido a esto, la toxina de alacrán AaH2 (PDB: 1AHO) se utilizó como modelo para validar los dominios descritos en las α -toxinas de alacrán. La figura 14 muestra la estructura 3D de la AaH2 donde se resaltan los aminoácidos involucrados en la interacción de AaH2-Na_v, se pueden notar dos regiones en la superficie (figura 14A), cuando la AaH2 se alinea con la α -toxina de alacrán Lqh α IT (PDB: 2ASC, figura 14B), se observa que ambas toxinas comparten la misma área espacial dentro de los dominios Core y NC descritos anteriormente para Lqh α IT (figura 14C). Al comparar la AaH2 con Magi4 (PDB: 2ROO), los aminoácidos Lys4, Arg5, Tyr22, Asp26 y Ser30 de Magi4 se resaltan (figura 14D) y se alinean con los dominios Core y NC de la AaH2 (figura 14E). Se puede observar que la región que se alinea con el dominio Core (púrpura) se superpone en la misma posición, sin embargo, la región que se alinea con el dominio NC no se superpone, pero ambas asas en AaH2 y en Magi4 están orientadas estructuralmente. Se observaron hallazgos similares cuando las estructuras tridimensionales de Magi4 y Lqh α IT fueron alineadas (figura 14F). Vale la pena aclarar que los aminoácidos que se encuentran en el parche catiónico (residuos K4 y R5) en Magi4 tampoco aparecieron superpuestos cuando se utilizó el algoritmo TM-align. Sin embargo, esto puede explicarse debido al tamaño desproporcionado de las asas de las toxinas de alacrán cuando se comparan con el asa de Magi4. Los aminoácidos encontrados en el parche catiónico de Magi4 se superponen con los aminoácidos justo detrás de los aminoácidos encontrados en el dominio-NC que muestra la misma ubicación espacial.

En las α -toxinas de alacrán el dominio Core está implicado en la interacción con el receptor y el reconocimiento del sitio 3 del receptor y el dominio NC juega un papel importante en la especificidad de la toxina [55]. A pesar de la falta de homología, la longitud de la proteína y el plegamiento tridimensional totalmente diferente, la alineación de Magi4 y AaH2 mostró que los residuos de Magi4 involucrados en la actividad tóxica están ubicados en la misma región espacial donde se encuentran el dominio Core y NC en AaH2 [56]. Además, los aminoácidos ubicados en las superficies bioactivas de Magi4 y AaH2 comparten características similares en dichos dominios (lo mismo se observó en el alineamiento de Magi4 y Lqh α IT). En las α -toxinas de alacrán, se sugiere que el mecanismo detrás de la selectividad por el dominio NC involucra diferentes estados conformacionales de las toxinas, donde el asa que conforma el dominio NC presenta una conformación *cis* en toxinas anti-insectos, una conformación *trans* en toxinas anti-mamíferos y un dominio más flexible para toxinas anti-mamíferos/insectos (α -like) [55]. Es posible que para la familia de las δ -ACTXs otro mecanismo de selectividad esté involucrado. Un mecanismo que involucre residuos específicos en lugar de un asa flexible; tal hipótesis explicaría

cómo Lys4 es importante para la actividad tóxica en los grillos, pero no en los ratones. Aunque no se han realizado estudios estructurales sobre la flexibilidad del asa en Magi4, este dominio NC que contiene los residuos Lys4 y Arg5 no mostró señales estructurales de diferente isomerización conformacional cuando se realizaron estudios de RMN para dilucidar la estructura de Magi4 y Hv1a [14, 27].

Por otro lado, el parche hidrofóbico (donde se encuentran los aminoácidos Tyr22, Asp26 y Ser30) podría ser la región homóloga al dominio Core por las siguientes razones; 1) la naturaleza química del dominio Core en la AaH2 está dominada por residuos hidrofóbicos y polares sin carga [56], muy similar al parche hidrofóbico en Magi4; 2) el dominio Core está implicado en la selectividad del sitio 3 en el canal de Na_v, y el hecho de que las toxinas Hv1a, Ar1a y Magi4 compiten en términos de la unión a este receptor con α -toxinas de alacrán [14, 27] y 3) el efecto de agregar cargas positivas que perturban la superficie hidrofóbica y no polar, lo que disminuye la actividad biológica, respalda la hipótesis de un papel similar de los residuos hidrofóbicos en las δ -ACTXs y el dominio Core en las α -toxinas de alacrán.

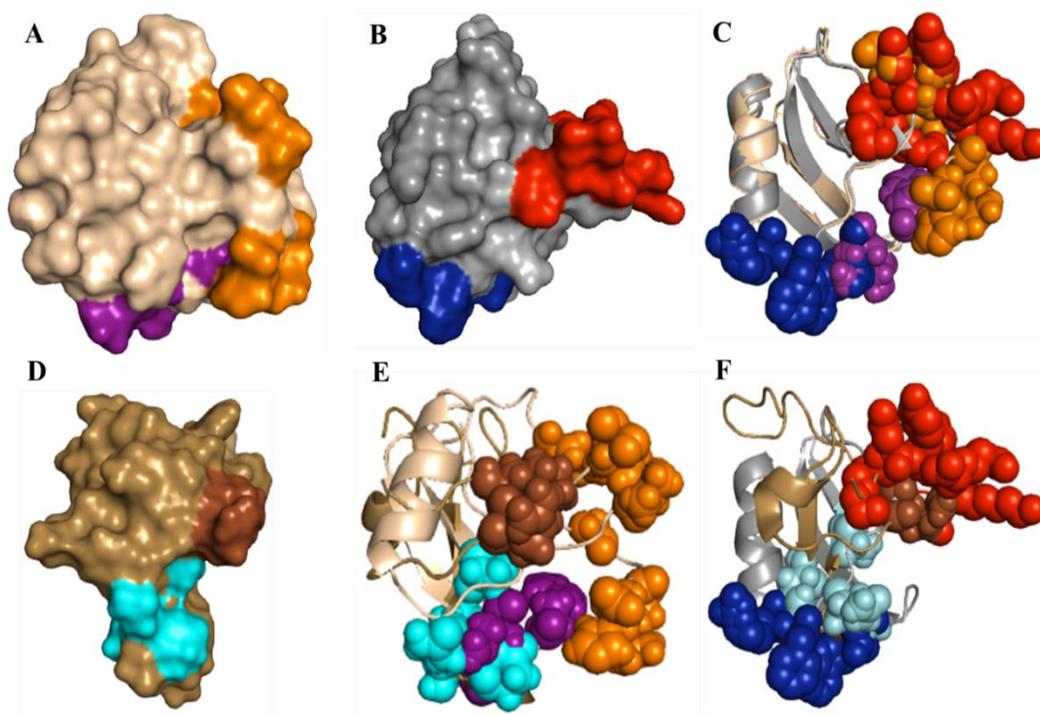


Figura 14. Alineamiento estructural entre las α -toxinas de alacrán y Magi4. **A)** toxina α anti-mamífero AaH2 (PDB: 1AHO): en naranja el dominio NC, en púrpura el dominio Core. **B)** toxina α anti-insecto Lqh α IT (PDB: 2ASC): en rojo el dominio NC, en azul el dominio Core. **C)** Alineamiento estructural de las toxinas Lqh α IT y AaH2. **D)** Magi4 (PDB: 2ROO): en marrón el dominio NC y en cian el dominio Core. **E)** Alineamiento estructural de las toxinas Magi4 y AaH2. **F)** Alineamiento estructural de las toxinas Magi4 y Lqh α IT. Los átomos que se encuentran en ambos dominios se presentan en modelos de esfera en los alineamientos para apreciar mejor las zonas superpuestas.

Para evaluar si el parche catiónico y el parche hidrofóbico en Magi4 se conservan en otras α -toxinas de araña, se comparó la estructura de Magi4 y la toxina de araña Cg1a (PDB: 2A2V) (figura 15A). El asa que forma el parche catiónico en Magi4 está acoplado el asa en la toxina Cg1a que contiene, al igual que Magi4, en un par de aminoácidos catiónicos (Lys4/Arg5 en Magi4, Arg3/Lys4 en Cg1a). Por otro lado, el asa que comparte la misma región con el parche hidrofóbico está conformado por aminoácidos como Thr24, Leu25, Lys26 y Tyr27, que forman una superficie bioactiva con características químicas similares a los dominios Core de α -toxinas de alacrán. Este análisis revela que los dominios NC y Core pueden encontrarse no solo en las α -toxinas de alacrán sino también en las α -toxinas de araña donde desempeñan un papel clave en su mecanismo de acción.

Para conocer la importancia de los dominios NC y Core en otras neurotoxinas no perteneciente a arácnidos, se realizó un análisis comparativo similar utilizando la neurotoxina de anémone de mar Axm1b (PDB: 1APF), cuyo mecanismo de acción también se basa en la unión al sitio 3 del canal de Na^v. Aquí, los aminoácidos importantes para la toxicidad en Axm1b [57-59] se marcaron

y se alinearon estructuralmente con la toxina Magi4. Aunque los aminoácidos en Axm1b forman dos superficies bioactivas (figura 15B), en el alineamiento estructural no se superpusieron estos residuos con los parches en Magi4. Esto pudiera deberse a que la diferencia entre la estructura de las toxinas ya es tan grande que no es posible alinearlas, lo que es comprobado por el TM-score más bajo obtenido en los alineamientos. Sin embargo, si el alineamiento se realiza solo con las regiones individuales donde se encuentra cada grupo de aminoácidos, uno de ellos se superpone con el parche hidrofóbico de Magi4 (figura 15C). La región superpuesta está conformada por aminoácidos típicamente encontrados en esta región en las α -toxinas de alacrán. Esta región se denominada como el asa de la Arg14 y es la superficie bioactiva que agrupa la mayoría de los aminoácidos que aportan el mayor efecto en la actividad de la toxina de anémona [60]. Además, al igual que como se vio en este trabajo, la mayoría de los contactos que se llevan a cabo entre esta asa y el canal parecieran ser hidrofóbicos, ya que al remplazar los aminoácidos Asn16 y Ser18 por Ala el efecto en la afinidad es pequeño, sin embargo, al introducir cargas (Arg o Asp) el efecto se vuelve drástico [61]. Por otro lado, la superficie faltante no se superpuso ni con el parche catiónico ni con el parche hidrofóbico; sin embargo, esta superficie también está conformada por aminoácidos catiónicos (Lys48 y Lys49). Por lo tanto, podríamos especular la existencia de ambas superficies en la α -toxinas de anémona, el parche catiónico y el parche hidrofóbico. Con suerte, en un futuro cercano, la elucidación de nuevos farmacóforos involucrados en la selectividad y especificidad de las α -toxinas (independientemente de las especies venenosas) que interactúan con el sitio 3 de los canales de Na_v se encontrarán dentro de estos “clusters” compartidos entre las toxinas, lo que podría mejorar la oportunidad de encontrar nuevos péptidos con un potencial uso clínico.

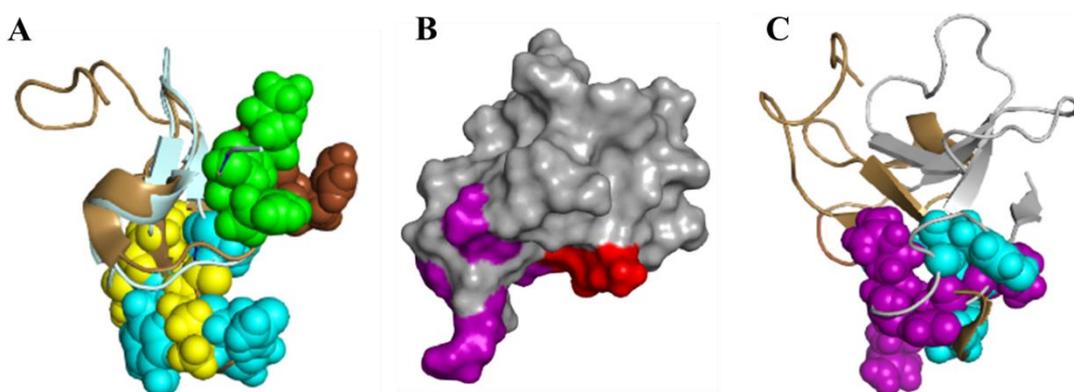


Figura 15. Alineamiento estructural de Magi4 con Cg1a y Axm1b. **A)** Alineamiento estructural de las toxinas Magi4 y Cg1a. La estructura de Magi4 (arena, PDB: 2ROO) se muestra con el dominio Core en cian y el dominio NC en marrón, y la estructura de Cg1a (azul claro, PDB: 2A2V) se muestra con el dominio Core en amarillo y el dominio NC en verde. **B)** Toxina Axm1b (PDB: 1APF). Las superficies bioactivas de la toxina se muestran en morado y rojo. **C)** Alineamiento estructural del supuesto dominio Core (púrpura) en la toxina Axm1b (gris) y el dominio Core (cian) en la toxina Magi4 (arena).

9) CONCLUSIONES

- ❖ Con el protocolo de expresión y plegamiento *in vitro* utilizado se obtuvo la toxina rMagi4 y 9 variantes de ésta, las cuales presentaron actividad biológica y características iguales a las esperadas al ser analizadas por electroforesis, HPLC, espectrometría de masas y dicroísmo circular.
- ❖ Las mutaciones Y22K y N26K tienen un fuerte impacto disminuyendo la actividad tóxica de la toxina Magi4 debido a la adición de cargas.
- ❖ Existen mutaciones que afectan sutilmente la toxicidad en alguno de los dos modelos (K4A, Y22A y S30A) probados. Sin embargo, la doble mutación K4A/R5A disminuye sustancialmente la actividad tóxica de la toxina solo en el modelo de insectos, lo que sugiere un motivo que provee selectividad interespecie.
- ❖ Los aminoácidos que afectan la toxicidad de la toxina Magi4 se encuentran en dos superficies bioactivas, las cuales también están presentes en otras α -toxinas de araña, α -toxinas de alacrán y toxinas de anémona. Esto implica que estas regiones son sumamente importantes para las toxinas que se unen al sitio 3 en los canales de Na_v , no importando la especie.
- ❖ De acuerdo con la hipótesis del presente trabajo, los aminoácidos conservados en la familia de las δ -ACTXs que no están conservados en la toxina Hv1b están implicados en la actividad tóxica de la toxina Magi4, ya sea en la toxicidad en general (aminoácidos encontrados en el parche hidrofóbico), o en la selectividad interespecie (aminoácidos del parche catiónico).

10) REFERENCIAS

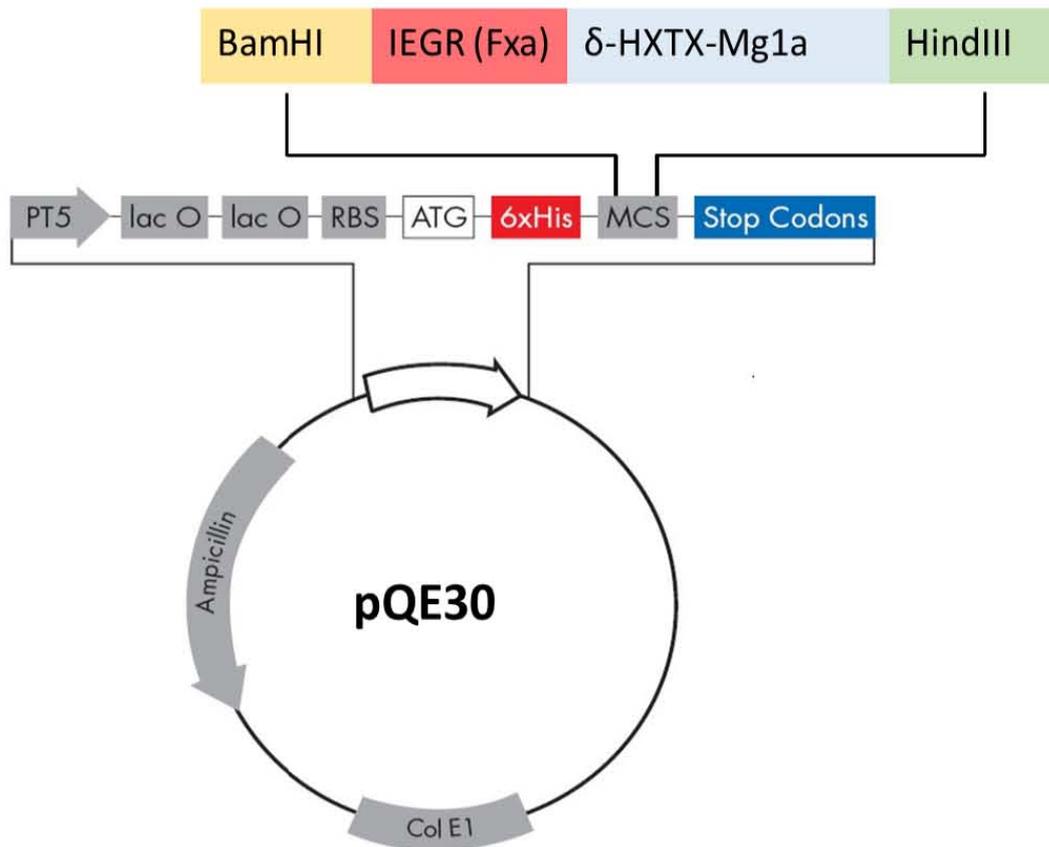
1. Rash LD, H.W., *Pharmacology and biochemistry of spider venoms*. *Toxicon*, 2002. **40**(3): p. 225-254.
2. Catalog, W.S., *World Spider Catalog. Version 20.5*. Natural History Museum Bern. 2020.
3. Luch, A., *Mechanistic insights on spider neurotoxins*. *EXS*, 2010. **100**: p. 293-315.
4. Wilson, D.T.R., *The Venom of Australian Spiders*. In Gopalakrishnakone, P., Corzo, G., Lima, M. E., & Diego-García, E. (Eds.), *Spider Venoms, Toxinology Series*. Netherlands: Springer, 2016: p. 21-43.
5. Rash LD, H.W., *Pharmacology and biochemistry of spider venoms*. *Toxicon*, 2002. **40**(3): p. 225-254.
6. Gomes, P.C. and M.S. Palma, *The Nonpeptide Low Molecular Mass Toxins from Spider Venoms*. In Gopalakrishnakone, P., Corzo, G., Lima, M. E., & Diego-García, E. (Eds.), *Spider Venoms, Toxinology Series*. Netherlands: Springer, 2016: p. 3-19.
7. Pitschmann, V. and Z. Hon, *Military Importance of Natural Toxins and Their Analogs*. *Molecules*, 2016. **21**(5).
8. Klint, J.K., et al., *Spider-venom peptides that target voltage-gated sodium channels: pharmacological tools and potential therapeutic leads*. *Toxicon*, 2012. **60**(4): p. 478-91.
9. Pineda, S.S., et al., *Spider venomomics: implications for drug discovery*. *Future Med Chem*, 2014. **6**(15): p. 1699-714.
10. Peters, C.H. and P.C. Ruben, *Introduction to sodium channels*. In Peters, C.H. *Voltage gated sodium channels. Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer, 2014. **221**: p. 1-6.
11. Cardoso, F.C. and R.J. Lewis, *Sodium channels and pain: from toxins to therapies*. *Br J Pharmacol*, 2018. **175**(12): p. 2138-2157.
12. Egri, C., Y.Y. Vilin, and P.C. Ruben, *A thermoprotective role of the sodium channel beta1 subunit is lost with the beta1 (C121W) mutation*. *Epilepsia*, 2012. **53**(3): p. 494-505.
13. Yu, F.H. and W.A. Catterall, *Overview of the voltage-gated sodium channel family*. *Genome Biol.*, 2003. **4**(3): p. 207.
14. Yamaji, N., et al., *Synthesis, solution structure, and phylum selectivity of a spider delta-toxin that slows inactivation of specific voltage-gated sodium channel subtypes*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(36): p. 24568-82.
15. Payandeh, J., et al., *The crystal structure of a voltage-gated sodium channel*. *Nature*, 2011. **475**(7356): p. 353-8.
16. Stevens, M., S. Peigneur, and J. Tytgat, *Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels*. *Front Pharmacol*, 2011. **2**: p. 71.
17. McCusker, E.C., et al., *Structure of a bacterial voltage-gated sodium channel pore reveals mechanisms of opening and closing*. *Nat Commun*, 2012. **3**: p. 1102.
18. Chanda, B. and F. Bezanilla, *Tracking voltage-dependent conformational changes in skeletal muscle sodium channel during activation*. *J Gen Physiol*, 2002. **120**(5): p. 629-45.
19. Capes, D.L., et al., *Domain IV voltage-sensor movement is both sufficient and rate limiting for fast inactivation in sodium channels*. *J Gen Physiol*, 2013. **142**(2): p. 101-12.
20. Vargas, E., et al., *An emerging consensus on voltage-dependent gating from computational modeling and molecular dynamics simulations*. *J Gen Physiol*, 2012. **140**(6): p. 587-94.
21. Nicholson, G.M., *Insect-selective spider toxins targeting voltage-gated sodium channels*. *Toxicon*, 2007. **49**(4): p. 490-512.
22. Namadurai, S., et al., *A new look at sodium channel beta subunits*. *Open Biol*, 2015. **5**(1): p. 140192.

23. Dong, K., et al., *Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2014. **50**: p. 1-17.
24. Hedin, M., et al., *Phylogenomic reclassification of the world's most venomous spiders (Mygalomorphae, Aracinae), with implications for venom evolution*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 1636.
25. Nicholson, G.M., et al., *Arachnid toxinology in Australia: from clinical toxicology to potential applications*. *Toxicon*, 2006. **48**(7): p. 872-98.
26. Nicholson, G.M. and A. Graudins, *Spiders of medical importance in the Asia-Pacific: atracotoxin, latrotoxin and related spider neurotoxins*. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, 2002. **29**: p. 785-794.
27. Little, M.J., et al., *δ -Atracotoxins from Australian funnel-web spiders compete with scorpion α -toxin binding on both rat brain and insect sodium channels*. *FEBS Letters*, 1998. **439**: p. 246-252.
28. Nicholson, G.M., et al., *Characterisation of the effects of robustoxin, the lethal neurotoxin from the Sydney funnel-web spider *Atrax robustus*, on sodium channel activation and inactivation*. *Pflugers Arch.*, 1998. **436**(1): p. 117-126.
29. Corzo, G., et al., *Distinct primary structures of the major peptide toxins from the venom of the spider *Macrothele gigas* that bind to sites 3 and 4 in the sodium channel1*. *FEBS Letters*, 2003. **547**(1-3): p. 43-50.
30. Lavergne, V., et al., *Peptide therapeutics from venomous creatures*. In: *Pain Therapeutics: Current and Future Treatment Paradigms*. Royal Society of Chemistry, 2014: p. 217-246.
31. Netirojjanakul, C. and L.P. Miranda, *Progress and challenges in the optimization of toxin peptides for development as pain therapeutics*. *Curr Opin Chem Biol*, 2017. **38**: p. 70-79.
32. Estrada, G., et al., *Heterologous expression of five disulfide-bonded insecticidal spider peptides*. *Toxicon*, 2016. **119**: p. 152-8.
33. Clement, H., et al., *A comparison between the recombinant expression and chemical synthesis of a short cysteine-rich insecticidal spider peptide*. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 2015. **21**: p. 19.
34. Meng, E., et al., *Functional expression of spider neurotoxic peptide huwentoxin-I in *E. coli**. *PLoS One*, 2011. **6**(6): p. e21608.
35. Lavergne, V., et al., *The structural universe of disulfide-rich venom peptides*. En: *Kling, G.F. Venoms to drugs: venom as a source for the development of human therapeutics* RSC Drug Discov, 2015: p. 37-79.
36. Turchetto, J., et al., *High-throughput expression of animal venom toxins in *Escherichia coli* to generate a large library of oxidized disulphide-reticulated peptides for drug discovery*. *Microb Cell Fact*, 2017. **16**(1): p. 6.
37. de Marco, A., *Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli**. *Microb Cell Fact*, 2009. **8**: p. 26.
38. Ke, N. and M. Berkmen, *Production of Disulfide-Bonded Proteins in *Escherichia coli**. *Curr Protoc Mol Biol*, 2014. **108**: p. 16 1B 1-21.
39. Hidaka, Y., *Overview of the regulation of disulfide bond formation in Peptide and protein folding*. *Curr Protoc Protein Sci*, 2014. **76**: p. 28 6 1-6.
40. Liu, H. and J.H. Naismith, *An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol*. *BMC Biotechnol*, 2008. **8**: p. 91.
41. Dixon, W.J., *The Up-and-Down method for small samples*. *J. Am. Stat. Assoc.*, 1965. **60**: p. 967-978.
42. Zhang, Y. and J. Skolnick, *TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the TM-score*. *Nucleic Acids Res*, 2005. **33**(7): p. 2302-9.
43. Alewood D., B.-S.L.C., Norton R.S., Nicholson G.M., Pallaghy P.K., and Alewood P.F., *Synthesis and Characterization of δ -Atracotoxin-Ar1a, the Lethal Neurotoxin from*

- Venom of the Sydney Funnel-Web Spider (Atrax robustus)*. Biochemistry, 2003. **42**: p. 12933-12940.
44. Daly, N.L. and D. Wilson, *Structural diversity of arthropod venom toxins*. Toxicon, 2018. **152**: p. 46-56.
 45. Estrada-Tapia, G., *Obtención de toxinas recombinantes ricas en puentes disulfuro para estudios de la relación estructura-función (Tesis de Doctorado)*. Instituto de Biotecnología. UNAM. Cuernavaca, Morelos, México., 2008.
 46. Hernández-Salgado, K., *Expresión heteróloga de variantes tóxicas y no tóxicas de la toxina CsslI y su evaluación como inmunógenos (Tesis de Maestría)*. Instituto de Biotecnología. UNAM. Cuernavaca, Morelos, México., 2009.
 47. Ibarra-Vega, R., *Análisis de variaciones en residuos en la región n-terminal de la beta-neurotoxina cssII y su especificidad hacia subtipos de canales de sodio dependientes de voltaje (Tesis de Maestría)*. Instituto de Biotecnología. UNAM. Cuernavaca, Morelos, México., 2015.
 48. Aguilar-Carlos, G.O., *Permutaciones de las asas de Ts1 por aquellas de la neurotoxina CsslI : análisis del plegamiento y especificidad sobre canales de sodio dependientes de voltaje (Tesis de Maestría)*. Instituto de Biotecnología. UNAM. Cuernavaca, Morelos, México. , 2019.
 49. Yang, F., et al., *Expression of recombinant alpha-toxin BmKM9 from scorpion Buthus martensii Karsch and its functional characterization on sodium channels*. Peptides, 2018. **99**: p. 153-160.
 50. Titaux-Delgado, G., et al., *Successful refolding and NMR structure of rMagi3: A disulfide-rich insecticidal spider toxin*. Protein Sci, 2018. **27**(3): p. 692-701.
 51. Bae, C., et al., *High yield production and refolding of the double-knot toxin, an activator of TRPV1 channels*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51516.
 52. Szeto, T.H.B.-S., L.C.; Smith, R.; Connor, M.; Christie, M.J.; King, G.F.; Nicholson G.M., *Isolation and pharmacological characterisation of δ -atracotoxin-Hv1b, a vertebrate-selective sodium channel toxin*. FEBS Letters, 2000. **470**: p. 293-299.
 53. Gunning, S.J., et al., *Isolation of δ -missulenatoxin-Mb1a, the major vertebrate-active spider δ -toxin from the venom of Missulena bradleyi (Actinopodidae)*. FEBS Letters, 2003. **554**(1-2): p. 211-218.
 54. Fujiwara, K., H. Toda, and M. Ikeguchi, *Dependence of alpha-helical and beta-sheet amino acid propensities on the overall protein fold type*. BMC Struct Biol, 2012. **12**: p. 18.
 55. Gordon, D., et al., *The differential preference of scorpion alpha-toxins for insect or mammalian sodium channels: implications for improved insect control*. Toxicon, 2007. **49**(4): p. 452-72.
 56. Clairfeuille, T., et al., *Structural basis of alpha-scorpion toxin action on Nav channels*. Science, 2019. **363**(6433).
 57. Seibert, A.L., et al., *Role of Asn-16 and Ser-19 in anthopleurin B binding. Implications for the electrostatic nature of Na(V) site 3*. Biochemistry, 2004. **8**(43(22)): p. 7082-7089.
 58. Dias-Kadambi, B.L., et al., *Leucine 18, a hydrophobic residue essential for high affinity binding of anthopleurin B to the voltage-sensitive sodium channel*. J Biol Chem., 1996. **19**(271(16)): p. 9422-9428.
 59. Khera, P.K. and K.M. Blumenthal, *Role of the cationic residues arginine 14 and lysine 48 in the function of the cardiotoxic polypeptide anthopleurin B*. J Biol Chem., 1994. **14**(269(2)): p. 921-925.
 60. Moran, Y., D. Gordon, and M. Gurevitz, *Sea anemone toxins affecting voltage-gated sodium channels--molecular and evolutionary features*. Toxicon, 2009. **54**(8): p. 1089-101.
 61. Hanck, D.A. and M.F. Sheets, *Site-3 Toxins and Cardiac Sodium Channels*. Toxicon, 2007. **49**(2): p. 181-193.

11) ANEXOS

Anexo 1.- Plásmido pQE30/Magi4.

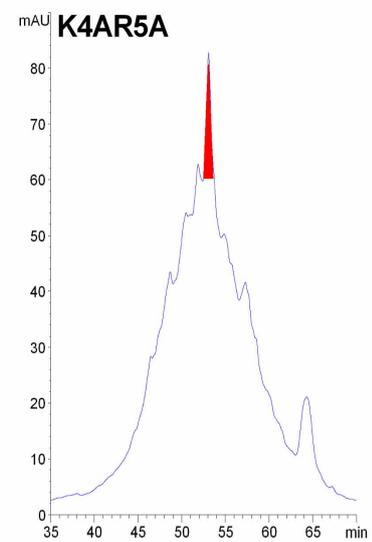
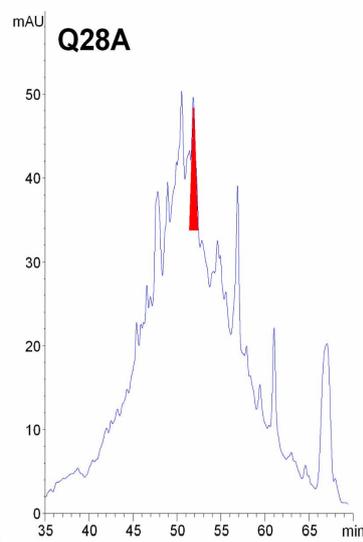
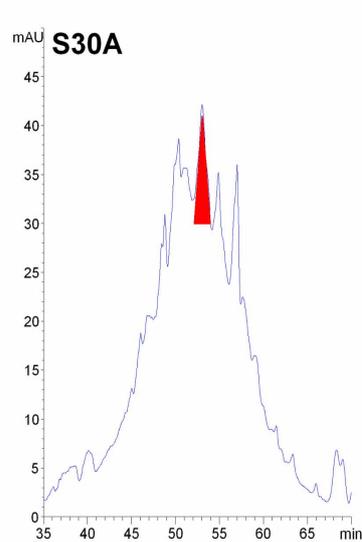
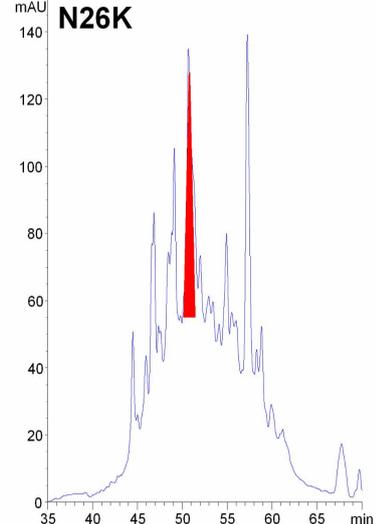
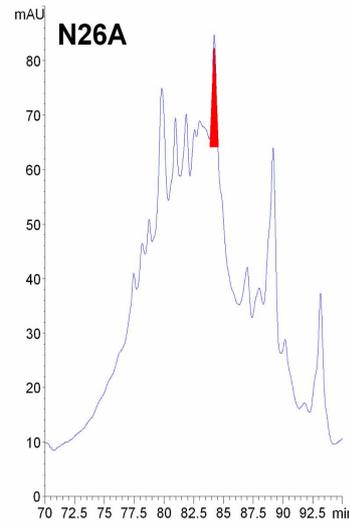
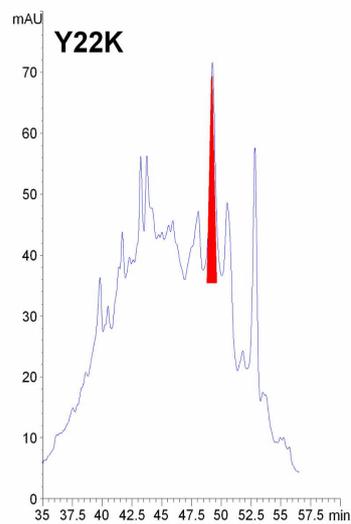
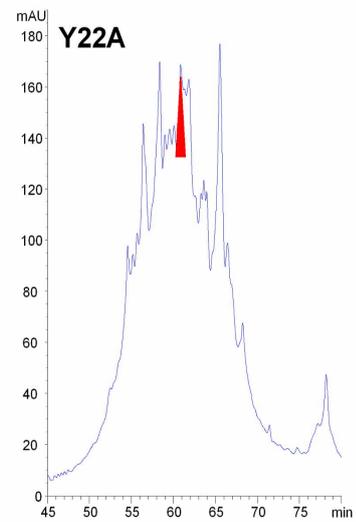
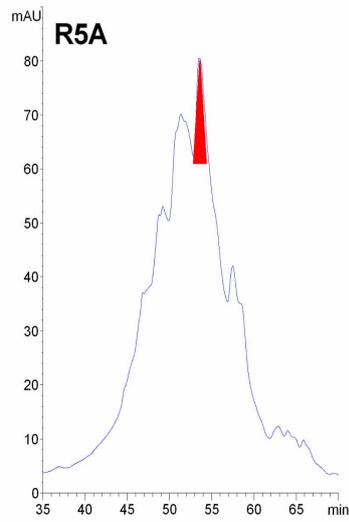
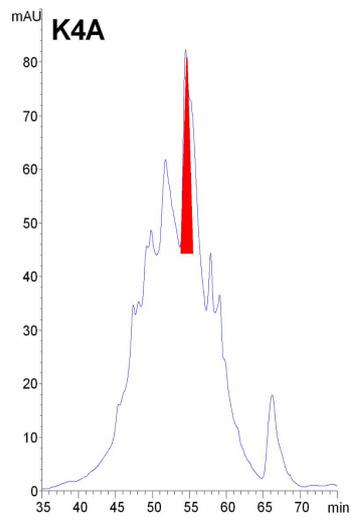


Anexo 2

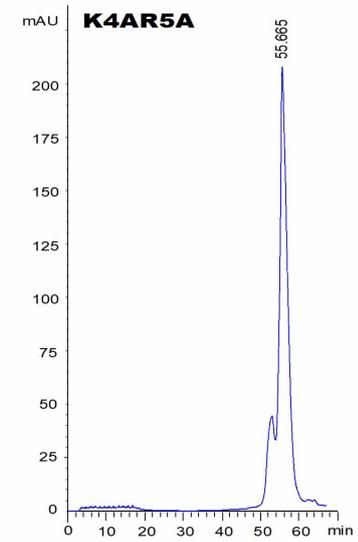
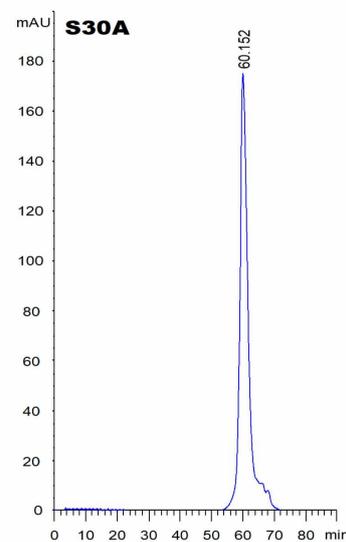
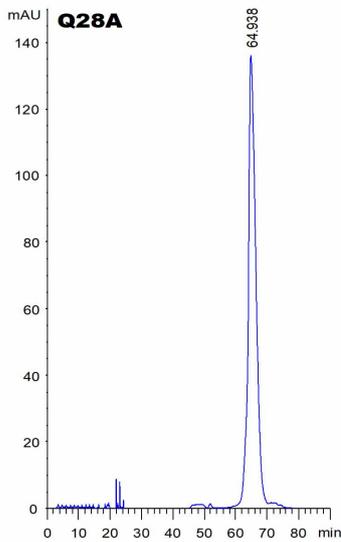
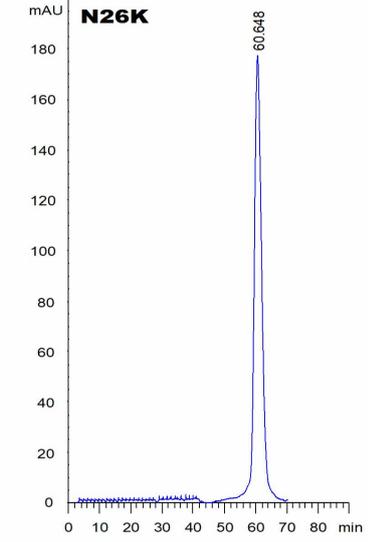
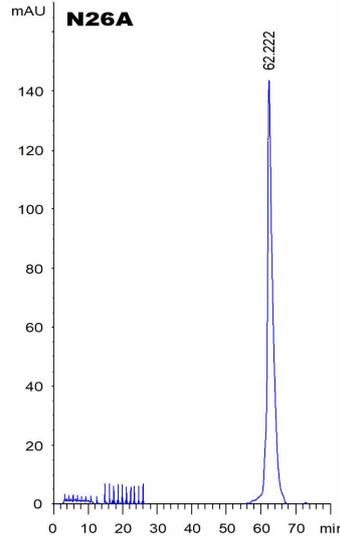
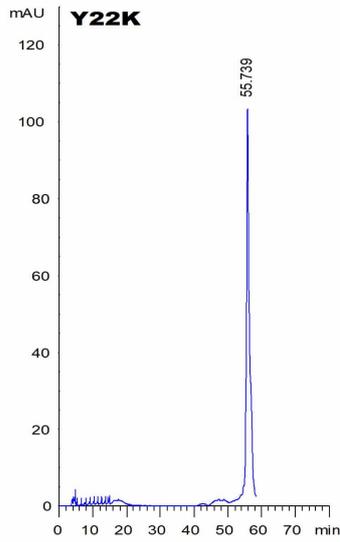
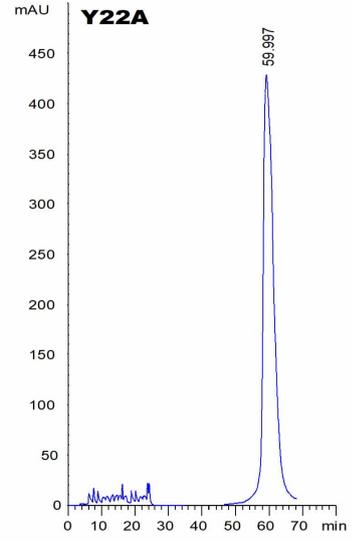
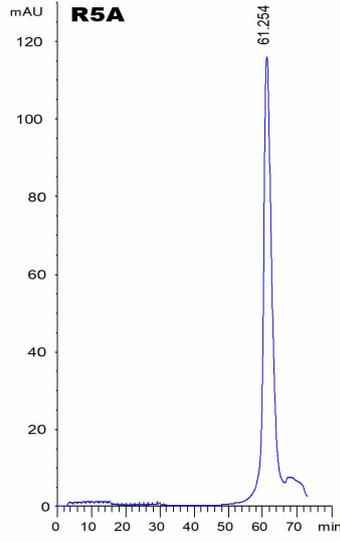
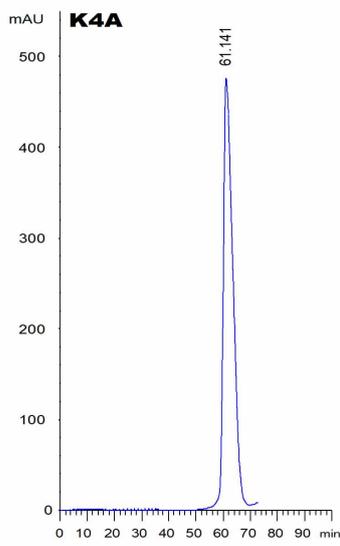
TABLE 1. VALUES OF k FOR ESTIMATING LD_{50} FROM UP-AND-DOWN SEQUENCE OF TRIALS OF NOMINAL LENGTH N . THE ESTIMATE OF LD_{50} IS $x_f + kd$ WHERE x_f IS THE FINAL TEST LEVEL AND d IS THE INTERVAL BETWEEN DOSE LEVELS. IF THE TABLE IS ENTERED FROM THE FOOT, THE SIGN OF k IS TO BE REVERSED

N	Second Part of Series	k for Test Series Whose First Part is					Standard Error of LD_{50}
		O	OO	OOO	$OOOO$		
2	X	-.500	-.388	-.378	-.377	O	.88 σ
3	XO	.842	.890	.894	.894	OX	.76 σ
	XX	-.178	.000	.026	.028	OO	
4	XOO	.299	.314	.315	.315	OXX	.67 σ
	XOX	-.500	-.439	-.432	-.432	OXO	
	XXO	1.000	1.122	1.139	1.140	OOX	
	XXX	.194	.449	.500	.506	OOO	
5	$XOOO$	-.157	-.154	-.154	-.154	$OXXX$.61 σ
	$XOOX$	-.878	-.861	-.860	-.860	$OXXO$	
	$XOXO$.701	.737	.741	.741	$OXOX$	
	$XOXX$.084	.169	.181	.182	$OXOO$	
	$XXOO$.305	.372	.380	.381	$OOXX$	
	$XXOX$	-.305	-.169	-.144	-.142	$OOXO$	
	$XXXO$	1.288	1.500	1.544	1.549	$OOOX$	
	$XXXX$.555	.897	.985	1.000 ⁺¹	$OOOO$	
6	$XOOOO$	-.547	-.547	-.547	-.547	$OXXXX$.56 σ
	$XOOOX$	-1.250	-1.247	-1.246	-1.246	$OXXXO$	
	$XOOXO$.372	.380	.381	.381	$OXXOX$	
	$XOOXX$	-.169	-.144	-.142	-.142	$OXXOO$	
	$XOXOO$.022	.039	.040	.040	$OXOXX$	
	$XOXOX$	-.500	-.458	-.453	-.453	$OXOXO$	
	$XOXXO$	1.169	1.237	1.247	1.248	$OXOOX$	
	$XOXXX$.611	.732	.756	.758	$OXOOO$	
	$XXOOO$	-.296	-.266	-.263	-.263	$OOXXX$	
	$XXOOX$	-.831	-.763	-.753	-.752	$OOXXO$	
	$XXOXO$.831	.935	.952	.954	$OOXOX$	
	$XXOXX$.296	.463	.500	.504 ⁺¹	$OOXOO$	
	$XXXOO$.500	.648	.678	.681	$OOOXX$	
	$XXXOX$	-.043	.187	.244	.252 ⁺¹	$OOOXO$	
	$XXXXO$	1.603	1.917	2.000	2.014 ⁺¹	$OOOOX$	
	$XXXXX$.893	1.329	1.465	1.496 ⁺¹	$OOOOO$	
		X	XX	XXX	$XXXX$	Second Part of Series	
		- k for Series Whose First Part is					

Anexo 3.- Cromatogramas obtenidos después del plegamiento de las variantes de rMagi4.



Anexo 4.- Cromatogramas de la purificación de la fracción tóxica de las variantes de rMagi4.





Key amino acid residues involved in mammalian and insecticidal activities of Magi4 and Hv1b, cysteine-rich spider peptides from the δ -atracotoxin family

Jesús Borrego¹ · Herlinda Clement¹ · Ligia-Luz Corrales-García^{1,2} · Iván Arenas¹ · Gerardo Corzo¹

Received: 6 December 2019 / Accepted: 31 January 2020 / Published online: 17 February 2020
© Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2020

Abstract

δ -Atracotoxins, also known as δ -hexatoxins, are spider neurotoxic peptides, lethal to both vertebrates and insects. Their mechanism of action involves the binding to of the S3/S4 loop of the domain IV of the voltage-gated sodium channels (Na_v). Because of the chemical difficulties of synthesizing folded synthetic δ -atracotoxins correctly, here we explore an expression system that is designed to produce biologically active recombinant δ -atracotoxins, and a number of variants, in order to establish certain amino acids implicated in the pharmacophore of this lethal neurotoxin. In order to elucidate and verify which amino acid residues play a key role that is toxic to vertebrates and insects, amino acid substitutes were produced by aligning the primary structures of several lethal δ -atracotoxins with those of δ -atracotoxins-Hv1b; a member of the δ -atracotoxin family that has low impact on vertebrates and is not toxic to insects. Our findings corroborate that the substitutions of the amino acid residue Y22 from δ -atracotoxin-Mg1a (Magi4) to K22 in δ -atracotoxin-Hv1b reduces its mammalian activity. Moreover, the substitutions of the amino acid residues Y22 and N26 from δ -atracotoxin-Mg1a (Magi4) to K22 and N26 in δ -atracotoxin-Hv1b reduces its insecticidal activity. Also, the basic residues K4 and R5 are important for keeping such insecticidal activity. Structural models suggest that such residues are clustered onto two bioactive surfaces, which share similar areas, previously reported as bioactive surfaces for scorpion α -toxins. Furthermore, these bioactive surfaces were also found to be similar to those found in related spider and anemone toxins, which affect the same Na_v receptor, indicating that these motifs are important not only for scorpion but may be also for animal toxins that affect the S3/S4 loop of the domain IV of the Na_v .

Keywords δ -Atracotoxin · Core-domain · NC-domain · Recombinant expression · Spider

Handling Editor: M. S. Palma.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00726-020-02825-4>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Gerardo Corzo
corzo@ibt.unam.mx

¹ Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad, 2001, Apartado Postal 510-3, 62210 Cuernavaca Mor., México

² Departamento de Alimentos, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Universidad de Antioquia, AA 1226 Medellín, Colombia

Introduction

Spider venoms consist of a complex cocktails of compounds, that include distinctive organic components, including disulfide-rich peptides (Pineda et al. 2014). Some of those disulfide-rich peptides are neurotoxins, lethal to mammals and/or insects. These neurotoxins tend to modify or block ion currents in voltage-gated ion channels that are important for animal physiological functions (Nicholson and Graudins 2002). δ -Atracotoxins (δ -ACTXs); also known as δ -hexatoxins, are disulfide-rich neurotoxins that belong to the NaSpTx family 4, which is composed of peptides containing between 42 and 44 residues, with four disulfide bonds that include an unusual sequence of three consecutive Cys residues at the center of their primary structures, and also Cys residues at their N- and C-terminus; all forming disulfide bonds (Klint et al. 2012). A particular characteristic

of this neurotoxin family is that all members are lethal to both vertebrates and insects, with the exception of δ -ACTX-Hv1b, which only exhibits limited toxic activity in mammals. Overall, δ -ACTXs affect the voltage-gated sodium channels (Na_v) in both mammals and insects by binding to the S3/S4 loop of the domain IV, also known as neurotoxin receptor site-3 (Clairfeuille et al. 2019), and by slowing the fast inactivation of Na_v s, in a way similar to the α -toxins from scorpion venoms (Gunning et al. 2003). A simple alignment of the most representative sequences of δ -ACTXs shows two distinctive clusters of conserved amino acid residues; however, δ -ACTX-Hv1b manifests particular residue variations in these clusters (Table 1). As mentioned, δ -ACTX-Hv1b is the only δ -ACTX with low toxicity for mammals and which does not affect insects. This suggests that these conserved amino acids among the δ -ACTXs play an important role in terms of toxicity for mammals and insects. Thus, using δ -ACTX-Mg1a, also named Magi4, as our δ -atractoxin model, we describe the role of the amino acid residues Lys4, Arg5, Tyr22, Asn26, Gln28, and Ser30 in terms of the toxicity for mammals and insects.

Material and methods

Strains, vectors, and enzymes

Bacterial strains used for cloning and expression were: *E. coli* XL1-Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44*

relA1 lac [F' *proAB lacI^qZΔM15 Tn10* (Tetr)]) (Agilent, USA); and *E. coli* SHuffle®T7 (F' *lac, pro, lacI^q / Δ(ara-leu)7697 araD139 fhuA2 lacZ::T7 gene1 Δ(phoA)PvuII phoR ahpC* galE (or U) galK λatt::pNEB3-r1-cDsbC* (Spec^R, *lacI^q*) *ΔtrxB rpsL150*(Str^R) *Δgor Δ(malF)3*) (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA), respectively. Plasmids pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen, CA, USA), and pQE30 (Qiagen, CA, USA) were used for cloning the Magi4 gene, and for production of the 6His-tagged recombinant Magi4 (rMagi4), respectively. Vent-Polymerase, Taq-Polymerases, and restriction enzymes were from New England Biolabs (NEB, Ipswich, MA, USA), T4 Ligase from Fermentas (Carlsbad, CA, USA).

Amino acid substitutions and construction of rMagi4 peptide variants

The cDNA sequence of Magi4 was ligated into the expression vector pQE30. This vector allows the expression of the cloned segment under the control of *lac* promoter. Furthermore, it provides to the expressed product with a His-tag in the N-terminus for further protein purification. Table S1 shows the primers used to generate the single-site amino acid mutations or double mutations in the case of K4A-R5A. The design and the melting temperature calculation was carried out using the software Oligo 7 (Rychlik 2007). All the primers were synthesized at the DNA sequencing unit of the Instituto de Biotecnología – UNAM.

Table 1 Alignment of amino acid sequences of δ -ACTXs

Common Name	Nomenclature	Sequence	Identity (%)	Access				
					1	5	10	15
Magi4	δ -Hexatoxin-Mg1a	CGSKRAWCKEKKDCCC GYNCVYAWYNQQSSCERKWKYLFTGEC-	100	P83560				
Mg1b	δ -Hexatoxin-Mg1b	CAR**AWCEKTENCCC PMKCI*AWY*G*S*CDHTISTIWTS-CPK	46.5	Q75WG5				
Mb1a	δ -Actinopoditoxin-Mb1a	CAK**EWCAKTEDCCC PMKCI*AWY*E*S*CQTTFSGMFKK-C	47.6	P83608				
Hv1a	δ -Hexatoxin-Hv1a	CAK**NWCGKTEDCCC PMKCV*AWY*E*G*CQSTISALWKK-C	50.0	P13494				
Ar1a	δ -Hexatoxin-Ar1a	CAK**NWCGKNEDCCC PMKCI*AWY*Q*G*CQTTITGLFKK-C	52.3	P01478				
Iw1a	δ -Hexatoxin-Iw1a	CAK**NWCGKNEDCCC PMKCI*AWY*Q*G*CQSTITGLFKK-C	50.0	P0C1R3				
Hv1b	δ -Hexatoxin-Hv1b	CSRSDGWCGKTEDCCC PMKCIKAWYKQNGNCQNTISAIWKN-C	33.3	P81885				



Hv1b residue differences in Hv1b are shown with black arrows. Asterisks represent conserved amino acids among the δ -ACTX family but not in Hv1b

Mutations were carried out as reported by Liu and Nasmith (2008), briefly, the PCR reaction was carried out in 50 μ L contained 10 ng of template, 1 μ M primer pair, 200 μ M dNTPs and three units of PfuUltra High-Fidelity DNA Polymerase (Agilent, Santa Clara, CA, USA). The PCR cycles were initiated at 95 °C for 5 min to denature the template DNA, followed by 12 amplification cycles. Each amplification cycle consisted of 95 °C for 1 min, no overlapping Tm (Tm no) – 5 °C for 1 min and 72 °C for 10 min. The PCR cycles were finished with an annealing step at primer-primer Tm (Tm pp) – 5 °C for 1 min including an extension step at 72 °C for 30 min. PCR cycling was carried out using a Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The PCR products were treated with five units of *DpnI* (Agilent, Santa Clara, CA, USA) at 37 °C for 2 h and then 10 μ L of each PCR reactions was analyzed by agarose gel electrophoresis. *E. coli* XL1Blue competent cells were transformed by heat shock with an aliquot of 2 μ L PCR product. The transformed cells were spread on a Luria–Bertani (LB) plate containing ampicillin and incubated at 37 °C overnight. Two colonies from each plate (each mutation) were grown and the plasmid DNA was isolated. Plasmids were propagated in XL1Blue *E. coli* cells and prepared using the high pure plasmid isolation kit (Roche, Basel, Switzerland). To confirm amino acid replacements, 300 ng of plasmid DNA was sequenced using the Sanger sequencing method at the DNA sequencing unit of the Instituto de Biotecnología–UNAM.

Expression of rMagi4 and peptide variants

Recombinant Magi4 (rMagi4) and its variants were produced by heterologous expression in *E. coli* SHuffle strain. Cells were grown in Luria–Bertani (LB) broth until an A_{600} of 0.7 absorbance units was reached. Expression of peptide variants were induced with 0.1 mM of isopropyl thio- β -D-galactoside (IPTG). After 16 h to 37 °C, cells were harvested by centrifugation (6,000 rpm, 15 min, 4 °C) and disrupted using a mechanical system (One-Shot Cell Disruptor from Constant Systems, Northants, United Kingdom). Inclusion bodies were obtained by centrifugation (8000 rpm, 10 min, 4 °C) and solubilized using guanidine hydrochloride 6 M. The recombinant peptides were purified from inclusion bodies using Ni–NTA agarose (Qiagen, CA, USA), and their cystines were reduced with dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, Ontario, Canada) for 1 h at 37 °C, and then re-purified by semi-preparative RP-HPLC (C_{18} column 10 \times 250 mm, Vydac, USA) using a linear gradient from 20 to 60% CH_3CN in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) for 30 min. The reduced recombinant peptides were in vitro folded following Yamaji et al. (Yamaji et al. 2009). Briefly, each reduced peptide was added to a refolding buffer made of 0.1 M aqueous ammonium acetate, pH 7.6, containing

2 M GdnHCl, 0.1 mM GSSG, and 1 mM GSH (the peptide/GSSG/GSH ratio was 1:10:100), and it was allowed to oxidize for 4 days at 4 °C. The buffer solution was then diluted twofold with cold water (4 °C) to a final peptide concentration of 5 μ M. After 3 days at 4 °C, the mixture was acidified to pH 2 by adding TFA, and the folded peptide was desalted and purified by analytical RP-HPLC (C_{18} column 4.6 \times 250 mm, Vydac, USA) using a linear gradient from 17 to 37% CH_3CN in 0.1% TFA for 80 min, at a flow rate of 1 mL/min. A second re-purification step of the toxic fraction was performed using the same column with a similar linear gradient from 17 to 37% CH_3CN in 0.1% TFA but for 100 min, at a flow rate of 1 mL/min.

In vivo biological activity

Biological activity of RP-HPLC fractions was determined by intracerebroventricular (icv) injection using mice (CD-1, 17–21 g), and by lateroventral thoracic injection using house crickets (*Acheta domesticus*, 0.1–0.16 g). The median lethal dose (LD₅₀) in mice and the median paralyzing dose (PD₅₀) in crickets were calculated using the Up-and-Down method (Dixon 1965). Briefly, animals were dosed, one at a time, with fixed sequential doses with equal intervals between them. If the first mouse was dead at the end of 24 h, or the first cricket got paralyzed at least 1 min within the first 10 min after injection, the next animal was given a lower dose. If the mouse was alive or the cricket did not get paralyzed, the next animal received a higher dose. This sequence continued until the necessary animals were dosed. The LD₅₀ and PD₅₀, as well as the standard error of the mean (SEM), were calculated as described by Dixon (Dixon 1965). All animal experiments were previously approved by the Bioethics Committee of the Biotechnology Institute (project No. A1-S-8005) and carried out following appropriate regulations.

Structural integrity of peptide variants

To evaluate the structural integrity of recombinant peptides, CD experiments were carried out. The CD experiments were recorded on a Jasco model J-720 spectropolarimeter (Jasco, Tokyo, Japan). The CD spectra was measured from 260 to 190 nm in an aqueous solution of 60% trifluoroethanol (TFE), at room temperature, with a 1-mm pathlength cell. Data were collected at 1 nm with a scan rate of 50 nm/min and a time constant of 0.5 s. The concentration of each peptide was 30 μ M. Data were the average of three separate recordings and analyzed online by the software Bestsel (<https://bestsel.elte.hu/index.php>). Synthetic Magi4 (sMagi4), previously characterized by NMR (Yamaji et al. 2009), was used as control.

Bioinformatics

Sequences alignment was carried out using the software BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0.5, or using the TM-align server (Zhang and Skolnick 2005). The structural visualization was done with the software PyMol v2.3.2.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the statistical software SPSS for Windows version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Data were expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM) and 95% confidence intervals. Statistical significance was determined using student paired t-test or Analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test for multiple comparisons. A $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Construction of δ -ACTX-Mg1a and its variants

Nine pairs of primers were synthesized (Supplementary Table S1). Using these primer pairs, eight single-site mutagenesis reactions were carried out to substitute residues Lys4, Arg5, Tyr22, Asn26, Gln28, and Ser30 for alanine, along with Tyr22 and Asn26 for lysine, and a double mutagenesis where Lys4 and Arg5 were substituted by alanine. The nucleotide sequences of each peptide variant construction were analyzed, and all codon replacements were carried out successfully.

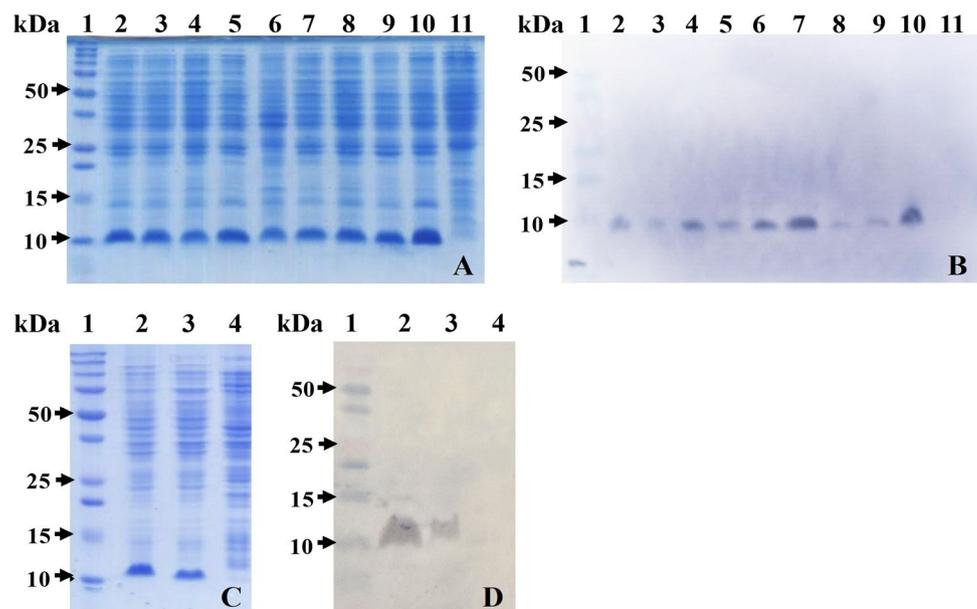
Recombinant expression and purification of δ -ACTX-Mg1a (rMagi4) and its variants

The recombinant δ -ACTX-Mg1a (rMagi4) and its variants contains an N-terminal fusion sequence of 16 residues (MRSGHHHHHHGSEIRG) plus the respective mature peptide (Table 1). The recombinant δ -ACTX-Mg1a and its variants were expressed using the *E. coli* Shuffle strain. All of these formed inclusion bodies were extracted using chaotropic agents, and purified using agarose nickel affinity chromatography. The presence of rMagi4 and each of the individual peptide variants were confirmed by SDS-PAGE. Corresponding protein bands showed similar molecular mass patterns (Fig. 1a, c). These were also detected by western-blot analysis using an anti-6His-tag antibody, coupled to alkaline phosphatase (Fig. 1b, d). The cystines of rMagi4 and all peptide variants were reduced with DTT and individually folded in vitro. After peptide disulfide bond reduction, in vitro folding, and HPLC purification, the experimental molecular masses of all recombinant peptides were obtained and defined according to their expected theoretical molecular masses (Supplementary Table S2). This includes all in vitro folded rMagi4 variant fractions eluted at similar retention times (see Supplementary Figure S1). Figure 2 represents a HPLC chromatogram of the re-purification of rMagi4.

In vivo biological activity

The biological activity of the folded peptide variants was used to calculate the LD₅₀ in mice, and the PD₅₀ in house crickets. Figure 3 shows the LD₅₀ and PD₅₀ values of all recombinant peptides (standard error and CI 95%

Fig. 1 Expression of recombinant Magi4 and variants. **a** SDS-PAGE 16% of the single-site mutations, **b** Western blot anti-His tag of single-site mutations. Line (1) molecular weight marker, (2) rMagi4, (3) K4A, (4) R5A, (5) Y22A, (6) Y22K, (7) N26A, (8) N26K, (9) Q28A, (10) S30A and (11) Untransformed strain. **c** SDS-PAGE 16% of the double variant K4A-R5A, **d** Western blot anti-His tag of double variant. Line (1) Molecular weight markers, (2) rMagi4, (3) K4A-R5A (4) Untransformed strain



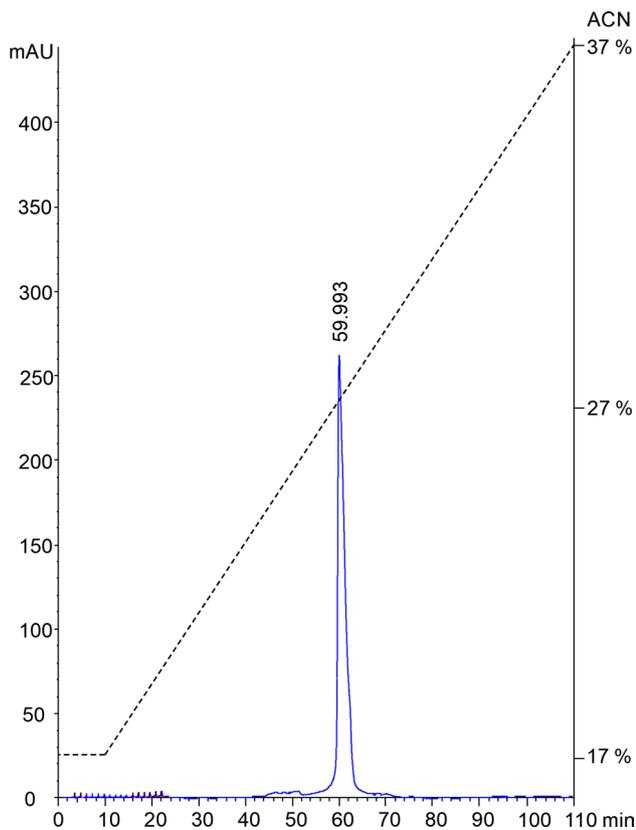


Fig. 2 RP-HPLC re-purification of rMagi4. The linear gradient corresponds from 17 to 37% of CH₃CN in 0.1% TFA for 100 min, at a flow rate of 1 mL/min

are presented in Supplementary Table S3). For mice, the replacement of Tyr22 or Asp26 by Ala decreased peptide toxicity three- and fourfold, respectively. Likewise, the peptide variant Ser30 decreases its toxicity fourfold when replaced by Ala. However, peptide toxicity decreased substantially; 43- and 15-fold respectively, when Tyr22 or

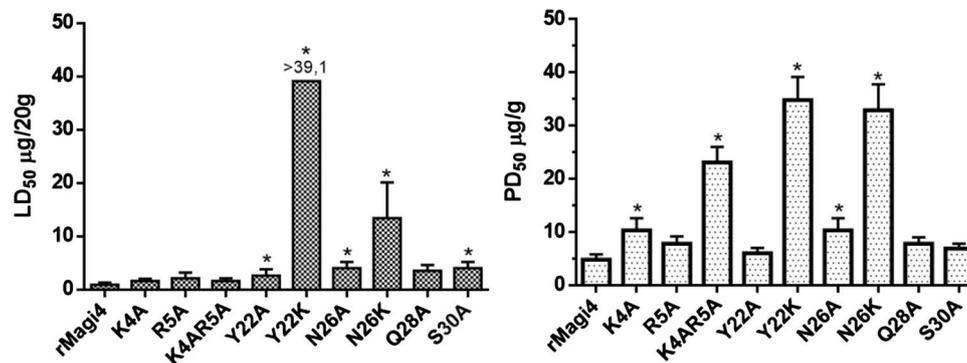


Fig. 3 LD₅₀ and PD₅₀ for rMagi4 and its variants. The LD₅₀ was calculated after intracerebroventricular injection of six mice (17–21 g) following the Up-and-Down method ($n=2$). The PD₅₀ was calculated after lateroventral thoracic injection of eight house crickets (0.1–

Asn26 were replaced by Lys. For house crickets, variants Tyr22K and Asn26K also manifested lower toxicity; 8- and sevenfold, respectively, when compared to the parental Magi4 peptide. However, when Tyr22 and Asp26 were replaced by Ala, unlike mice, toxin activity was recovered for Tyr22A, but not totally for Asn26A, which still showed a twofold decrease, similar to the toxicity value of the Lys4A peptide variant. Interestingly, the K4A-R5A variant showed a fivefold decrease in its insecticidal activity but it kept its toxicity to mice. Peptide variants Arg5A and Gln28A showed a slight toxic effect on both mice and house crickets; however, they were not statistically significant ($p < 0.05$) compared to the control rMagi4.

Structural integrity of rMagi4 peptide variants

All expressed peptides showed similar basic physicochemical characteristics (e.g. molecular masses, chromatographic retention times) indirectly confirming their correct folding; however, it was important to test their structural integrity. The CD spectra of all expressed peptides were compared to the CD spectrum of the native δ -ACTX-Mg1a (Magi4) (Fig. 4a). All recombinant peptides showed similar CD patterns to that of native Magi4. All of them had high percentages of antiparallel β -sheet represented by a minimum and maximum spectrum around 208 nm and 194 nm, respectively. The antiparallel β -sheets represent the main secondary structure of δ -ACTXs (Little et al. 1998). Additionally, α -helix structures were also apparent by minima at 220 nm. Furthermore, all CD spectra were evaluated using the deconvolution software Bestsel, in order to compare the percentages of secondary structure, pertaining to all recombinant peptides. Figure 4b demonstrates that the percentages of secondary structures among all native and recombinant peptides were very similar. The greatest secondary structure deviation was observed in variant Lys4A, which had a slightly lower

0.16 g), also following the Up-and-Down method ($n=2$). Bars represent the standard error of the mean. Statistical significance (*) was defined as P value < 0.05

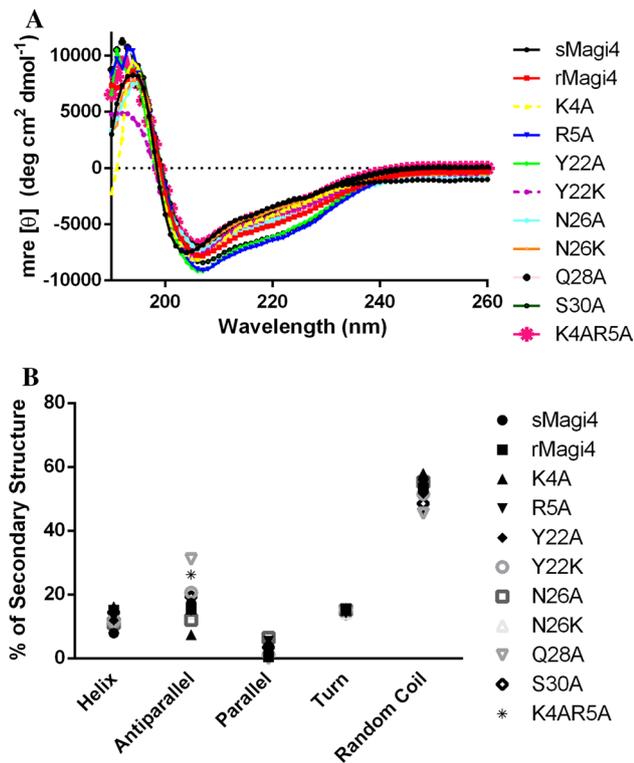


Fig. 4 Circular dichroism of rMagi4 and variants. **a** Comparison of the CD spectrum of synthetic Magi4 (sMagi4) with the spectrum of rMagi4 and variants. **b** Comparison of the percentage of secondary structure of sMagi4 and recombinants

proportion of β -sheets compared to the other recombinant peptides. The opposite case was evident for variant Gln28A, which showed a slight increase in the proportion of β -sheets followed by variant K4A-R5A with a smaller increase. The α -helix proportion was the most conserved secondary structure among all recombinant peptides.

Structural alignment of α -toxins from other venomous animals

Scorpion α -toxins that also bind to the S3/S4 loop of the domain IV of the Na_v have two bioactive surface regions, where it is evident that key amino acid residues cause activity. These bioactive surfaces have been named the Core-domain and the NC-domain (Gordon et al. 2007). Consequently, it was also interesting to prove whether these spatial domains were presented in δ -ACTXs, based on the results of the amino acid substitutions in Magi4. Previously, Clairfeuille et al. (2019) used electron cryomicroscopy to show the protein interaction between AaH2 (PDB: 1AHO), a scorpion α -toxin only toxic to mammals, and the Na_v. Following Clairfeuille et al. (2019), Fig. 5 shows the amino acids involved in the AaH2-Na_v interaction. Two regions are highlighted on the surface of AaH2 (Fig. 5a), so that when AaH2 is structurally aligned with the scorpion α -toxin Lqh α IT (PDB: 2ASC, Fig. 5b) that affects only insects, they share common spatial areas within the Core- and NC-domains (Fig. 5c). When comparing AaH2 with

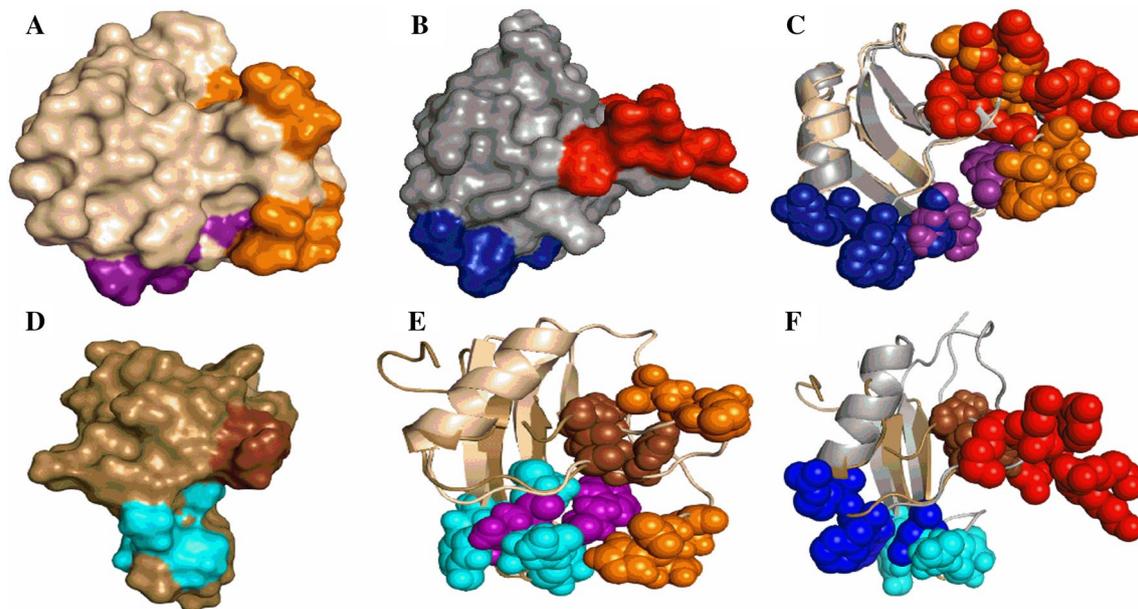


Fig. 5 Structural alignment between scorpion α -toxins and Magi4. **a** α -Mammal toxin AaH2 (PDB: 1AHO): in orange the NC-domain, in purple the Core-domain; **b** α -insect toxin Lqh α IT (PDB: 2ASC); in red the NC-domain, in blue the Core-domain; **c** Structural alignment of Lqh α IT and AaH2; **d** Magi4 (PDB:2ROO): in brown cationic resi-

dues, in cyan hydrophobic patch; **e** Structural alignment of Magi4 and AaH2; **f** Structural alignment of Magi4 and Lqh α IT. Atoms found in both NC- and Core domains are presented in sphere models to better appreciate overlapping zones

Magi4 (PDB: 2ROO), the amino acids Lys4, Arg5, Tyr22, Asp26 and Ser30 from Magi4 (highlighted in Fig. 5d) are aligned with the Core- and NC-domains of AaH2 (Fig. 5e). It is apparent that the region in the Core-domain (purple) overlaps with that of Magi4; although the NC-domain did not overlap with AaH2 and Magi4, they are structurally oriented. Results were similar when Magi4 and Lqh α IT were aligned (Fig. 5f). As these hydrophobic and cationic clusters in Magi4 may be conserved in other spider α -toxins, the structure of Magi4 and the spider toxin Cg1a (PDB: 2A2V) were subsequently compared (Fig. 6a). The loop that forms the cationic cluster in Magi4 was coupled to the loop in the spider toxin Cg1a, which contains a pair of cationic amino acids (Lys4 and Arg5 in Magi4, and Arg3 and Lys4 in Cg1a), similar to Magi4. Contrastingly, the loop that shares the same region with the hydrophobic cluster is occupied by amino acids such as Thr24, Leu25, Lys26, and Tyr27, which form a bioactive surface that has similar chemical characteristics to those found in the Core-domains of scorpion α -toxins. This analysis may reveal that the hydrophobic and the cationic clusters (i.e. represented by the NC- and Core-domains in scorpion α -toxins) are present, not only in the α -toxins of scorpions but also as small clusters in those of spider peptide toxins. These also affect the S3/S4 loop of the domain IV of the Na_v, playing a key role in their mode of action, and providing an example of the convergent evolution of protein, towards the same receptor (Corzo et al. 2005, 2007). In order to assess the importance of such hydrophobic and cationic clusters in other non-arachnid neurotoxins, a similar comparative analysis was undertaken, using the sea anemone neurotoxin Axm1b (PDB: 1APF), whose action mechanism also involves binding to the S3/S4 loop of the domain IV of the Na_v (Khera and Blumenthal

1994; Dias-Kadambi et al. 1996; Seibert et al. 2004a, b). Amino acid residues that were important for Axm1b toxicity were structurally aligned to Magi4. Although the amino acids in Axm1b form two bioactive surfaces (Fig. 6b), the structural alignment did not overlap with residues found in Magi4. However, if the alignment is performed only on individual regions where a distinctive cluster of amino acids are found, one of these regions overlaps with hydrophobic region of Magi4 (Fig. 6c). This region will contain amino acid residues typically found in the Core-domain of scorpion α -toxins. The missing surface did not overlap with neither the hydrophobic nor the cationic surface (data not shown); however, this surface is also made up of cationic amino acids (Lys48 and Lys49), similar to those found in the NC-domain of scorpion α -toxins. To give strength to this *in silico* observations, Table 2 summarizes the structural alignment carried out with the TM-align algorithm (Zhang and Skolnick 2005). The TM-score > 5.0 represents highly homologous structures so that the alignment between Magi4 and Cg1a was the only one to have this value. However, even with the structural differences among the toxins from scorpions, sea anemone and Magi4, it is observed that the hydrophobic cluster of Magi4 overlaps with that residues from the Core-domain of the scorpion alfa-toxins, and also with the bioactive cluster of the anemone toxin.

Discussion

Studies to determine and propose a pharmacophore of δ -ACTXs have been limited because of problems involved in the efficient production of correctly folded synthetic or recombinant peptides (Wilson 2016). Previously, two

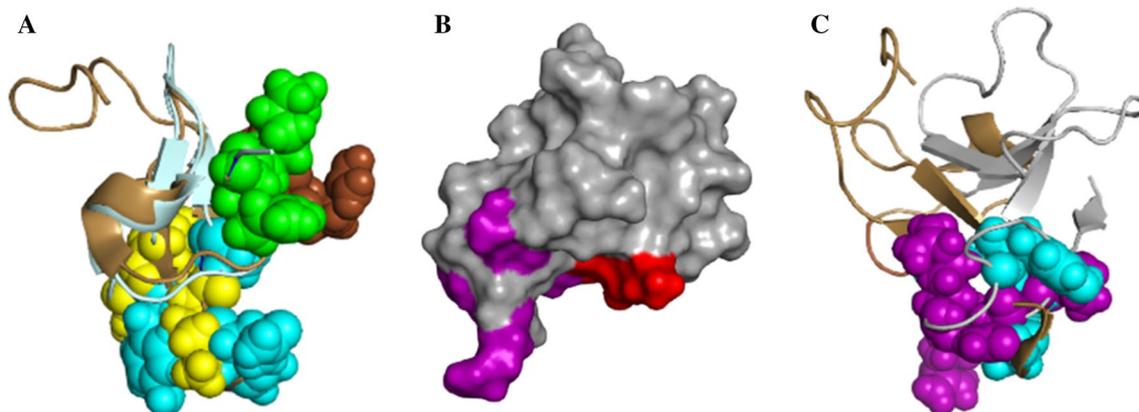


Fig. 6 Structural alignment of Magi4, Cg1a, and Axm1b. **a** Structural alignment of Magi4 and Cg1a. The structure of Magi4 (in sand, PDB:2ROO) is shown with the hydrophobic patch in cyan and the cationic one in brown. The structure of Cg1a (in light blue, PDB: 2A2V) is shown with the putative hydrophobic patch in yellow and

the cationic one in green. **b** The bioactive surfaces of Axm1b (PDB: 1APF) are shown in purple and red. **c** Structural alignment of the Arg14-loop (purple) in the toxin Axm1b and the hydrophobic patch (cyan) in the toxin Magi4

the hypothesis of the importance of this cationic cluster, the mutant K4A-R5A was constructed and tested. The double mutant did not present a significant ($p > 0.05$) difference in the LD_{50} in mice. Contrary to what was thought, in mice, toxin does not need only one cationic charge to interact with its receptor; in fact, the toxin does not require this cationic cluster to be able to present the toxic effect in mammals as observed in insects where the double mutant presented a fivefold reduction in its PD_{50} . Apparently, when replacing Lys4 or Arg5 by Ala, the remaining positive charge was enough to keep toxicity in insects (only the K4A variant was significant); however, when removing both positive charges, the interaction was drastically affected (Fig. 3b). As mentioned, δ -ACTX-Hv1b lacks the residues Lys4 and Arg5, but unlike Magi4, Hv1b has an additional positive charge, Arg3. Due to the proximity, Arg3 could provide the positive charge necessary to interact with the insect Na_v , as neither Lys4 nor Arg5 is present in δ -ACTX-Hv1b, but even with this extra positive charge, Hv1b toxin is not toxic, which gives some support to the hypothesis of the importance of the interaction of Lys4 with the Na_v receptor. Also, it is worth mentioning that Arg5 in Hv1b is replaced by an Asp (R5D), which could cause a charge repulsion effect that exceeds the effect of the positive charge supplement of Arg3. The anionic charges on the Hv1b N-terminal cluster could also explain the reported low insecticidal activity of δ -AOTX-Mg1b toxin, another member of the δ -ACTXs family (Gunning et al. 2003). Mg1b retains the Lys4 and Arg5 residues (like the other toxins of the δ -ACTXs family); however, it has an anionic residue at Glu6, which could cause such low insecticidal activity.

Concerning the other variants, we found that Tyr22 and Asn26 showed the greatest decrease in toxicity in both animal models (approximately 43-fold and 15-fold for mice and sevenfold for house crickets), when they were replaced by Lys. However, the toxic effect was not as great as when replaced by Ala (approximately threefold and fourfold for mice, and twofold for N26A for house crickets), implying that the addition of positive charges to the surface occupied by Tyr22 and Asn26 drastically affects the toxicity of Magi4. In the past, it was found that Tyr22 and other amino acids that occupied this spatial position are necessary for the toxicity of scorpion α -toxins (Yamaji et al. 2009). Tyr22 and Asp26, as well as other studied residues, are found in a very well-conserved region within the δ -ACTX family, consisting of hydrophobic and polar uncharged residues. When one of these amino acids was replaced by Ala, the effect on toxicity was very low; this substitution did not have great impact on the interaction of the toxin with its receptor. However, when amino acids Tyr22 and Asp26 were replaced by Lys (substitutions found in δ -ACTXs-Hv1b), the addition of positive charges to this region may result in a significant repulsion effect, making it impossible for the variant toxin to

interact with the receptor. To better understand these results and the role of played by amino acids in the toxin–receptor interaction, structural alignments were carried out. It is well known that scorpion α -toxins share two bioactive surfaces, the “Core-domain” implicated in the interaction with the receptor and the recognition of the S3/S4 loop of the domain IV of the Na_v , and the “NC-domain” that possibly affects toxin specificity (Gordon et al. 2007). Despite the lack of homology, the length of the protein and the totally different three-dimensional folds, the alignment of Magi4 and AaH2 showed that the residues of Magi4 involved in toxic activity are located in the same spatial region where the Core- and the NC-domain are found in AaH2 (Clairfeuille et al. 2019). Moreover, amino acids located on the bioactive surfaces of both Magi4 and AaH2 share similar characteristics in these domains (similar to those apparent in the alignment of Magi4 and Lqh α IT). In scorpion α -toxins, it appears that the mechanism behind the selectivity on the part of the NC-domain involves the varied conformational states of the toxins so that a *cis* represents the conformation for anti-insect toxins, a *trans* is the conformation for anti-mammal toxins, and a more flexible domain represents that for anti-mammal/insect toxins (Gordon et al. 2007). It is possible that the δ -ACTX family uses another selectivity mechanism involving specific residues instead of a flexible loop. This hypothesis is supported by the fact that the cationic patch (Lys4 and Arg5) is important for activity in house crickets, but not in mice; furthermore, although structural studies concerning the flexibility of the loop in Magi4 have not been carried out, studies of NMR on Magi4 or Hv1a did not show structural signals indicating different conformational isomerization (Little et al. 1998; Yamaji et al. 2009). Therefore, more studies are needed to understand the mechanism of insect and mammalian toxicity, but it is relevant to keep in mind that this cationic cluster in δ -ACTXs is involved in interspecies specificity as well as the NC-domain in scorpions α -toxins, supporting the homologous activity of such spider and scorpion amino acid regions. It should be clarified that the residues found in the cationic cluster in Magi4 do not clearly overlap with the NC-domain of scorpion toxins (Table 2). However, this can be explained due to the non-proportional size of the scorpion toxin loops when compared to that of the Magi4 loops. The residues found in the Magi4 cationic cluster nicely overlap with the amino residues just behind the amino acids found in the NC-domain showing similar positions.

On the other hand, the hydrophobic patch (where the amino acids Tyr22, Asp26, and Ser30 are located) could be the homologous region to the Core-domain for the following reasons; 1) the chemical nature of the Core-domain in the AaH2 is dominated by hydrophobic and polar uncharged residues (Clairfeuille et al. 2019), very similar to the hydrophobic patch in Magi4; 2) the Core-domain is implicated in

the selectivity of the S3/S4 loop of the domain IV of the Na_v, and the fact that Hv1a, Ar1a, and Magi4 compete in terms of the binding for this receptor with scorpion α -toxins (Little et al. 1998; Yamaji et al. 2009); and 3) the effect of adding positive charges, which disturb the overall hydrophobic and non-polar surfaces decreasing biological activity, supports the hypothesis of similar role of the hydrophobic residues in δ -ACTXs with the Core-domain in scorpion α -toxins.

Furthermore, when Magi4 was aligned with Cg1a, it was interesting to observe bioactive surfaces that resemble similar hydrophobic and cationic clusters elucidated in Magi4, and in reported scorpion α -toxins, meaning that these domains may be present not only in the δ -ACTX family, but in other spider toxins affecting the S3/S4 loop of the domain IV of the Na_v as well. Similarly, it was interesting to discover similar amino acid clusters in the anemone toxin. Unfortunately, only the hydrophobic patch of Magi4 was aligned efficiently with the bioactive surface in the Axm1b toxin. These results are similar to those obtained when Axm1b and AaH2 toxins were structurally compared (data not shown). Even with the lowest TM-score presented (Table 2) because of the large differences between such structures, it is quite interesting that when the hydrophobic cluster of Magi4 is selected and aligned, the algorithm overlaps both regions, which indicates structural similarities. Moreover, this region in Axm1b is referred as the Arg14-loop, which plays a key role in the toxicity of the sea anemone toxin (Moran et al. 2009). In addition, most of the contacts observed between the Arg14-loop and the Na_v appear to be hydrophobic, since when replacing such amino acids (Asn16 and Ser18) with Ala there was a low effect in affinity; however, when introducing charges (Asp or Arg) the activity was drastically reduced (Seibert et al. 2004a, b). As mentioned before, a cationic cluster was not found by structural alignment; however, the other amino residues with important function in the sea anemone toxin form a positive patch resembling the NC-domain, described previously. Therefore, it seems likely that this domain also exists in sea anemone α -toxins. Hopefully, in the near future, new pharmacophores involved in selectivity and specificity of α -toxins (regardless of the venomous species) that interact with the receptor of the S3/S4 loop of the domain IV of Na_v will be found among the Core- and NC-domains, which will increase the likelihood of finding new peptides with potential clinical use.

Acknowledgements We acknowledge Dr. Fernando Zamudio, Dra. Gloria Saab and M. en C. Pavel A. Montero from Instituto de Biotecnología UNAM for mass spectrometric, circular dichroism and bioinformatic determinations, respectively. We additionally acknowledge Dr. Paul Gaytán, M.C. Eugenio López-Bustos and Q.I. Santiago Becerra from Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN at Instituto de Biotecnología. This work received funding from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) grant number IN203118 awarded to GC. JB is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas at the Universidad Nacional

Autónoma de México (UNAM) and was supported by CONACyT-México (Fellowship No. 415092).

Author contribution JB designed, cloned, expressed and evaluated, biologically the δ -ACTXs, and wrote the manuscript; HC and LCG constructed and cloned the δ -ACTX; IA performed the protein purification; GC designed CD experiments, reviewed and wrote the manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval No experiments with humans were performed. All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed, and procedures performed in the present study involving animals were done in accordance with the bioethical standards at the “Instituto de Biotecnología—UNAM.”

Informed consent The authors confirm that this work is original and new, and it is not under consideration elsewhere.

References

- Alewood D, Birinyi-Strachan LC, Norton RS, Nicholson GM, Pallaghy PK, Alewood PF (2003) Synthesis and characterization of δ -Atracotoxin-Ar1a, the lethal neurotoxin from venom of the sydney funnel-web spider (*Atrax robustus*). *Biochemistry* 42:12933–12940
- Clairfeuille T, Cloake A, Infield DT, Llongueras JP, Arthur CP, Li ZR, Jian Y, Martin-Eauclaire MF, Bougis PE, Ciferri C, Ahern CA, Bosmans F, Hackos DH, Rohou A, Payandeh J (2019) Structural basis of alpha-scorpion toxin action on Nav channels. *Science* 363(6433):5873
- Corzo G, Escoubas P, Villegas E, Karbat I, Gordon D, Gurevitz M, Nakajima T, Gilles N (2005) A spider toxin that induces a typical effect of scorpion alpha-toxins but competes with beta-toxins on binding to insect sodium channels. *Biochemistry* 44:1542–1549
- Corzo G, Sabo JK, Bosmans F, Billen B, Villegas E, Tytgat J, Norton RS (2007) Solution structure and alanine scan of a spider toxin that affects the activation of mammalian voltage-gated sodium channels. *J Biol Chem* 282(7):4643–4652
- Dias-Kadambi BL, Drum CL, Hanck DA, Blumenthal KM (1996) Leucine 18, a hydrophobic residue essential for high affinity binding of anthopleurin B to the voltage-sensitive sodium channel. *J Biol Chem* 19(271):9422–9428
- Dixon WJ (1965) The Up-and-Down method for small samples. *J Am Stat Assoc* 60:967–978
- Fujiwara K, Toda H, Ikeguchi M (2012) Dependence of alpha-helical and beta-sheet amino acid propensities on the overall protein fold type. *BMC Struct Biol* 12:18
- Gordon D, Karbat I, Ilan N, Cohen L, Kahn R, Gilles N, Dong K, Stuhmer W, Tytgat J, Gurevitz M (2007) The differential preference of scorpion alpha-toxins for insect or mammalian sodium channels: implications for improved insect control. *Toxicon* 49(4):452–472
- Gunning SJ, Chong Y, Khalife AA, Hains PG, Broady KW, Nicholson GM (2003) Isolation of δ -missulenatoxin-Mb1a, the major vertebrate-active spider δ -toxin from the venom of *Missulena bradleyi* (Actinopodidae). *FEBS Lett* 554(1–2):211–218

- Khera PK, Blumenthal KM (1994) Role of the cationic residues arginine 14 and lysine 48 in the function of the cardiotoxic polypeptide anthopleurin B. *J Biol Chem* 14(269):921–925
- Klint JK, Senff S, Rupasinghe DB, Er SY, Herzig V, Nicholson GM, King GF (2012) Spider-venom peptides that target voltage-gated sodium channels: pharmacological tools and potential therapeutic leads. *Toxicon* 60(4):478–491
- Little MJ, Wilson H, Zappia C, Cestèle S, Tyler MI, Martin-Eauclaire M-F, Gordond D, Nicholson GM (1998) δ -Atracotoxins from Australian funnel-web spiders compete with scorpion α -toxin binding on both rat brain and insect sodium channels. *FEBS Lett* 439:246–252
- Liu H, Naismith JH (2008) An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. *BMC Biotechnol* 8:91
- Moran Y, Gordon D, Gurevitz M (2009) Sea anemone toxins affecting voltage-gated sodium channels—molecular and evolutionary features. *Toxicon* 54(8):1089–1101
- Nicholson GM, Graudins A (2002) Spiders of medical importance in the Asia-Pacific: atracotoxin, latrotoxin and related spider neurotoxins. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29:785–794
- Pineda SS, Undheim EA, Rupasinghe DB, Ikonomopoulou MP, King GF (2014) Spider venomomics: implications for drug discovery. *Future Med Chem* 6(15):1699–1714
- Rychlik W (2007) OLIGO 7 primer analysis software, in methods in molecular biology Vol. 402: PCR Primer Design. Humana Press Inc., Totowa, pp 35–39
- Seibert AL, Liu J, Hanck DA, Blumenthal KM (2004a) Role of Asn-16 and Ser-19 in anthopleurin B binding Implications for the electrostatic nature of Na(V) site. *Biochemistry* 8:7082–7089
- Seibert AL, Liu J, Hanck DA, Blumenthal KM (2004b) Role of Asn-16 and Ser-19 in Anthopleurin B Binding. Implications for the Electrostatic Nature of NaV Site 3. *Biochemistry* 43:7082–7089
- Szeto TH, Smith R, Connor M, Christie MJ, King GF, Nicholson GM (2000) Isolation and pharmacological characterisation of δ -atracotoxin-Hv1b, a vertebrate-selective sodium channel toxin. *FEBS Lett* 470:293–299
- Wilson DTR (2016) The venom of Australian spiders. In: Gopalakrishnakone P, Corzo G, Lima ME, Diego-García E (eds) Spider venoms, toxinology series. Springer, Netherlands, pp 21–43
- Yamaji N, Little MJ, Nishio H, Billen B, Villegas E, Nishiuchi Y, Tytgat J, Nicholson GM, Corzo G (2009) Synthesis, solution structure, and phylum selectivity of a spider delta-toxin that slows inactivation of specific voltage-gated sodium channel subtypes. *J Biol Chem* 284(36):24568–24582
- Zhang Y, Skolnick J (2005) TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the TM-score. *Nucleic Acids Res* 33(7):2302–2309

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.