



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Bases estructurales de la neutralización de la
toxina Cn2 de *Centruroides noxius* Hoffmann
por el anticuerpo scFv 9004G

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. JUAN CARLOS CANUL TEC

Tutor: LOURIVAL DOMINGOS POSSANI POSTAY



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Lourival Domingos Possani Postay. Parte de este trabajo fue apoyado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (proyecto IN204110) y por donativo del Instituto Bioclón S.A. de C.V. También se contó con apoyos por parte del programa SEP-CONACyT 48646 y 153496, concedidos al laboratorio del Dr. Lourival D. Possani. Durante sus estudios de doctorado, Juan Carlos Canul Tec recibió una beca otorgada por el CONACyT, con número de expediente 45248.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Lourival D. Possani Postay por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, por sus importantes aportaciones a esta tesis y por sus enseñanzas durante mi formación académica.

Al Dr. Alfredo Torres Larios por su asesoría en la determinación de la estructura de proteínas por cristalografía de rayos-X y por el compromiso demostrado durante la elaboración de este trabajo.

A la Dra. Lidia Riaño Umbarila, Dr. Baltazar Becerril Lujan, y Dr. Enrique Rudiño Piñera por su colaboración y la asesoría que me brindaron durante la elaboración de este trabajo.

A los técnicos académicos Sr. Fredy Coronas Valderrama, Biol. Sonia Rojas Trejo y M. en C. Leopoldo Guereca Gurrola por el apoyo técnico que me dieron en la parte experimental del proyecto de tesis.

A mi comité tutorial, Dr. Ernesto Ortiz Suri, Dr. Enrique Rudiño Piñera, Dr. Alfredo Torres Larios y Dr. Lourival D. Possani por su orientación y comentarios.

Al jurado de evaluación de esta tesis: Dr. Lorenzo Segovia, Dra. Liliana Pardo, Dra. Adela Rodríguez, Dra. Marcela Ayala y Dr. Baltazar Becerril por la revisión del escrito de la tesis doctoral. Sus correcciones y observaciones contribuyeron a mejorar la calidad de esta tesis.

A los integrantes de los laboratorios LDP, BB y GC por la ayuda y sugerencias que me han dado desde que me integré al laboratorio.

A Renato León por los incontables aventones Cuernavaca-DF-Cuernavaca.

A Gaby, Gina y a su familia por su amistad, compañía y apoyo.

Doy gracias especialmente a mis padres Antonio e Irene, a mis hermanos Antonio, Candi, José, Lupita, Miguel y Tomás, a mi familia y a Miryam por su apoyo, confianza y cariño.

ÍNDICE

	PÁG.
1. RESUMEN	9
1.1 Abstract	10
2. INTRODUCCIÓN	11
2.1 El veneno de los alacranes	12
2.2 Canales de sodio dependiente de voltaje (Na _v)	12
2.3 Toxinas de alacrán específicas para canales Na _v	14
2.4 La toxina Cn2 del alacrán <i>Centruroides noxius</i> Hoffmann	16
2.5 Reconocimiento de antígenos por los anticuerpos	16
2.6 Estructura de los anticuerpos	17
2.7 Fuerzas involucradas en la unión del antígeno	19
2.8 Fragmentos variables de cadena sencilla (scFv)	20
2.9 Estudios inmunológicos con la toxina Cn2	21
2.10 Fragmentos de anticuerpos de cadena sencilla de origen humano	21
2.11 ¿Cómo interacciona la toxina Cn2 con un anticuerpo neutralizante?	22
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	24
3.1 Hipótesis	24
3.2 Objetivo general	24
3.3 Objetivos específicos	24
4. MÉTODOS	25
4.1 Purificación de la toxina Cn2 de <i>Centruroides noxius</i> Hoffmann	25
4.2 Expresión y purificación del scFv 9004G	25
4.3 Formación y purificación del complejo 9004G-Cn2	25
4.4 Cristalización del complejo 9004G-Cn2	26
4.5 Colecta de datos y reemplazo molecular	26
4.6 Afinamiento de las estructuras del complejo 9004G-Cn2	27
4.7 Análisis de la estructura del complejo 9004G-Cn2	27
5. RESULTADOS	28
5.1 Purificación de la toxina Cn2 de <i>Centruroides noxius</i> Hoffmann	28
5.2 Purificación del scFv 9004G	28
5.3 Formación y purificación del complejo 9004G-Cn2	29
5.4 Cristalización del complejo 9004G-Cn2	31
5.5 Reemplazo molecular	32
5.6 Afinamiento de las estructuras del complejo 9004G-Cn2	33

5.7 Características generales del complejo 9004G-Cn2	35
5.8 Complementariedad de la interface del complejo 9004G-Cn2	38
5.9 Interacciones en la interface del complejo 9004G-Cn2	42
5.10 Puentes de hidrógeno mediados por moléculas de agua en la interface 9004G-Cn2	43
6. DISCUSIÓN.....	46
6.1 Interface del complejo 9004G-Cn2.....	46
6.2 Bases estructurales de la neutralización de la toxina Cn2	46
6.3 Bases estructurales de la reactividad cruzada del scFv 9004G.....	48
6.4 Comprensión de la estructura-función en la evolución de los diferentes scFv	49
7. CONCLUSIONES	51
8. PERSPECTIVAS	52
9. LITERATURA CITADA.....	53
10. ANEXO.....	59

ÍNDICE DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Condiciones de cristalización del complejo 9004G-Cn2	31
Tabla 2. Valores del Z-score del reemplazo molecular de la estructura del complejo 9004G-Cn2 en el grupo espacial $P2_12_12_1$	32
Tabla 3. Datos cristalográficos y estadísticas del afinamiento de la estructura del complejo 9004G-Cn2	34
Tabla 4. Superficie accesible al solvente y superficie de la interface del complejo 9004G-Cn2.....	39
Tabla 5. Caracterización de la interface 9004G-Cn2 y su comparación con interfaces similares	40
Tabla 6. Interacciones polares en la interface del complejo 9004G-Cn2	42
Tabla 7. Interacciones de van der Waals entre residuos de la interface 9004G-Cn2	43
Tabla 8. Puentes de hidrógeno mediados por agua en la interface 9004G-Cn2	45

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Representación esquemática de la subunidad α -funcional de los Na_v e identificación de los sitios receptores de las toxinas de alacrán	13
Figura 2. Alineamiento de secuencia de cuatro grupos farmacológicos distintos de β -toxinas de alacrán y plegamiento de toxinas representativas	15
Figura 3. Panorámica estructural de los anticuerpos	18
Figura 4. Fuerzas intermoleculares responsables de la unión del anticuerpo al antígeno .	20
Figura.5 Alineamiento de secuencia de los scFv 9004G y 6009F	22
Figura 6. Purificación del scFv 9004G	29
Figura 7. Purificación del complejo 9004G-Cn2.....	30
Figura 8. Cristales del complejo 9004G-Cn2	32
Figura 9. Unidad asimétrica de las estructuras del complejo 9004G-Cn2	33
Figura 10. Conformaciones del CDRL2 del dominio V_L de 9004G en las estructuras del complejo 9004G-Cn2	35
Figura 11. Estructura del complejo entre el scFv 9004G y la toxina Cn2.....	36
Figura 12. Densidad electrónica de la interface 9004G-Cn2.....	37
Figura 13. Estructuras de las toxinas Cn2 en solución y unida al scFv 9004G	38
Figura 14 Complementariedad química de la interface 9004G-Cn2	41
Figura 15. Interface del complejo 9004G-Cn2 visto desde la perspectiva de Cn2.....	43
Figura 16. Puentes de hidrógeno mediados por moléculas de agua en la interface del complejo 9004G- Cn2	44
Figura 17. El epítipo de Cn2 que reconoce 9004G se traslapa con el sitio de unión de la toxina a los Na_v de mamífero	47
Figura 18. Alineamiento de secuencia de los $\text{Na}_v1.x$ de mamífero afectados por las β -toxinas Cn2 y Css4	48
Figura 19. Base estructural de la neutralización de dos toxinas de alacrán de venenos diferentes con un solo scFv.....	49
Figura 20. Ambiente estructural de mutaciones clave en las variantes de los scFv que aumentan el reconocimiento por Cn2	50

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
A₆₀₀	Densidad óptica a 600 nanómetros
A₂₈₀	Densidad óptica a 280 nanómetros
Bis-Tris	Bis(2-hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)metano
CDR	Región determinante de complementariedad
Fab	Fragmento de unión al antígeno
g	Unidades de fuerza centrífuga relativa
HEL	Lisozima de huevo de gallina (Hen egg lysozyme)
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietilo)-1-piperazina etansulfónico
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
Ig	Inmunoglobulina
IgG	Inmunoglobulina tipo G
kDa	kilodalton
K_D	Constante de afinidad
KH₂PO₄	Fosfato de potasio monobásico
K_v	Canales de potasio dependientes de voltaje
LD₅₀	Dosis letal media
LLG	Logaritmo de la probabilidad de ganancia (Log-Likelihood Gain)
Mn	Media (Mean)
NaCl	Cloruro de sodio
Na₂HPO₄	Fosfato de sodio dibásico
Na_v	Canales de sodio dependientes de voltaje
(NH₄)₂SO₄	Sulfato de amonio
mAU	Mili unidades de absorbancia relativa
MHP	Potencial hidrofóbico molecular (molecular hydrophobic potential)
MPM	Marcador de peso molecular
PAGE-SDS	Electroforesis en geles de poliacrilamida y SDS
PBS	Solución amortiguadora de fosfato
PEG 3350	Polietilen glicol de 3350 Dalton
V_H	Dominio variable de la cadena pesada
V_L	Dominio variable de la cadena ligera
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMSD	Desviación de la media cuadrática (root-mean-square deviation)
SAS	Superficie accesible al solvente
sd	Desviación estándar (standard deviation)
SI	Superficie de la interface
S_c	Valor estadístico de complementariedad geométrica entre dos superficies
scFv	Fragmento variable de cadena sencilla (single chain Fragment variable)
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TFA	Ácido trifluoro acético
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano

1. RESUMEN.

Los alacranes de la familia *Buthidae* producen venenos con la capacidad de inducir un síndrome de intoxicación severa en humanos. Los componentes activos de los venenos de los alacranes son péptidos cortos que reconocen regiones específicas de los canales iónicos de sodio dependientes de voltaje de las células, causan una despolarización anómala de las células y de esta manera interfieren con su funcionamiento normal.

Varias especies del género *Centruroides* son relevantes desde el punto de vista médico. La especie *Centruroides noxius* Hoffmann es considerada la especie más peligrosa de México debido a la potente toxicidad de su veneno y frecuentemente se encuentra implicada en accidentes fatales. La toxina Cn2 es uno de los componentes más tóxicos y también uno de los componentes mayoritarios del veneno de *Centruroides noxius*.

Recientemente se reportaron varias clonas de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) que fueron seleccionados de una biblioteca de origen humano y que neutralizan los efectos *in vivo* de los venenos de las especies *Centruroides noxius* y *Centruroides suffusus suffusus*, a través de la interacción con sus toxinas primarias (Cn2 y C_{ss2}, respectivamente). A pesar de estudios bioquímicos e inmunológicos previos, la localización experimental del epítipo de Cn2 no se había determinado, así como tampoco se tenía una perspectiva de la relación estructura función de los anticuerpos neutralizantes.

En este trabajo se aisló la toxina Cn2 del veneno soluble de *Centruroides noxius* y se expresó de forma recombinante el scFv de origen humano 9004G. Ambas proteínas se obtuvieron con una pureza y homogeneidad que permitió la cristalización del complejo formado por 9004G y Cn2. La estructura del complejo se determinó en dos formas cristalinas a 2.55 y 1.9 Å de resolución. El epítipo estructural de Cn2 consiste de un segmento discontinuo de 19 residuos que 9004G reconoce a través de una hendidura en el centro del sitio de unión del anticuerpo, el cual está formado por cinco de las regiones determinantes de complementariedad del scFv.

El análisis de la estructura tridimensional de la interface del complejo 9004G-Cn2 reveló varias de las características de la interacción. La primera es la alta complementariedad que existe entre las superficies de interacción. La segunda es que el epítipo de Cn2 se superpone con residuos esenciales para la unión de las β -toxinas a su sitio en el receptor. Debido a la alta similitud de secuencia entre Cn2 y C_{ss2}, el análisis de la interface 9004G-Cn2 sugiere que el reconocimiento de C_{ss2} debe involucrar principalmente a residuos comunes en ambas toxinas. Finalmente, el análisis de residuos clave de la estructura del complejo 9004G-Cn2 explica el incremento en la afinidad que ocurrió durante el proceso de evolución dirigida que dio lugar a esta familia de scFv. Estos resultados proporcionan las bases estructurales que explican el mecanismo de la actividad neutralizante de 9004G y da información sobre el proceso de evolución dirigida que dio origen a esta familia de anticuerpos scFv neutralizantes.

1.1 Abstract.

Scorpions from the family *Buthidae* are known to have venoms capable of inducing a life threatening syndrome of intoxication to humans. The active components of its venoms are short-chain peptides that recognize specific sites in voltage-gated sodium channels, which lead to an altered depolarization of cells, thus impairing its normal functions.

Several species of the genus *Centruroides* are medically important. *Centruroides noxius* Hoffmann is the most dangerous specie of Mexico due to the potent toxicity of its venom. In addition, this specie is frequently associated to fatal cases. Cn2 toxin is one of the most toxic and also one of the major components of the *Centruroides noxius* venom.

It has been reported that several single-chain antibody fragments of human origin (scFv) neutralize the effects of two different scorpion venoms through interactions with two important toxins: Cn2 from *Centruroides noxius* and Css2 from *Centruroides suffusus suffusus*. Apart from previous biochemical and immunological studies, the localization of the toxin epitope and a structural perspective on the structure-function relationship of the different scFvs remained elusive.

Toxin Cn2 was isolated from the venom of *Centruroides noxius*. Both the Cn2 toxin and the recombinant scFv 9004G were obtained in sufficient quantities and with a high degree of purity, which allowed the crystallization of the complex 9004G-Cn2. The crystal structure of the complex formed between the scFv (9004G) and toxin Cn2 is described. Two different crystal forms were resolved at 2.55 and 1.9 Å resolution. A 19-residue span of Cn2 is recognized by the antibody through a cleft at the center of the binding site, which is formed by residues from five of the complementarity-determining regions of the scFv.

Analysis of the interface of the complex reveals several structural features. First one is the notable level of both shape and chemical complementarity between the interacting surfaces. Second, the epitope of toxin Cn2 overlaps with essential residues for the binding of β -toxins to its Na_v channel receptor site. Third, due to the high similarity of sequence between Cn2 and Css2, the interface of the complex indicates that the putative recognition site of Css2 involves mainly residues that are present in both toxins; Cn2 and Css2.

Finally, analysis conducted with the 3D structure of the complex can explain the raise of the binding affinities of reported key changes during the maturation process of the different scFv. Taken together, these results provide the structural basis that explains the mechanism of the double 9004G neutralizing activity and give insight into the process of directed evolution that gave rise to this family of neutralizing scFv.

2. INTRODUCCIÓN.

Los accidentes que involucran picaduras de alacrán representan un problema médico en varias partes del mundo debido a que la severidad y la incidencia de las picaduras son altas. Se estima que en el mundo ocurren más de un millón de picaduras de alacrán por año, que resultan en más de 3 mil muertes [1]. México es uno de los países con mayor morbilidad, con más de 200,000 casos de picaduras de alacrán reportados al año [2, 3].

La toxicidad del veneno de los alacranes se debe principalmente a la presencia de un repertorio de toxinas que reconocen regiones específicas de los canales iónicos, causan una despolarización anómala de las células y de esta manera interfieren con su funcionamiento normal. Las toxinas que se unen a los canales iónicos de sodio dependientes de voltaje (Na_v) son las principales responsables de los síntomas neurotóxicos desarrollados durante el envenenamiento por picadura de alacrán, debido a que modifican el mecanismo de apertura y cierre de los canales y su dependencia del voltaje [4].

La especie *Centruroides noxius* es una de las especies de alacranes más peligrosas de México debido a la potente toxicidad de su veneno. La toxina Cn2 es una toxina tipo β que interactúa de manera específica y con afinidad nanomolar con los canales Na_v subtipo 1.6 ($\text{Na}_v1.6$) [5]. Esta toxina es uno de los componentes más tóxicos [6] y también uno de los más abundantes del veneno de *C. noxius*. Se ha demostrado que la neutralización de este componente primario abate la toxicidad del veneno completo [7].

Riaño-Umbarila et al., [8] seleccionaron varias clonas de una biblioteca de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) de origen humano que neutralizan *in vivo* los efectos de los venenos de *Centruroides noxius* y de *Centruroides suffusus suffusus*, una especie relacionada. Una de las variantes resultantes, el scFv 9004G se une a las principales toxinas de los venenos de *C. noxius* y *C. suffusus suffusus* (Cn2 y Css2) con una alta afinidad, además de ser una de las variantes con mayor rendimiento en su expresión [9].

Debido al potencial terapéutico de los scFv de origen humano, el conocimiento del epítipo estructural reconocido por estos anticuerpos es una información relevante para entender el modo en que estos anticuerpos ejercen su función neutralizante y que puede utilizarse para modificar los anticuerpos existentes y generar moléculas con mejores propiedades.

Las determinantes estructurales de Cn2 y de su anticuerpo neutralizante no se habían averiguado, a pesar de los varios estudios bioquímicos e inmunológicos previos. El proyecto se enfocó en determinar la estructura tridimensional del complejo entre la toxina Cn2 y el scFv 9004G por medio de cristalografía de rayos-X. Lo anterior involucró la producción y purificación del complejo anticuerpo-toxina, el cual no se había obtenido en cantidad y calidad suficientes para estudios cristalográficos.

Se discute la estructura cristalográfica del complejo 9004G-Cn2, resuelto en dos formas cristalinas y a 2.5 y 1.9 Å de resolución. La comparación de la secuencia del epítipo reconocido por 9004G con la superficie activa de la β -toxina Css4, sugiere las bases estructurales de la gran eficiencia neutralizante de los anticuerpos scFv de origen humano.

La estructura cristalográfica del complejo 9004G-Cn2 junto con los datos bioquímicos disponibles, proporciona las bases estructurales para discutir la relación estructura-función (especificidad y afinidad) entre diferentes variantes de los anticuerpos scFv y las bases moleculares de la reactividad cruzada del anticuerpo 9004G contra las toxinas Cn2 y Css2.

2.1 El veneno de los alacranes

Los alacranes son artrópodos terrestres que constituyen uno de los grupos de animales más antiguos sobre la tierra (aparecieron hace más de 400 millones de años atrás). El orden Scorpiones incluye a nueve familias, representadas actualmente por alrededor de 1,500 especies [10, 11]. La familia *Buthidae* es la más extensa que existe e incluye a todas las especies que pueden causar síntomas neurotóxicos en mamíferos, incluyendo a los humanos. Las especies más venenosas se encuentran en los géneros *Androctonus* (África del norte y sureste de Asia), *Buthus* (Mediterráneo), *Centruroides* (sureste de Estados Unidos, México y Centroamérica), *Leiurus* (norte y medio este de África), *Mesobuthus* (Asia), *Parabuthus* (oeste y sur de África) y *Tityus* (centro y sur de América y el Caribe).

Las especies de alacranes tienen glándulas venenosas que han evolucionado para producir venenos que usan para capturar a sus presas y defenderse de sus predadores [12]. Los venenos son mezclas complejas de moléculas orgánicas y proteínas de bajo y alto peso molecular. Entre las proteínas de bajo peso molecular se encuentran abundantes péptidos extremadamente efectivos para inmovilizar o matar al organismo receptor. La presencia de múltiples toxinas en el veneno de una sola especie garantiza que el veneno al ser inyectado produzca un potente efecto sinérgico. Por otro lado, las toxinas del veneno de los alacranes exhiben una gran especificidad, por ejemplo, el veneno de una especie puede contener una toxina dirigida hacia invertebrados y otra sólo para vertebrados [13]. Los blancos principales de las toxinas son el sistema nervioso central o periférico del agresor o la presa.

Los dos grupos principales de péptidos neurotóxicos que reconocen canales iónicos se clasifican de acuerdo al número de aminoácidos en su estructura primaria: unos de 30 a 40 aminoácidos, y otros de 60 a 70 residuos. El primer grupo, afecta el funcionamiento normal de canales iónicos de potasio dependientes de voltaje (K_v) y el segundo grupo, a canales iónicos de sodio dependientes de voltaje (Na_v) [14, 15]. Además, se han descrito otras dos familias de toxinas de alacrán que pueden interactuar con canales de Cloro [16] y Calcio [17].

2.2 Canales de sodio dependiente de voltaje (Na_v)

Los canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v) son proteínas embebidas en la membrana plasmática celular, a través de las cuales pasan de forma rápida y selectiva iones de sodio. Estos canales son importantes en la excitabilidad celular debido a que participan en la generación y propagación de señales eléctricas (denominadas potenciales de acción) en neuronas y en células excitables, lo cual es esencial para la generación y propagación de impulsos nerviosos [18, 19].

Los Na_v están compuestos de una subunidad principal α (de 220-260 kDa) asociada con una o más subunidades β auxiliares (22-36 kDa), encargadas de modular las corrientes de sodio

y regular la expresión de los canales en la superficie de las células [20]. Estas subunidades necesitan expresarse junto con las subunidades α , para que estas últimas presenten un funcionamiento cinético normal y para la apertura dependiente de voltaje [19].

Las subunidades α contienen una cavidad acuosa que es selectivamente permeable a iones de sodio y constituye el poro funcional conductor de iones. En las células de mamífero se han caracterizado nueve subunidades α para los Na_v ($\text{Na}_v1.1$ - $\text{Na}_v1.9$). Estos subtipos se distribuyen diferencialmente a través de las células excitables del cuerpo, lo cual correlaciona con las diferentes propiedades funcionales que tienen los tejidos correspondientes. Los $\text{Na}_v1.1$, 1.2, 1.3 y 1.6 se expresan principalmente en el sistema nervioso central; los $\text{Na}_v1.7$, 1.8 y 1.9 se expresan en el sistema nervioso periférico y las isoformas $\text{Na}_v1.4$ y 1.5 están presentes en el músculo esquelético de adulto y en músculo cardíaco, respectivamente [21].

La subunidad α está compuesta de cuatro dominios homólogos (I-IV), cada uno de los cuales contiene seis segmentos α -hélice transmembranales (S1-S6) (Fig. 1). Cada dominio consiste de dos módulos. El primero es el módulo sensor de voltaje formado por los segmentos S1-S4 y el segundo es el módulo formador del poro, formado por los segmentos S5 y S6 y el asa que atraviesa la membrana entre S5 y S6 [22]. El canal responde al voltaje debido a sus segmentos S4. Estas estructuras cilíndricas α -helicoidales contienen motivos repetidos de un aminoácido cargado positivamente (Lys o Arg) cada tercer residuo. Se ha propuesto que estas cargas positivas son atraídas hacia dentro de la membrana por el potencial de membrana interno (negativo) y estabilizadas por la formación de pares iónicos con cargas negativas vecinas. Cuando la membrana se despolariza, el potencial de membrana negativo se libera y los segmentos S4 se mueven hacia afuera, causando un cambio de conformación que abre el poro e inicia la activación del canal [23].

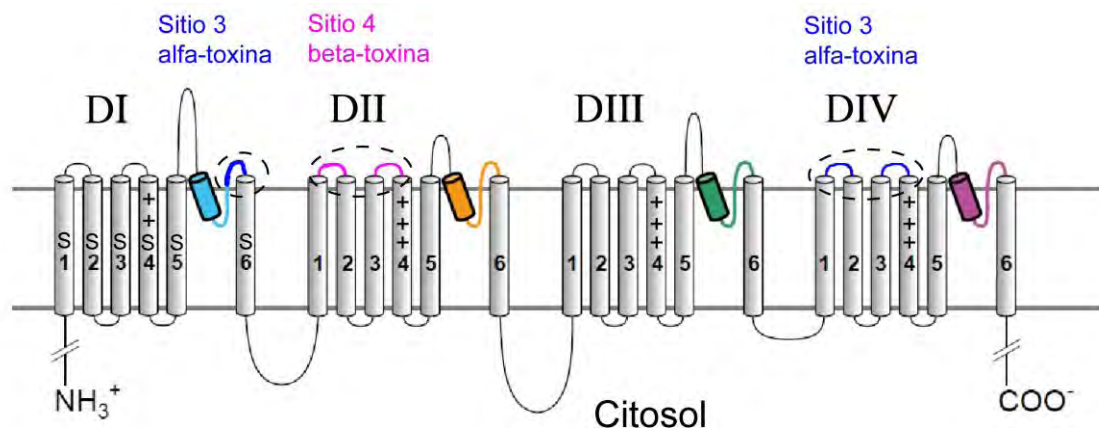


Figura 1. Diagrama de la subunidad α del canal Na_v e identificación de los sitios de interacción de las toxinas de alacrán que afectan a los Na_v (asas rosa y azules dentro de los óvalos punteados). Los cilindros representan los segmentos α -hélice transmembranales. El módulo sensor del voltaje (segmentos S1-S4) de cada dominio reside cerca del módulo formador del poro (segmentos S5-S6) del siguiente dominio, en una orientación en el sentido de las manecillas del reloj.

2.3 Toxinas de alacrán específicas para canales Na_v

Las toxinas de alacrán específicas para los canales Na_v se clasifican en α - y β -toxinas, de acuerdo a sus propiedades de unión y a su modo de acción [25, 26].

Las α -toxinas se unen al sitio 3 en una manera dependiente del voltaje y hacen más lento o inhiben el mecanismo de inactivación del canal, por lo tanto, prolongan la duración del potencial de acción. El sitio 3 está formado por aminoácidos del conector extracelular S5-S6 (SS2-S6) del dominio I (DI) y las asas extracelulares que conectan a los segmentos S1-S2 y S3-S4 y el segmento S3 en el dominio IV (DIV) [18, 27]. El modelo de la trampa del sensor de voltaje sugiere que la unión de la toxina al sitio 3 evita el movimiento normal del segmento S4 del DIV en respuesta a la despolarización, estabilizándolo en su posición inactivada y desacoplando los procesos de activación e inactivación rápida. Una despolarización prolongada fuerza que el segmento S4 del DIV se mueva hacia afuera, causando la disociación de la toxina [24].

Las β -toxinas se unen al sitio 4 de un modo independiente del potencial de membrana y causan la activación de los Na_v a voltajes de membrana más negativos que los normales. El sitio 4 está formado por aminoácidos de las asas extracelulares que conectan los segmentos S1-S2 y S3-S4 del dominio II (DII). De acuerdo al modelo de la trampa del sensor de voltaje, la toxina se une al canal en el estado de reposo y forma el complejo toxina-canal inicial. Tras una fuerte despolarización, el segmento S4 del DII se mueve hacia afuera y rota, aumentando de esta manera la accesibilidad de los aminoácidos en las asas S1-S2, S3-S4 y el extremo extracelular del segmento S4 del DII. En esta posición hacia afuera, el sensor de voltaje se une fuertemente a la toxina y queda atrapado en su conformación activa. Al momento de la siguiente despolarización de la membrana celular, el segmento S4 del DII permanece atrapado en su estado activado. Las subsecuentes despolarizaciones activan los canales a potenciales de membrana más negativos debido a que uno de los sensores de voltaje ya está activado [28-30].

Las β -toxinas de alacrán se clasifican en tres subtipos de acuerdo a sus preferencias por los Na_v de mamífero o de insectos (Fig. 2). El primer grupo son las β -toxinas “clásicas”, que son altamente tóxicas para mamíferos, entre ellas se encuentra la toxina C_{ss4} de *Centruroides suffusus suffusus* [31]. El segundo grupo comprende a las toxinas “tipo β ” que son altamente activas en Na_v de mamífero e insecto, como las toxinas Ts1 de *Tityus serrulatus* [32] y Lqh β 1 de *Leiurus quinquestriatus hebraeus* [33]. A diferencia de los dos grupos anteriores, el tercer grupo está formado por β -toxinas que no son tóxicas para mamíferos [34]. Dependiendo de sus efectos en vivo, estas toxinas se han clasificado como “excitatorias” o “depresantes” de acuerdo a los síntomas que provocan *in vivo* [25]. Ambas clases de toxinas compiten con alta afinidad por el sitio del receptor en preparaciones de membranas neuronales de insecto [34].

La mayoría de las toxinas específicas para los Na_v de los venenos de alacrán comparten una alta similitud de secuencia y un motivo α/β estabilizado por cisteínas, en donde dos puentes disulfuro enlazan un segmento de la α -hélice con una de las hebras de la hoja- β [35]. Las numerosas especificidades de estas toxinas se basan en este andamiaje conservado que puede acomodar diferentes inserciones, deleciones y mutaciones. Las β -toxinas de alacrán

mantienen un andamiaje formado por una α -hélice y una hoja β antiparalela, conformada por tres hebras β , con una conectividad de cuatro puentes disulfuro, lo que les confiere una alta estabilidad estructural (Fig. 2) [26, 36].

Específicas para mamífero	
Cn2	.K E G Y L V D K N T C K Y E E L K L G . D N D Y C L R E L K Q Q Y G K G A G G Y C Y . . A F A W C T H L Y E Q A I V W P L P N K R S
Cn3	.K E G Y L V E L G T C K Y E E F K L G . D N D Y C L R E L K A R Y G K G A G G Y C Y . . A F G W C T Q L Y E Q A V V W P L K N K T C R
Css2	.K E G Y L V S K S T C K Y E E L K L G . D N D Y C L R E L K Q Q Y G K S S G G Y C Y . . A F A W C T H L Y E Q A V V W P L P N K T C N
Css4	.K E G Y L V N S Y T C K F E E F K L G . D N D Y C L R E L R Q Q Y G K S S G G Y C Y . . A F G W C T H L Y E Q A V V W P L P N K T C N
Cl12	.K E G Y L V N H S T C K Y E E F K L G . D N D Y C L R E L K Q Q Y G K G A G G Y C Y . . A F G W C H L Y E Q A V V W P L P K T C N
Cl11	.K E G Y I V N L S T C K Y E E Y K L G . D N D Y C L R E L K Q Q Y G K G A G G Y C Y . . A F G W C T H L Y E Q A V V W P L P K T C N
Cell9	.K E G Y L V N H S T C K Y E E F K L G . D N D Y C L R E L R Q Q Y G K G A G G Y C Y . . A F G W C T H L Y E Q A V V W P L P K T C N A
Activas en mamífero e insecto	
Ts1	.K E G Y L M D H . E C K L S E F I R P . . S G Y G R E L G I K . . K G S S G Y C A . W P A T Y C G P N V V K V W D R A T N K S
Tz1	.K D S Y L V G N . D C K Y S E F T R P . . G T M A N S R V . . K G K D G Y C A . W M A T Y C Y S M P N W V K T W D R A T N K G R
LqhB1	.D N G Y L L N K A T C K V W E V I N N . . A S C N S E C K L R . . R G N Y G Y C Y F W K L A Y C E G A P K . S E L W A Y A T N K C N G K L
Excitatorias	
Bj-xtrIT	K N G Y P L D R . N K T T E S G V N A I A P H Y N S E C T K V Y . Y A E S G Y C C . . W G A T Y C F G L E D D K P I G P M K D I T K K Y D V Q I I P S
AahIT1	K N G Y A V D S . S K A P E E L L S N Y N N E C T K V H . Y A D K G Y C C . . L L S Y C F G L N D D K K V L E I S D T R K S Y D T T I I N .
LqqIT1	K N G Y A V D S . S K A P E E L L S N Y N N E C T K V H . Y A D K G Y C C . . L L S Y C F G L S D D K K V L E I S D A R K K Y D F V T I N .
Depresantes	
LqhIT2	.D G Y I K . R R D C K V A E L I G N E G D K E L K A Y . . G G S Y G Y C W T W G L A W C E G L P D . D K T W K S E T N T C G G K K
BjIT2	.D G Y I R . K K D C K V S E I I G N E G R K E L V A H . . G G S F G Y C W T W G L A W C E N L P D . A V T W K S S T N T C G R K K
BalIT2	.D G Y I R . R R D C K V S E L F G N E G D K E L K A Y . . G G S Y G Y C W T W G L A W C E G L P D . D K T W K S E T N T C G

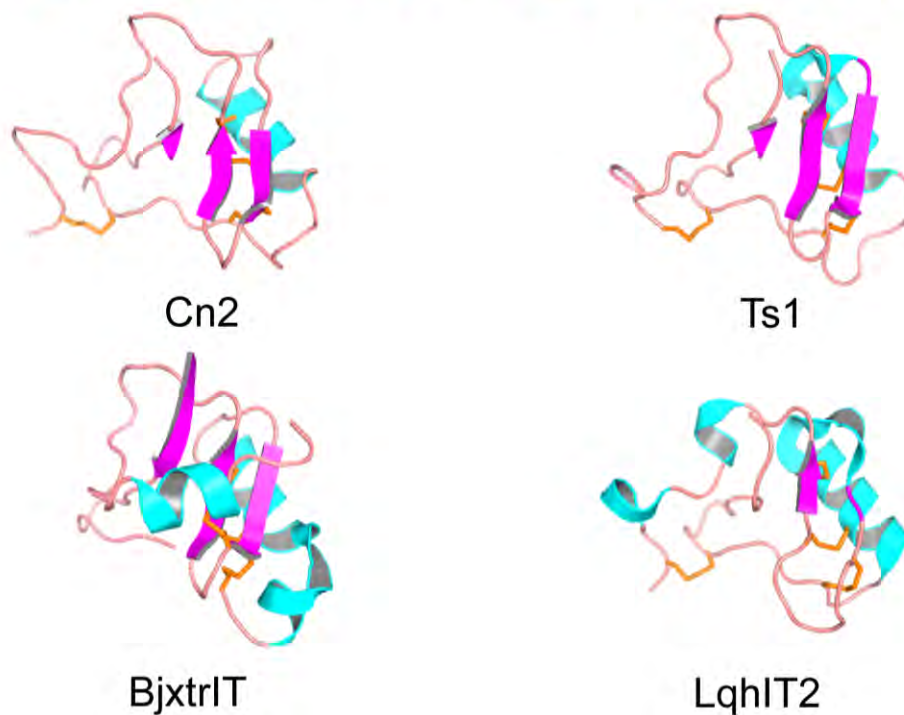


Figura 2. Alineamiento de secuencia de cuatro grupos farmacológicos de β -toxinas de alacrán y plegamiento de toxinas representativas. Los aminoácidos están coloreados de acuerdo a la conservación de su identidad y similitud, incluyendo las cisteínas involucradas en la formación de puentes disulfuro. Los guiones se insertaron para maximizar el alineamiento. Dentro de las β -toxinas específicas para mamífero se encuentran Cn2 y Cn3 de *Centruroides noxius*; Ccss2 y Ccss4 de *Centruroides suffusus suffusus*; Cl11 y Cl12 de *Centruroides limpidus limpidus*; Cell9 de *Centruroides elegans*. En el grupo de las β -toxinas activas en mamífero e insecto están Ts1 de *Tityus serrulatus*; Tz1 de *Tityus zulianus* y Lqhb1 de *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. Dentro del grupo de las β -toxinas excitativas para insectos están BjxtrIT de *Buthotus judaicus*; AahIT1 de *Androctonus australis hector*; LqqIT1 de *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. En el grupo de las toxinas depresantes para insectos se encuentran LqhIT2 de *L. q. hebraeus*; BjIT2 de *Buthotus judaicus*; BalIT2 de *Buthacus arenicola*. En la parte de abajo se muestran las estructuras de Cn2, Ts1, BjxtrIT y LqhIT2 (códigos de acceso PDB: 1CN2, 1NPI, 1BCG y 2I61, respectivamente).

2.4 La toxina Cn2 del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann

En México se han identificado por lo menos 220 especies de alacranes, pero sólo las que pertenecen al género *Centruroides* contienen en su veneno toxinas específicas para mamíferos y por lo tanto son peligrosas para los humanos. Las siete especies que afectan a los humanos son: *C. limpidus limpidus*, *C. limpidus tecomanus*, *C. infamatus*, *C. suffusus suffusus*, *C. noxius*, *C. elegans* y *C. sculpturatus*. Estas especies se encuentran distribuidas en la cuenca del pacífico y en la zona centro del país [2].

El alacrán *Centruroides noxius* es una especie endémica del estado de Nayarit y se le considera la especie más peligrosa de México por razones que incluyen el potente efecto de su veneno, el cual tiene una LD₅₀ de 5 µg por 20 g de peso corporal de ratón de la cepa CD1 [37].

La toxina Cn2 es el principal componente tóxico del veneno de *C. noxius*. Constituye ~6.8 % de la proteína total del veneno soluble y tiene una LD₅₀ de 0.25 µg por 20 g de peso corporal de ratón, cepa CD1 [7]. Este péptido está clasificado como una β-toxina “clásica” específica para Na_v1.6 de mamífero [5]. Su estructura primaria está constituida por 66 aminoácidos y su estructura terciaria consiste de un núcleo altamente empaquetado, con una topología βαββ, estabilizada por cuatro puentes disulfuro (Fig. 2) [38].

La toxina Cn2 presenta una alta similitud con las β-toxinas C_{ss}2 y C_{ss}4 del veneno de *C. suffusus suffusus* (~90%, Fig. 2). El alacrán *C. suffusus suffusus* es uno de los más peligrosos para la población rural en el Noroeste de México. El componente más abundante y venenoso que se encuentra en su veneno es la toxina C_{ss}2, la cual tiene una LD₅₀ de 0.70 µg por 20 g de peso corporal de ratón cepa CD1 [39]. Estas toxinas exhiben diferentes especificidades hacia los Na_v de mamífero. Cn2 y C_{ss}2 se unen con alta especificidad a los Na_v1.6 [5, 39], mientras que C_{ss}4 es específica para los Na_v1.2 y Na_v1.4 [5, 40].

El tratamiento contra el envenenamiento por picadura de alacrán consiste en la aplicación de un suero polivalente que neutralice el veneno que circula en la víctima. En México, la mortalidad ha descendido significativamente en los últimos veinte años gracias al suero “Alacramyn”. El suero consiste de fragmentos F(ab')₂ obtenidos de inmunoglobulinas policlonales que se purifican del suero de caballos que son inmunizados con la porción soluble de las glándulas maceradas de alacranes de las especies *C. limpidus limpidus*, *C. noxius* y *C. suffusus suffusus*.

2.5 Reconocimiento de antígenos por los anticuerpos

Los anticuerpos son proteínas producidas por el sistema inmune de los vertebrados. Estas moléculas se caracterizan por una diversidad casi infinita (en el orden de 10¹²) que excede por mucho el número de genes en el genoma humano. El mecanismo por el cual se genera este grupo altamente diverso de proteínas es través de una serie compleja de eventos somáticos (que incluyen recombinación somática y mutaciones), en dónde un grupo limitado de genes (en el orden de 10³) generan un enorme número de proteínas, cada una expresando un sitio de unión al antígeno diferente [41, 42]. Como consecuencia de esta gran diversidad, los anticuerpos pueden reconocer virtualmente todas las estructuras

moleculares conocidas, ya sea de origen biológico (proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, etc.) o sintético (pequeñas moléculas orgánicas).

2.6 Estructura de los anticuerpos

Las unidades básicas de los anticuerpos son dominios de inmunoglobulina (Ig). Cada una consiste de nueve hebras que forman una estructura compacta de dos hojas β antiparalelas estabilizada por un puente disulfuro [43]. La figura 3 ilustra las características estructurales de los dominios tipo Ig, cómo están ensamblados los anticuerpos y cómo reconocen de manera general a los antígenos. Los anticuerpos están formados de dos cadenas pesadas idénticas (HC) de ~500 aminoácidos y unidas a través de puentes disulfuro a dos cadenas ligeras idénticas (LC) de cerca de 250 residuos (Fig. 3a). Las cadenas HC y LC pueden dividirse en una porción N-terminal variable (V) y una porción C-terminal constante (C). Cada HC contiene cuatro o cinco dominios Ig (V_H , C_{H1} , C_{H2} , $C_{H3} \pm C_{H4}$, dependiendo del isotipo del anticuerpo), mientras que cada LC consiste de dos dominios (V_L y C_L). Los dominios V_L y C_L están unidos mediante puentes disulfuro a los dominios V_H y C_{H1} , respectivamente y forman el fragmento de unión al antígeno (Fab) (óvalo grande en Fig. 3a), que está unido a través de la región de bisagra a la región del fragmento cristalizante (Fc), formada por la asociación no covalente de los dominios $C_{H2-3/4}$ de ambas cadenas.

Los dominios variables de los anticuerpos (V_H y V_L) forman el fragmento variable, Fv (óvalo pequeño, Fig. 3a). Cada dominio variable contiene tres asas que conectan a las hebras β y son altamente variables en longitud y secuencia. Estas regiones denominadas como regiones determinantes de complementariedad (CDR) se encuentran cercanas en la superficie de los dominios variables y determinan la conformación del sitio de unión al antígeno (Fig. 3b, c). De esta manera, la variabilidad de los CDR le confiere la especificidad de unión a las regiones apicales de los dominios Ig. El paradigma central del reconocimiento del antígeno es que la estructura tridimensional formada por los CDR reconoce y se une a una superficie complementaria (epítipo) en el antígeno (Fig. 3d).

Aunque los CDR de los anticuerpos son altamente variables, adoptan un número limitado de estructuras canónicas [44]. El uso de los CDR varía de acuerdo al tamaño del antígeno. Los anticuerpos contra haptenos y péptidos no utilizan el CDRL2 [45], mientras que el reconocimiento de proteínas generalmente involucra los seis CDR [46]. Sin embargo, no todos los contactos de los CDR contribuyen significativamente con la interacción. Los CDR de la V_H y en particular el CDRH3, generalmente hacen más contactos que los CDR de la V_L . Existe una fuerte correlación entre los residuos que no forman contacto con el antígeno y aquellos que son importantes para la columna vertebral de las estructuras canónicas de los CDR. Estos residuos tienden a empacarse internamente y por lo tanto, están menos expuestos en la superficie de unión.

La capacidad neutralizante de un anticuerpo se basa en el reconocimiento estructural del epítipo, el sitio particular del antígeno al cual se une el anticuerpo. Algunos epítopos de las proteínas son secuenciales, es decir, involucran un segmento lineal de la proteína. En contraste, la mayoría de los epítopos que reconocen los anticuerpos son discontinuos, es decir, están formados por varias secuencias de aminoácidos que están separadas en la

secuencia primaria, pero que en la proteína plegada forman una superficie casi continua, lo cual dificulta su definición.

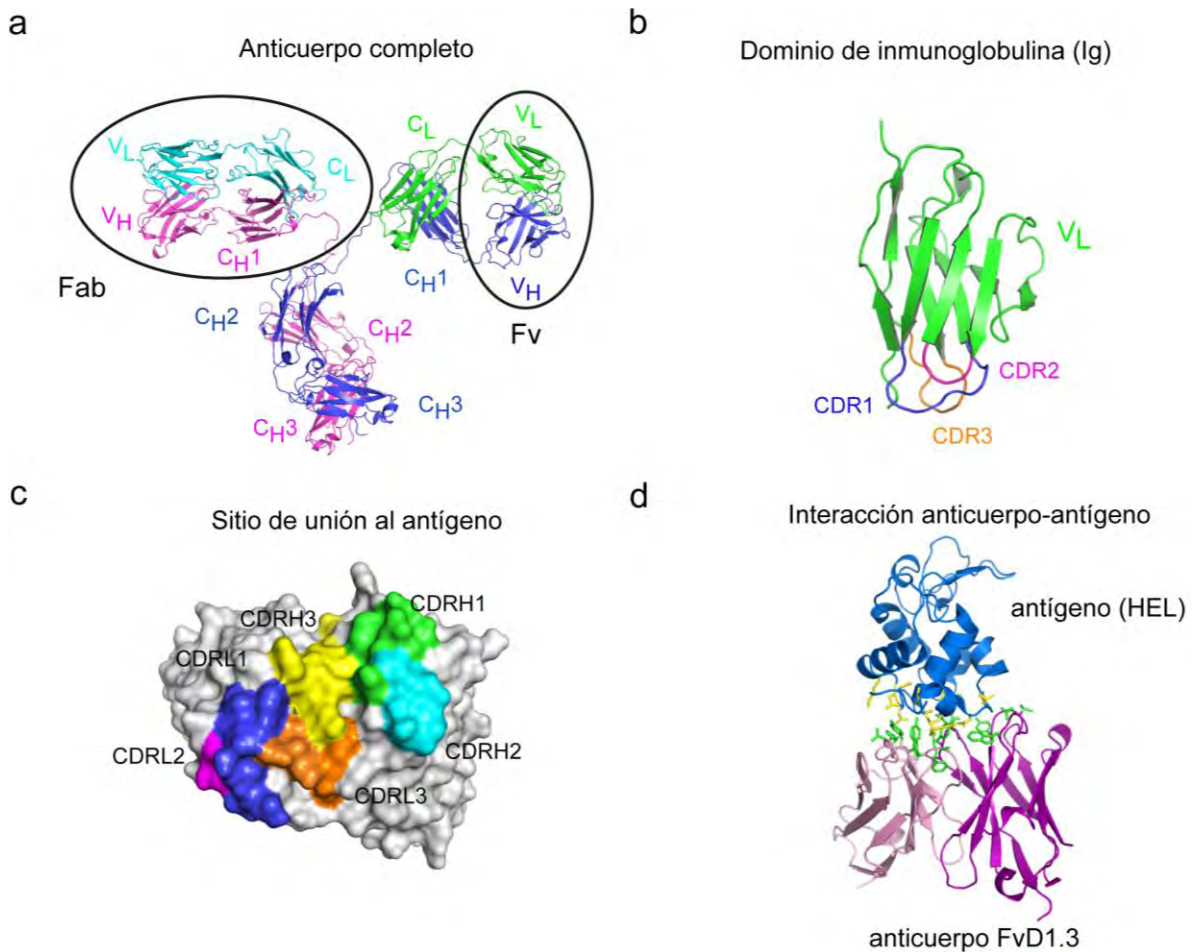


Figura 3 (tomado de [47]). Panorámica estructural de los anticuerpos. (a) Estructura del anticuerpo monoclonal tipo IgG2a de ratón Mab231 [48]. El anticuerpo completo incluye dos cadenas ligeras, cada una compuesta de un dominio variable (V_L) y un dominio constante (C_L) (cian y verde); y dos cadenas pesadas, cada una compuesta de un dominio variable (V_H) y tres dominios constantes (C_{H1} , C_{H2} y C_{H3}) (magenta y azul). Se indican los fragmentos Fab (óvalo grande) y Fv (óvalo pequeño). (b) Diagrama de listón del dominio V_L del anticuerpo Mab231, resaltando su estructura secundaria compuesta de dos hojas- β antiparalelas. Las asas de los CDR están marcadas, CDR1 (azul), CDR2 (magenta) y CDR3 (amarillo). (c) Superficie molecular del sitio de unión al antígeno de Mab231 formado por la intersección de las regiones apicales de los dominios V_L y V_H . Las asas de los CDR forman una superficie continua para el reconocimiento del antígeno. Los colores son como se indica: para la V_L , CDRL1 (azul), CDRL2 (magenta), CDRL3 (naranja); para la V_H , CDRH1 (verde), CDRH2 (cian), CDRH3 (amarillo). (d) Diagrama de listón del complejo anticuerpo-antígeno del Fv D1.3–lisozima de huevo de gallina (HEL). Los colores son como se indica: HEL (azul), dominio V_L de D1.3 (rosa) y dominio V_H de D1.3 (púrpura). Los residuos de HEL y de D1.3 involucrados en las interacciones de la interface del anticuerpo-antígeno están resaltados en amarillo y verde, respectivamente.

La superficie de la interface anticuerpo-antígeno se encuentra entre 1,400 y 2,300 Å², con contribuciones casi iguales de ambos. El armazón que flanquea los CDR comprende hasta 15% de la superficie cubierta del complejo anticuerpo-antígeno [46]. La topografía del sitio de unión de los anticuerpos varía significativamente con el tamaño del antígeno. Los antígenos más grandes (proteínas) a menudo contactan con residuos del anticuerpo en la frontera del sitio de unión e interactúan con porciones más apicales de las asas de los CDR. En contraste, los antígenos más pequeños (haptenos) son contactados por residuos de las hebras β que forman la base del sitio de unión. Los anticuerpos contra péptidos muestran un patrón que se encuentra entre las dos formas mencionadas. Los sitios de unión de los anticuerpos que reconocen proteínas grandes generalmente son planos, los que reconocen péptidos, ADN y carbohidratos frecuentemente tienen una muesca en la superficie de contacto con el antígeno, mientras que los haptenos son reconocidos por medio de distintas cavidades. Una característica de los complejos anticuerpo-péptido es que un motivo giro-β del péptido está inmerso en el sitio de unión [49].

2.7 Fuerzas involucradas en la unión del antígeno

La interacción del anticuerpo al antígeno está controlada por un complejo arreglo de fuerzas intermoleculares entre sus superficies (Fig. 4). La fuerza de la unión entre el anticuerpo y el antígeno (afinidad del anticuerpo) es producto de la suma entre fuerzas de atracción y repulsión (puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, interacciones de van der Waals y contactos hidrofóbicos) en la interface.

La fuerza de los enlaces no covalentes depende críticamente de la distancia entre los grupos que interactúan; mientras más cerca se encuentren los grupos, las fuerzas se volverán más significativas. Para que un epítipo se una al sitio de unión, la geometría de las proteínas debe complementarse. Es decir, debe haber grupos de átomos adecuados en las partes opuestas del antígeno y el anticuerpo y la forma del sitio de unión debe ajustarse al epítipo, de manera que puedan formarse simultáneamente múltiples enlaces no covalentes. Si el antígeno y su sitio de unión se complementan de esta manera, habrá suficiente energía de unión para resistir la disrupción de la unión. Sin embargo, si las nubes electrónicas del antígeno y el anticuerpo se traslapan, entrarán en juego fuerzas de repulsión estéricas. Estas fuerzas tienen un papel vital en determinar la especificidad del anticuerpo por un antígeno particular y en su capacidad para discriminar entre diferentes antígenos, debido a que cualquier variación de la forma complementaria ideal causará un decremento en la energía de unión total a través del aumento de las fuerzas de repulsión y la disminución de las fuerzas de atracción.

La formación de puentes de hidrógeno y de puentes salinos parece requerirse para un reconocimiento específico. La especificidad por un antígeno en particular surge de la complementariedad geométrica de las superficies que interactúan, creadas por la posición apropiada de los residuos y la correcta localización de grupos cargados y polares. La formación de puentes de hidrógeno se observa de manera más frecuente en las interacciones anticuerpo-antígeno, en comparación con otras interacciones proteína-proteína, y se considera que es un factor determinante de la especificidad.

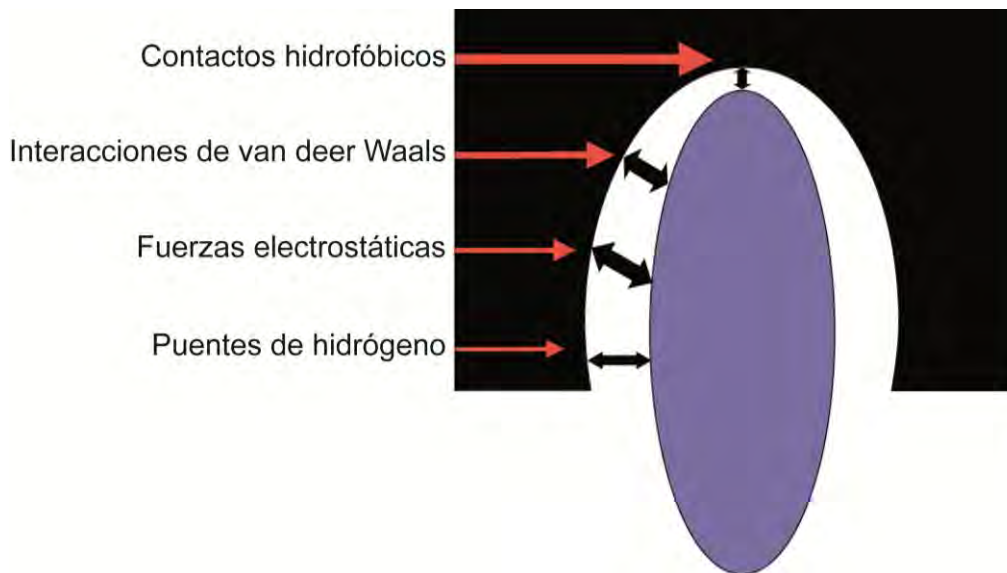


Figura 4. (tomado de [50]). Fuerzas intermoleculares responsables de la unión del anticuerpo al antígeno. Las fuerzas y las distancias intermoleculares relativas en las que las fuerzas actúan son diferentes. Los puentes de hidrógeno son comparativamente débiles y pueden ocurrir a través de distancias relativamente largas, mientras que los contactos hidrofóbicos son fuertes pero actúan a través de distancias relativamente cortas y por lo tanto requieren un buen ajuste del antígeno al sitio de unión del anticuerpo. El grosor de las flechas rojas representa la fuerza de la interacción, mientras que la longitud de la respectiva flecha negra refleja la distancia sobre la cual actúa.

2.8 Estudios inmunológicos con la toxina Cn2

Hace unos años se generó un panel de anticuerpos monoclonales en ratón utilizando a la toxina Cn2 como inmunógeno. Los anticuerpos obtenidos reconocieron cuatro epítomos diferentes en la toxina. Uno de los anticuerpos, denominado BCF2, mostró una potente actividad neutralizante *in vivo* contra los efectos tóxicos de Cn2 y del veneno completo de *C. noxius* en ratones BALB/c [7]. En un trabajo posterior se digirió el anticuerpo completo con papaína y se obtuvo el fragmento Fab del BCF2. El Fab conservó las propiedades neutralizantes del anticuerpo completo [51]. A pesar de su alta capacidad neutralizante y especificidad, el origen murino del BCF2 decrece su valor terapéutico, ya que la tendencia actual en el campo de los anticuerpos terapéuticos son los anticuerpos humanizados [52].

Debido a que la intoxicación por picadura de alacrán es un problema de salud pública en varias partes del mundo, se ha puesto un esfuerzo considerable en desarrollar tecnologías alternas para manufacturar antídotos en contra del veneno de los alacranes. La mayoría de las estrategias se han centrado en desarrollar nuevas moléculas con alta afinidad y especificidad por las toxinas más relevantes del veneno de los alacranes (revisado en [53]). En la actualidad existen varios enfoques para producir diversos fragmentos de anticuerpos como Fab y ScFv con mejores propiedades de reconocimiento, gracias a la tecnología de los anticuerpos recombinantes [54, 55].

2.9 Fragmentos variables de cadena sencilla (scFv)

Uno de los grandes logros en el campo de la ingeniería de anticuerpos fue la generación de varios formatos de fragmentos variables recombinantes que conservan las propiedades de especificidad de unión y afinidad de los anticuerpos naturales, usando una mínima cantidad de la secuencia del anticuerpo completo [56].

Los fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) son uno de los formatos más pequeños que se han reportado. Estos anticuerpos consisten de un dominio V_H y uno V_L , unidos covalentemente por un péptido conector flexible [57]. Se han utilizado conectores de varias longitudes, pero el más utilizado es $(Ser_4Gly)_3$ [58]. Este conector abarca una distancia de ~ 35 Å entre el carboxilo terminal de un dominio variable y el amino terminal del otro, sin alterar el arreglo tridimensional entre los dominios variables [59]. Esta característica, junto con el tamaño de los scFv, los ha hecho candidatos atractivos para su aplicación como terapéuticos. Varios scFv están actualmente en pruebas clínicas para tratar enfermedades del corazón y melanomas [60].

2.10 Fragmentos variables de cadena sencilla y de origen humano en contra las toxinas de alacrán

Una de las alternativas más promisorias a los anti-venenos clásicos es la posible aplicación de anticuerpos de origen humano. Riaño-Umbarila *et al.* [8], construyeron una biblioteca humana no inmune de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) y la evaluaron por medio de despliegue en fagos. A partir de esta biblioteca se aisló la clona 3F, la cual tiene una baja afinidad por Cn2, el antígeno para el cual fue aislada esta clona. Después de tres ciclos de evolución dirigida se seleccionó el scFv 6009F. A partir de 3F, pero siguiendo una ruta evolutiva diferente, se seleccionó la variante 9004G [9]. Ambos anticuerpos se unen a Cn2 con una alta afinidad (021 nM).

Las secuencias de 6009F y 9004G difieren entre ellas por diez cambios, seis en el dominio V_H y cuatro en el dominio V_L (Fig. 5). De manera notable, ambos anticuerpos son capaces de neutralizar *in vivo* los efectos de los venenos de los alacranes *C. noxius* y *C. suffusus suffusus*. La combinación de un residuo clave en 6009F (Phe¹⁰¹) en el contexto de 9004G resultó en la variante LR [9]. Esta clona tiene un mayor nivel de expresión, afinidad y estabilidad que las clonas 6009F y 9004G, además de que presenta una mejor actividad neutralizante.

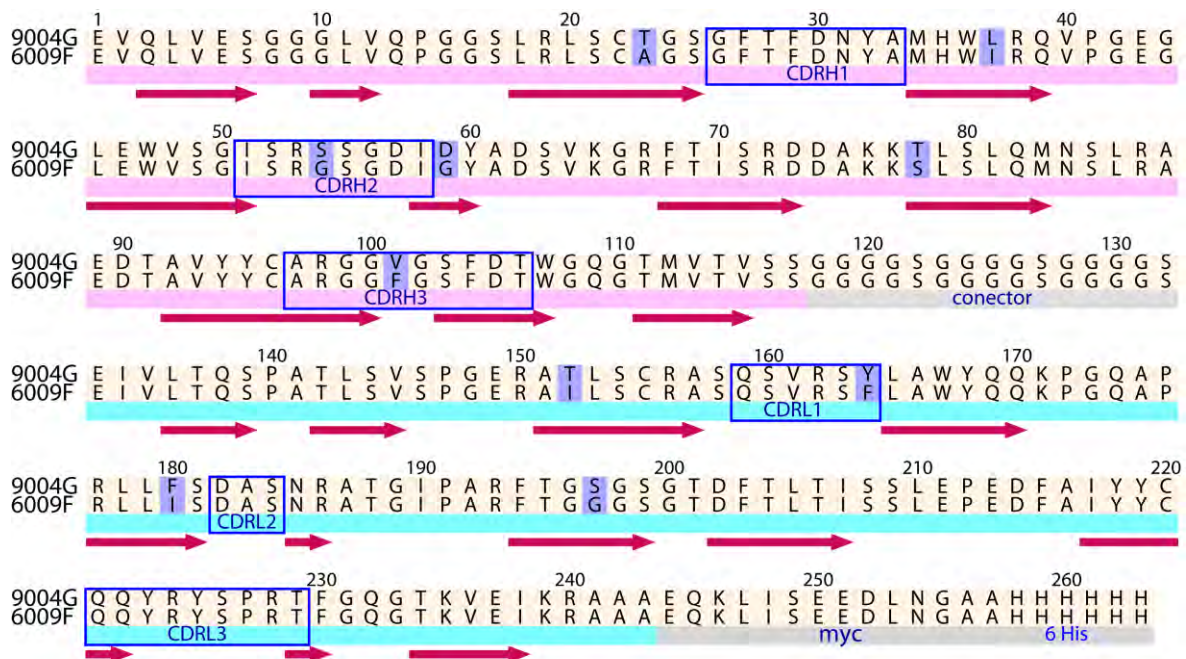


Figura 5. Alineamiento de secuencia de 9004G y 6009F. El dominio V_H está conectado por un péptido de $(Gly_4Ser)_3$ al dominio V_L . Los cambios en las secuencias están resaltados en púrpura. Debajo de la secuencia de 6009F se señalan los dominios V_H (franja magenta) y V_L (franja cian); el conector y las colas *myc* y 6His (franjas grises). Las hebras β de los dominios del anticuerpo 9004G se describen con flechas rojas. Las cajas azules indican las regiones de los CDR.

2.11 ¿Cómo interacciona un anticuerpo neutralizante con la toxina Cn2 de *Centruroides noxius*?

Un tema principal en la investigación biomédica y biotecnológica es la definición de los sitios de las proteínas involucrados en interacciones no covalentes, genéricamente referidos como epítopos [61]. La caracterización del epítopo y del sitio con que interactúa (parátipo) contribuye al entendimiento a nivel molecular y de las fuerzas físicas implicadas en el fenómeno de reconocimiento mediado por los anticuerpos. La determinación del epítopo puede usarse para el desarrollo de nuevas vacunas y es un aspecto esencial en el descubrimiento y desarrollo de diagnósticos y anticuerpos terapéuticos. Consideraciones sobre la propiedad intelectual de la patente son otras razones importantes para mapear el epítopo de un anticuerpo terapéutico. Las agencias regulatorias recomiendan que para cada anticuerpo que sea usado en humanos debería determinarse el epítopo antigénico.

El epítopo que reconoce el BCF2 probablemente incluye regiones de los extremos amino y carboxilo de Cn2. Lo anterior se determinó por medio del análisis del desplazamiento del pegado de la toxina al BCF2 con péptidos sintéticos correspondientes a varios segmentos de Cn2 [62]. También se generó un modelo tridimensional del complejo entre el Fv del BCF2 y Cn2 por medio de “acoplamiento molecular”. El modelo predice que el BCF2 debe interactuar con los extremos amino y carboxilo de Cn2 [63].

Por otra parte, el epítipo que reconocen 6009F y 9004G no se traslapa con los epítipos que reconocen el BCF2 y el “Alacramyn”, según lo determinado por experimentos de competencia de pegado en el BIACORE [64].

A pesar de los enfoques complementarios empleados durante más de dos décadas, la localización del epítipo que reconocen los anticuerpos humanos en la toxina Cn2 no se había determinado experimentalmente.

Un enfoque más preciso para definir un epítipo estructural y su correspondiente parátipo consiste en determinar la estructura tridimensional del complejo compuesto por el anticuerpo (o su correspondiente fragmento variable) y su antígeno respectivo. La cristalografía de rayos-X es la técnica más sensible, en términos de exactitud y resolución, para elucidar las interacciones moleculares proteína-proteína siempre que puedan obtenerse complejos estables en forma cristalina [65]. Debido a la naturaleza repetitiva de los cristales, cuando se hacen pasar rayos-X por ellos se generan los patrones de difracción. Estos pueden relacionarse con las coordenadas tridimensionales de los aminoácidos que componen el antígeno y su anticuerpo por medio de transformadas de Fourier. La estructura obtenida generalmente representa la estructura genuina del complejo anticuerpo-antígeno, su orientación relativa con respecto uno del otro y la definición precisa de la interface entre ellos [66].

En el caso de los fragmentos de cadena sencilla de origen humano que neutralizan a los principales componentes tóxicos del veneno de alacranes, la determinación de la estructura tridimensional del complejo anticuerpo-antígeno proporciona además, las bases estructurales para discutir la relación estructura-función entre las variantes de los anticuerpos. La información tridimensional de la estructura del complejo 9004G-Cn2 es valiosa en el campo de la ingeniería de anticuerpos para mejorar las propiedades de reconocimiento de estos anticuerpos.

3.0 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis.

Durante el proceso de envenenamiento por picadura de alacrán, las β -toxinas del veneno del alacrán *Centruroides noxius* se unen a regiones específicas de los canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v) de humano. La unión de la toxina al canal ocasiona una despolarización anómala de las células e interfiere con su funcionamiento normal.

Existe información detallada de la interacción de la β -toxina C_{ss4} con los canales Na_v . Si la mayoría de los residuos que son cruciales para la interacción y actividad de la toxina C_{ss4} con los canales Na_v están conservados en las β -toxinas de alacranes del género *Centruroides*, entonces el scFv 9004G debe ejercer su eficiente acción neutralizante en contra de la β -toxina Cn2 por medio de la captura de la mayoría de estos residuos.

3.2 Objetivo General.

El objetivo general del trabajo consistió en cristalizar y determinar la estructura tridimensional del complejo que forman el anticuerpo tipo scFv 9004G y la β -toxina Cn2, el principal componente tóxico del veneno de *Centruroides noxius*.

3.3 Objetivos específicos.

Desarrollar un protocolo para extraer y purificar el anticuerpo recombinante 9004G, que permita obtenerlo con un mejor rendimiento y con una pureza adecuada para emplearlo en la búsqueda de condiciones de cristalización del complejo 9004G-Cn2.

Purificar la toxina Cn2 a partir del veneno soluble de *Centruroides noxius* y de acuerdo al protocolo reportado por nuestro grupo de investigación [7].

Ya que para las pruebas de cristalización es recomendable que la proteína se encuentre mono-dispersa (en el mismo estado de oligomerización), uno de los objetivos particulares del trabajo consistió en purificar a homogeneidad el complejo entre 9004G y Cn2.

Obtener el complejo estable 9004G-Cn2 en su forma cristalina, difractar los cristales del complejo y resolver su estructura tridimensional por medio de cristalografía de rayos-X.

Analizar la interface del complejo 9004G-Cn2 para caracterizar la naturaleza de la interacción entre ambas proteínas y explicar las bases estructurales de la eficiente neutralización de la toxina Cn2 por el anticuerpo tipo scFv 9004G.

4.0 MÉTODOS.

4.1 Purificación de la toxina Cn2 de *Centruroides noxius* Hoffmann

La toxina Cn2 se purificó a partir de 611 mg de veneno soluble liofilizado de alacranes de la especie *Centruroides noxius* por medio de una serie de pasos cromatográficos que incluyeron una cromatografía de exclusión molecular y tres cromatografías de intercambio catiónico a diferentes pH, de acuerdo al método publicado [7]. Durante la purificación se verificó la identidad de la toxina por medio de espectrometría de masas, usando la técnica de ionización por electrospray. Las fracciones con la toxina Cn2 se juntaron y liofilizaron antes de dar un paso adicional de purificación en un sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Las alícuotas de Cn2 se cargaron en una columna analítica de fase reversa C-18 (VYDAC) equilibrada previamente con solución A (0.12% de TFA en agua). La muestra se eluyó de la columna con un gradiente lineal de 20–40% de solución B (0.10% TFA en ACN) en 20 min, con un flujo de 1 ml min⁻¹. Las fracciones con la toxina se colectaron, liofilizaron y almacenaron a -20 °C, hasta su uso.

4.2 Expresión y purificación del scFv 9004G

La secuencia que codifica para 9004G está clonada en el vector pSyn1 y contiene una cola *myc* seguida de una cola de seis Histidinas en el extremo carboxilo. Este vector se transfirió a células competentes de la cepa TG1 de *E. coli*. El scFv 9004G se expresó tal como se describió previamente [8]. Las células transformadas crecieron a 37° C hasta que la A₆₀₀ alcanzó 0.9 unidades, entonces se indujo la expresión del scFv con 1 mM de IPTG a 30 °C. Seis horas después de la inducción, las células se cosecharon por centrifugación a 5,515x g, 10 minutos. La pastilla se suspendió en 20 ml de amortiguador A (20 mM Na₂HPO₄, 40 mM imidazol, 500 mM NaCl a pH 7.4). Las células se lisaron por sonicación en un baño de hielo. El desecho celular insoluble se removió por centrifugación a 20,410x g, 30 minutos.

El lisado clarificado se cargó en una columna de 5 ml de Ni⁺² Sepharose FF (GE Healthcare) conectada a un equipo de purificación Äkta (GE Healthcare). La columna se lavó con amortiguador A para separar las proteínas no específicas. La columna se eluyó con un gradiente lineal de amortiguador B (20 mM Na₂HPO₄, 400 mM de imidazol, 500 mM NaCl a pH 7.4). Las fracciones en donde se encontró el anticuerpo se juntaron y se pasaron por una columna de desalado HiTrap (GE Healthcare) y equilibrada con amortiguador C (40 mM Tris a pH 8.5). La proteína desalada se aplicó en una columna MonoQ 5/50 (GE Healthcare) equilibrada con amortiguador C y se eluyó con un gradiente de amortiguador D (40 mM Tris, 500 mM NaCl a pH 8.5). La concentración de proteína se determinó espectrofotométricamente a A₂₈₀, asumiendo 1 unidad de absorbancia equivalente a 0.7 mg ml⁻¹ de anticuerpo. Durante los diferentes pasos de purificación se analizó la pureza de varias fracciones con el anticuerpo por medio de PAGE-SDS, bajo condiciones reductoras.

4.3 Formación y purificación del complejo 9004G-Cn2

El scFv 9004G purificado se concentró a ~1 mg ml⁻¹ usando una unidad de filtración Amicon Ultra filter (Millipore) con un corte de membrana de 30 kDa. Las proteínas purificadas se cambiaron a amortiguador PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄ a pH 7.2). El complejo se obtuvo mezclando las proteínas

purificadas 9004G y Cn2. Para asegurar la saturación del scFv 9004G con la toxina, el componente más pequeño se añadió en un exceso molar de 1.3. La reacción se incubó durante una hora a temperatura ambiente y con agitación suave. El complejo producido se concentró a $\sim 7 \text{ mg ml}^{-1}$ (Amicon Ultra filter Millipore, 30 kDa) y se purificó con una columna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) y equilibrada con amortiguador PBS. La columna se operó con un flujo de 0.5 ml min^{-1} .

4.4 Cristalización del complejo 9004G-Cn2

La solución del monómero del complejo 9004G-Cn2 se concentró a $\sim 20 \text{ mg ml}^{-1}$ (Amicon Ultra filter Millipore, 30 kDa). Los ensayos de cristalización del complejo 9004G-Cn2 se realizaron a 19° C y usando dos métodos de cristalización. El método de difusión de vapor –modalidad de gota sentada– se usó junto con los kits Index HT, PEG/Ion Screen HT, Crystal Screen HT (Hampton Research), usando placas de cristalización de 96 pozos (Corning) con posiciones para tres gotas. Las gotas se prepararon con una mezcla de $1 \mu\text{l}$ de la solución de proteína ($5, 10$ y 20 mg ml^{-1}) y $1 \mu\text{l}$ de la solución precipitante, equilibradas con $100 \mu\text{l}$ del reservorio (solución precipitante).

El método de “*microbatch*” se usó junto con los kits Screen Lite y Quick Screen (Hampton Research), mezclando volúmenes iguales de $1 \mu\text{l}$ de la solución del complejo a 7.9 mg ml^{-1} y de solución precipitante. Las gotas quedaron inmersas bajo aceite de parafina (Hampton Research). Los cristales adecuados para el análisis de difracción de rayos-X se congelaron directamente en N_2 líquido, inmediatamente después de haberlos cosechado y preservado con la solución protectora correspondiente.

4.5 Colecta de datos y reemplazo molecular

Los datos de difracción se colectaron en un detector CCD MAR Mosaic MX-300 en las líneas Life Sciences Collaborative Access Team (LS-CAT) 21-ID-F y G en el sincrotrón Advanced Photon Source (Argonne National Laboratory, Chicago, Illinois, Estados Unidos). Las mediciones se realizaron en cristales individuales, a 110° K . Los datos de la difracción se colectaron con el método de rotación y usando rayos-X con una longitud de onda de 0.979 \AA . Los datos se indizaron e integraron con MOSFLM [67] y XDS [68], respectivamente y se redujeron con SCALA [69].

Los modelos preliminares de la estructura cristalina del complejo 9004G-Cn2 se obtuvieron por reemplazo molecular usando el programa PHASER, dentro de la suite de programas del CCP4 (Collaborative Computational Program Number 4) [70] y en los grupos espaciales $\text{P2}_1\text{2}_1\text{2}_1$ (datos colectados a 2.55 \AA) y F23 (datos colectados a 1.9 \AA). Los modelos de búsqueda que dieron lugar a las fases iniciales de la estructura a 2.55 \AA se generaron a partir de un modelo teórico del complejo 6009F-Cn2 (elaborado por Mónica Domínguez-Laguna). La solución del reemplazo molecular del complejo 9004G-Cn2 en el grupo espacial F23 se encontró usando como modelo de búsqueda las coordenadas de uno de los complejos de la estructura a 2.55 \AA .

4.6 Afinamiento de las estructuras del complejo 9004G-Cn2

Cinco por ciento de los datos se utilizaron para validar el curso del afinamiento, mediante el cálculo del factor R_{free} [71]. El afinamiento se hizo con los programas REFMAC5 y phenix.refine, dentro de la suite de programas de CCP4 [69] y Phenix [72], respectivamente. El afinamiento se alternó con la inspección de los mapas y la modificación del modelo en el programa COOT [73], hasta que se alcanzaron los menores valores posibles de R y R_{free} , junto con la mayor convergencia. Las moléculas de agua se colocaron automáticamente en COOT y se validaron si se encontraba un pico de densidad por arriba de 3σ en un mapa de diferencia y por arriba de 1σ en un mapa de doble diferencia; otra condición para validar las moléculas de agua fue que cada molécula de agua tuviera al menos un contacto polar entre 2.6 y 3.5 Å.

Las coordenadas atómicas y los factores de estructura de los modelos finales del complejo 9004G-Cn2 en los grupos espaciales $P2_12_12_1$ y F23 se depositaron en el Protein Data Bank (PDB) con los códigos de acceso 2YBR y 2YC1, respectivamente.

4.7 Análisis de la estructura del complejo 9004G-Cn2

La estereoquímica de los modelos finales se validó con PROCHECK [74] y el servidor AutoDepInputTool (<http://deposit.pdb.org/adit/>). La localización de las moléculas de agua conservadas y la superposición de los modelos se hizo con el servidor 3dss [75]. Las moléculas de agua en la interface se localizaron con el servidor Water Analysis Package [76]. El parámetro S_c se calculó con el programa Sc, tal como está implementado en la suite de programas del CCP4 [69]. La superficie de la interface se calculó con el servidor PISA [77].

Los residuos de la interface del complejo se ubicaron con CONTACT [69] y se definieron arbitrariamente como los residuos del anticuerpo o de la toxina que aportan al menos 2 \AA^2 a la superficie de la interface (ver tabla 4). Los enlaces de hidrógeno y puentes salinos se identificaron con los servidores WHAT IF [78] y ESBRI [79], respectivamente. Los contactos hidrofóbicos y “no canónicos” se identificaron con el servidor PIC, usando los criterios estándar del servidor [80]. El potencial electrostático se calculó con el programa APBS [81], usando la herramienta APBS de PyMOL. El potencial hidrofóbico molecular (MHP) se calculó con el servidor PLATINUM [82]. Las figuras se generaron con los programas PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC), ALINE [83] e Illustrator (Adobe Systems, Inc).

5.0 RESULTADOS

5.1 Purificación de la toxina Cn2 de *Centruroides noxius* Hoffmann

La toxina Cn2 (fracción II-9.2.2) se aisló del veneno soluble del alacrán. Durante las etapas finales de purificación se verificó la identidad de la toxina por medio de espectrometría de masas, obteniendo un componente de 7588 Da correspondiente al peso molecular de Cn2. La cantidad total de toxina pura obtenida fue de ~38 mg (5.6% del veneno total). La toxina purificada se liofilizó y antes de usarse se reconstituyó en agua destilada y se aplicó a una columna de fase reversa C-18 conectada a un sistema HPLC, para obtener el péptido homogéneo y libre de sales.

5.2 Purificación del scFv 9004G

Es importante obtener cantidades grandes del scFv para la determinación cristalográfica de la estructura del complejo, debido a que usualmente se requieren varias decenas de mg de proteína pura para la búsqueda de condiciones de cristalización. El scFv 9004G fue seleccionado para los estudios cristalográficos con Cn2 porque es uno de los anticuerpos con mayor rendimiento (1.9 mg L^{-1}), además de que interactúa con Cn2 con una alta afinidad [9]. El scFv 9004G se expresó siguiendo el procedimiento reportado [8]. El anticuerpo se extrajo de las células y se purificó mediante choque osmótico y cromatografía de afinidad a Níquel, respectivamente, con el objetivo de mejorar el rendimiento reportado.

Después de la expresión del anticuerpo, las células de *E. coli* se rompieron por sonicación y las proteínas liberadas se separaron del desecho celular por centrifugación. El sobrenadante clarificado (fracción S) se aplicó en una columna de afinidad a Níquel. La columna se lavó después de cada inyección hasta que la A_{280} disminuyó (fracciones 1 y 2, Fig. 6a). En el gel de PAGE-SDS (Fig. 6c), se observan múltiples bandas en los carriles con las fracciones del extracto clarificado (fracción S) y en el volumen de lavado de la columna (fracción 1).

En el perfil de elución de la cromatografía se observó un solo pico que eluye con 125 mM de imidazol (fracciones 4 y 5). En el carril con la fracción 4 (Fig. 6c) se observa una banda mayoritaria en el intervalo del peso molecular del scFv 9004G (27,905 Da). También son visibles otras bandas de menor peso molecular, que corresponden a otras proteínas.

Las fracciones del pico (fracciones 4 y 5) se desalaron mediante filtración en gel. La proteína resultante se aplicó a una columna de intercambio aniónico. El pico principal (fracciones 12-14) sale alrededor de 95 mM de NaCl en un gradiente de NaCl (Fig. 6b). En los carriles con las fracciones 12-14 únicamente se distingue la banda correspondiente al scFv 9004G (Fig. 6c), misma que se va enriqueciendo en la fracción correspondiente a medida que aumenta el área del pico. En el carril con la fracción 15, además del anticuerpo se distingue otro componente de menor peso molecular (pico pequeño en Fig. 6b).

El rendimiento final fue superior al reportado, obteniéndose rendimientos de $\sim 10 \text{ mg L}^{-1}$. El aumento en el rendimiento se debe principalmente a una mejor eficiencia de la recuperación del anticuerpo del periplasma de las células, combinado con un proceso de purificación más rápido y eficiente.

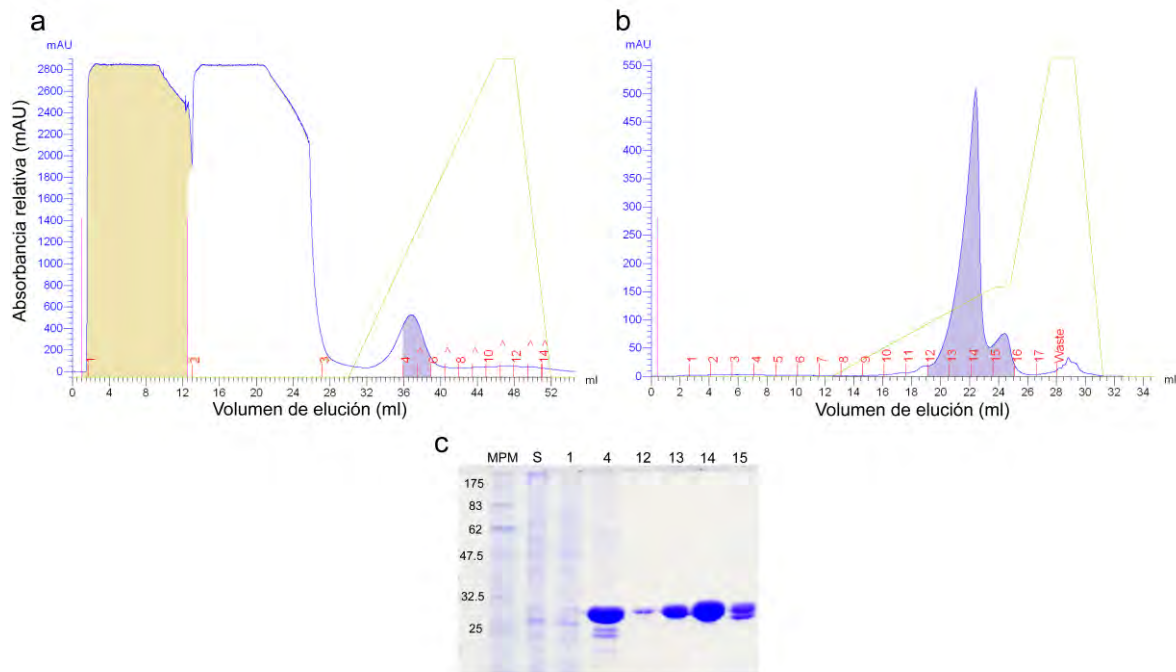


Figura 6. Purificación del scFv 9004G. (a) Perfil de elución de la columna de afinidad a Ni²⁺ Sepharose FF (GE Healthcare). En colores beige y morado se resaltan las fracciones 1, 4 y 5. (b) Perfil de elución de la columna de intercambio aniónico MonoQ 5/50 (GE Healthcare). En color morado se resaltan los tubos colectados tras la purificación. (c) Gel de SDS-PAGE al 12%, en condiciones reductoras, con fracciones de la purificación de 9004G. Los números de las fracciones se indican en la parte de arriba del gel. MPM es el marcador de peso molecular en kDa. La fracción S es el sobrenadante clarificado que se inyectó a la columna. Los carriles 1 y 4 corresponden a la cromatografía de afinidad (a). En los carriles siguientes se cargaron las fracciones 12 a 15 de la cromatografía de intercambio iónico (b).

5.3 Formación y purificación del complejo 9004G-Cn2

Los anticuerpos tipo scFv tienden a asociarse y a formar dímeros en solución dependiendo de la concentración de proteína, la longitud del conector y detalles estructurales de cada scFv en particular, que no se han entendido completamente [84, 85]. En presencia del antígeno, la interface V_H-V_L del monómero puede estabilizarse contra la dimerización que resulta de una alta concentración, [86].

En soluciones diluidas (~0.1 mg ml⁻¹), el scFv 9004G y el complejo 9004G-Cn2 permanecen en estado de monómero (Dato no mostrado). Esto es consistente con los reportes que muestran que a concentraciones ≤ 1 mg ml⁻¹, los monómeros son las especies termodinámicamente más estables en scFv con conectores de 15 a 25 aminoácidos. Sin embargo, a concentraciones relevantes para la cristalización (≥ 3.5 mg ml⁻¹), el complejo 9004G-Cn2 eluye de la columna de filtración en gel como una mezcla de oligómeros. En el perfil de elución se observaron picos pobremente resueltos, que no pudieron colectarse de manera individual (Dato no mostrado). Con esta mezcla de oligómeros se pusieron pruebas

de cristalización empleando el método de difusión de vapor (modalidad de gota sentada), sin embargo, no se obtuvieron cristales.

Para las pruebas de cristalización es recomendable que la proteína se encuentre monodispersa (en el mismo estado de oligomerización). Por lo tanto, se purificó un nuevo lote del anticuerpo y se mantuvo a una concentración de $\sim 1 \text{ mg ml}^{-1}$ ($35 \mu\text{M}$) para mantener el scFv 9004G predominantemente como monómero. El complejo se formó añadiendo un exceso molar de 30% de toxina a la muestra diluida de 9004G.

La cromatografía de filtración en gel indica que la toxina favoreció la población de monómero del complejo 9004G-Cn2 después de concentrar la solución a 7 mg ml^{-1} . El complejo 9004G-Cn2 eluyó en dos picos resueltos con una proporción de dímero a monómero de $\sim 1:2$ (Fig. 7). Únicamente las fracciones con el monómero del complejo 9004G-Cn2 se concentraron y se usaron para las pruebas de cristalización debido a que fue la población mayoritaria.

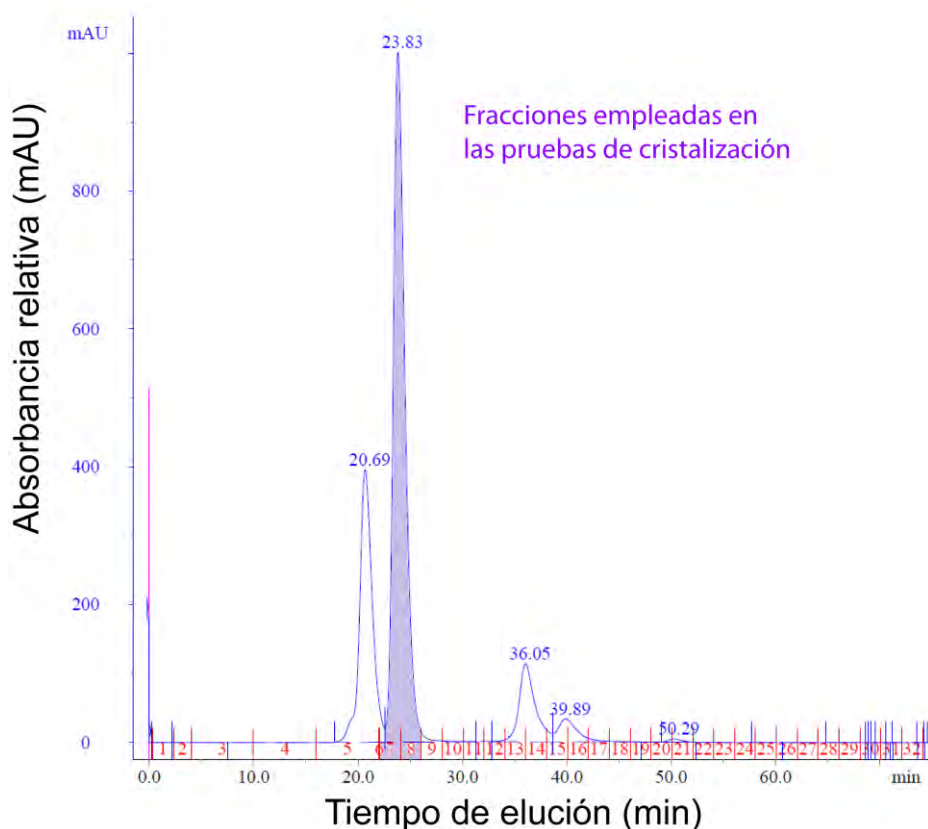


Figura 7. Purificación del complejo 9004G-Cn2. Perfil de elución del complejo 9004G-Cn2 a $\sim 7 \text{ mg ml}^{-1}$ (relación molar 1:1.3) de la columna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare). El pico en el tiempo 20.69 corresponde al dímero del complejo 9004G-Cn2, mientras que el pico a 23.83 min es el complejo 9004G-Cn2 en estado de monómero. En color morado se resaltan las fracciones empleadas en las pruebas de cristalización. El pico en el tiempo 36.05 probablemente se debe al exceso molar de Cn2 usado en el experimento.

5.4 Cristalización del complejo 9004G-Cn2

El complejo 9004G-Cn2 cristalizó en una semana con el método de difusión de vapor –modalidad de gota sentada– y en varias condiciones de los kits PEG/Ion Screen HT e Index HT (Tabla 1). El rango de pH de las condiciones en dónde crecieron los cristales es de 4.8 a 8.5 y a concentraciones de proteína de 5 y 10 mg ml⁻¹. El precipitante en todas las condiciones en dónde crecieron cristales fue PEG 3350 al 20% y 25%. Los cristales que se cosecharon se preservaron incrementando la concentración de PEG 3350 a 35% (w/v) en la gota donde cristalizaron. Los cristales se difractaron y se colectaron cinco juegos de datos con resoluciones de 2.9 a 2.55 Å (el cristal de mejor calidad de difracción se obtuvo con 100 mM Bis-Tris, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 25% PEG 3350 a pH 5.5).

Tabla 1. Condiciones de cristalización del complejo 9004G-Cn2 en el grupo espacial P2₁2₁2₁

Kit PEG/Ion HT			
Sal	pH	Precipitante	Concentración de proteína (mg ml ⁻¹)
0.2 M Sulfato de sodio	6.6		5
0.2 M Sulfato de potasio	6.8	20% (w/v)	5, 10
0.2 M Sulfato de amonio	6.0	PEG 3350	5
0.2 M Fosfato de potasio monobásico	4.8		5
Kit Index HT			
Sal	Amortiguador	Precipitante	Concentración de proteína (mg ml ⁻¹)
0.2 M Sulfato de amonio	0.1 M Bis-Tris pH 5.5		5
0.2 M Sulfato de amonio	0.1 M Bis-Tris pH 6.5		5, 10
0.2 M Cloruro de sodio	HEPES pH 7.5		5
0.2 M Sulfato de litio	0.1 M Bis-Tris pH 5.5	25% (w/v)	5, 10
0.2 M Sulfato de litio	0.1 M Bis-Tris pH 6.5	PEG 3350	10
0.2 M Sulfato de litio	HEPES pH 7.5		5
0.2 M Sulfato de litio	0.1 M Tris pH 8.5		5, 10

Al indexar los juegos de datos se encontró que todos los cristales pertenecen al grupo espacial ortorrómbico P2₁2₁2₁. La primera estructura del complejo 9004G-Cn2 se resolvió con el set de datos a 2.55 Å. El cálculo del coeficiente de Matthews ($V_M = 2.61$, contenido de solvente de 53%) sugirió la posible presencia de 3 complejos 9004G-Cn2 en la unidad asimétrica del cristal.

Los cristales del complejo 9004G-Cn2 obtenidos con el método de “*microbatch*” aparecieron alrededor de dos semanas, en una gota con 1.4 M Na₂HPO₄/K₂HPO₄ a pH 5.6 (Fig. 8). Los cristales de mayor tamaño se preservaron en una solución que contenía el agente precipitante y 25% (v/v) de glicerol. Estos cristales se difractaron siete meses después de haber obtenido los primeros juegos de datos. Uno de estos cristales difractó a 1.9 Å de resolución y pertenece al sistema cúbico F23. Este cristal tiene un coeficiente de Matthews de 3.11, un volumen de solvente de 61% y 2 complejos 9004G-Cn2 en la unidad asimétrica.

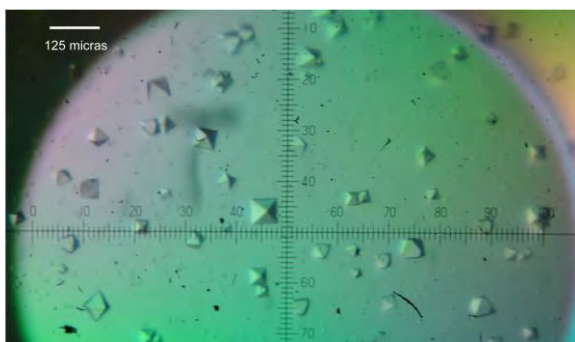


Figura 8. Cristales del complejo 9004G-Cn2 obtenidos con el método de “*microbatch*”, vistos bajo luz polarizada. Los cristales crecieron después de dos semanas a 19° C y en una gota con 1.4 M Na₂HPO₄/K₂HPO₄ a pH 5.6, bajo aceite de parafina.

5.5 Reemplazo molecular

La estructura del complejo 9004G-Cn2 se determinó por reemplazo molecular en Phaser, en dos grupos espaciales diferentes. El coeficiente de Matthews del cristal en el grupo ortorrómbico P2₁2₁2₁ sugirió que la unidad asimétrica contiene 3 complejos 9004G-Cn2. El uso de un modelo teórico del complejo 6009F-Cn2 para la búsqueda de fases iniciales de la estructura a 2.55 Å no proporcionó ninguna solución.

La siguiente estrategia consistió en dividir el modelo del complejo 6009F-Cn2 en tres partes –V_H y V_L del scFv 6009F y Cn2– y someter estos dominios parciales como conjuntos de búsqueda independientes. Esta búsqueda dio una solución con valores de Z-score en las funciones de rotación (RFZ) y traslación (TFZ) de 7.0 y 10.9 para la V_L; 7.1 y 33.6 para la V_H; 5.4 y 22.3 para Cn2. Los autores del programa Phaser han establecido que valores de RFZ por arriba de 5.0 y de TFZ por arriba de 8.0 pueden indicar una solución correcta [70]. Las siguientes búsquedas encontraron soluciones para dos moléculas adicionales de V_L, V_H y Cn2, con valores más altos de Z-score (Tabla 2) y un valor del “*log-likelihood gain*” (LLG) para la solución final de 4,046. Lo anterior indicó claramente que las posiciones para las tres copias del complejo fueron determinadas.

Tabla 2. Valores del Z-score[#] obtenidos en el programa Phaser para el reemplazo molecular* de la estructura del complejo 9004G-Cn2 en el grupo espacial P2₁2₁2₁

	RFZ(1)	TFZ(1)	RFZ(2)	TFZ(2)	RFZ(3)	TFZ(3)
V _L	7.0	10.9	6.0	20.4	6.1	25.9
V _H	7.1	33.6	6.1	28.1	5.7	26.5
Cn2	5.4	22.3	4.4	18.9	4.4	33.3

[#] El Z-score es el número de desviaciones estándar que la solución se encuentra por arriba de la media.

* En el reemplazo molecular se utiliza una estructura homóloga (con al menos 25% de identidad en secuencia) que se rota y traslada en la celda unitaria problema hasta encontrar la orientación y posición relativa de los ejes moleculares. La mejor solución es la que mejor explica los datos experimentales. Con esa solución se puede aproximar un conjunto de fases iniciales que se van afinando repetidamente hasta llegar al modelo más acorde con el patrón de difracción.

La estructura del complejo 9004G-Cn2 determinada en el grupo espacial F23 se resolvió usando uno de los complejos determinados en el grupo espacial $P2_12_12_1$ como modelo de búsqueda. Esta búsqueda dio un resultado con valores de score-Z para las funciones de rotación y traslación de 12.0 y 34.1, respectivamente, para el primer complejo y de 13.3 y 63.7 para el segundo complejo de la unidad asimétrica. En este caso, también se obtuvo un valor alto del “log-likelihood gain” para la solución final (LLG= 4,949).

En resumen, la estructura del complejo 9004G-Cn2 se determinó en dos grupos espaciales diferentes (Fig. 9). Una estructura, con tres complejos en la unidad asimétrica, se determinó en el grupo espacial ortorrómbico $P2_12_12_1$, a 2.55 Å. La segunda estructura, con dos complejos en la unidad asimétrica, se determinó en el grupo espacial cúbico F23, a 1.9 Å.

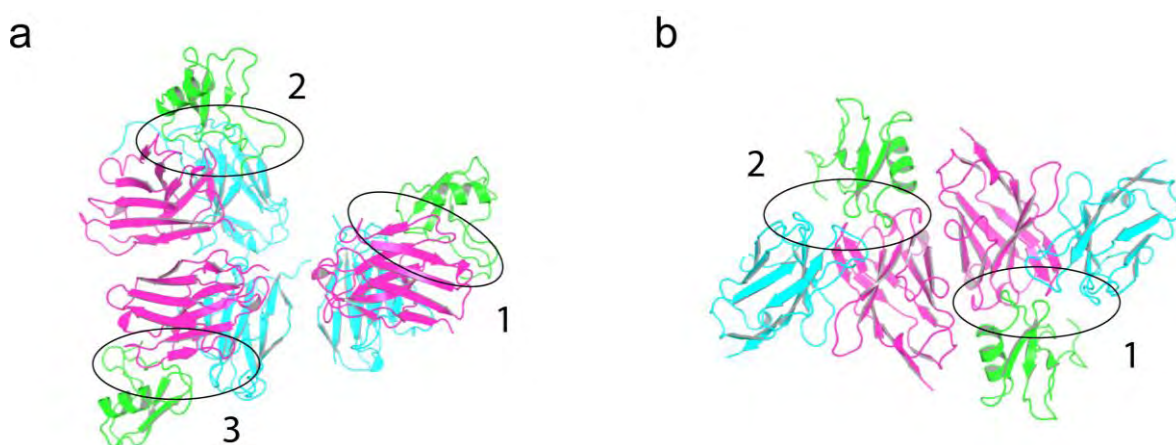


Figura 9. Unidad asimétrica de las estructuras del complejo 9004G-Cn2. (a) Estructura en el grupo espacial $P2_12_12_1$, con tres complejos 9004G-Cn2 en la unidad asimétrica. (b) Estructura en el grupo espacial F23, con dos complejos 9004G-Cn2 en la unidad asimétrica. Las moléculas de Cn2 están coloreadas en verde y los dominios V_H y V_L de 9004G están coloreados en magenta y cian, respectivamente. La superposición de los cinco complejos da un valor de RMSD de ~ 0.6 Å (para 288 Ca comunes de 9004G y Cn2). La interface 9004G-Cn2 (óvalos negros) en los complejos de las dos estructuras es casi idéntica.

5.6 Afinamiento de las estructuras del complejo 9004G-Cn2

Debido a su resolución, durante las etapas iniciales del afinamiento de la estructura a 2.55 Å se introdujeron restricciones “fuertes” de simetría no cristalográfica (NCS) para los átomos de cada uno de los dominios V_H , V_L y Cn2 que forman los tres complejos de la unidad asimétrica. Para minimizar el R_{free} se probaron diferentes ponderaciones para las restricciones NCS. La ponderación que mejor funcionó fue de 0.1. Las restricciones de NCS se liberaron en los últimos ciclos de afinamiento.

El modelo inicial de la estructura del complejo 9004G-Cn2 a 1.9 Å se generó automáticamente con el servidor ARP/wARP [87], obteniendo un modelo virtualmente completo. El modelo se mejoró mediante ajustes manuales en COOT. El afinamiento se

hizo con protocolos estándar en REFMAC5 y phenix.refine. El afinamiento concluyó en REFMAC5, después de adicionar nueve moléculas de glicerol y asignar conformaciones alternas a catorce cadenas laterales.

Los afinamientos finales convergieron a valores de R/R_{free} de 19.2/24.7% en la estructura resuelta a 2.55 Å y 18.5/21.1% en la estructura resuelta a 1.9 Å. Las estadísticas de la colecta de datos y el afinamiento se reportan en la Tabla 3.

Tabla 3. Datos cristalográficos y estadísticas del afinamiento de la estructura del complejo 9004G-Cn2

Parámetros	Valores	
Estadísticas de la colecta de datos		
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	F23
Dimensiones de la celda unitaria		
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	69.8, 104.5, 152.5	219.7, 219.7, 219.7
Ángulos $\alpha = \beta = \gamma$ (grados)	90.0	90.0
Coefficiente de Matthews (Å ³ Da ⁻¹) /		
Cantidad de solvente (%)	2.61 / 52.97	3.11 / 60.51
Intervalo de resolución (Å)	46.20-2.55 (2.69-2.55) ^a	54.94-1.90 (2.00-1.90)
Número de reflexiones únicas	37,179 (5,378)	68,864 (9,978)
Multiplidad	6.4 (6.4)	11.4 (11.4)
Integridad de los datos (%)	99.9 (100.0)	100.0 (100.0)
^b R _{sym} (%)	9.5 (33.4)	7.5 (29.6)
<i>I</i> / σ	6.4 (2.3)	6.3 (2.5)
Mn (<i>I</i> /sd)	14.2 (5.1)	22.2 (8.1)
Complejos por unidad asimétrica	3	2
Estadísticas del afinamiento		
Intervalo de resolución (Å)	45.72-2.55 (2.62-2.55)	42.28-1.90 (1.95-1.90)
^c R/R_{free} (%)	19.2 (30.5) / 24.7(32.3)	18.5 (23.0) / 21.1 (26.5)
Número de átomos, proteína/ligando/solvente	6,721/ ^d N.A./220	4,532/54/568
Valor <i>B</i> promedio (Å ²), proteína/ligando/solvente	32.9/N.A./29.0	23.4/38.6/33.3
Valor <i>B</i> obtenido de la gráfica de Wilson (Å ²)	32.8	20.1
RMSD enlaces (Å)	0.01	0.01
RMSD ángulos (grados)	1.27	1.16
Error coordinado σ_A (validación cruzada)	0.48	0.12
Residuos en la gráfica de Ramachandran (%)		
En la región máxima permitida	645 (89.3%)	439 (91.1%)
En la región adicional permitida	74 (10.2%)	39 (8.1%)
En la región generosamente permitida	3 (0.4%)	2 (0.4%)
En la región no permitida	0 (0.0%)	2 (0.4%)

^a Los valores en paréntesis son para la franja de mayor resolución

^b $R_{sym} = \sum |I_j - \langle I \rangle| / \sum I_j$, en donde I_j es la intensidad de una reflexión individual, e $\langle I \rangle$ es la intensidad promedio para esa reflexión; la suma se extiende a todas las intensidades

^c $R = \sum ||F_{obs}| - |F_{calc}|| / \sum |F_{obs}|$, en donde F_{obs} y F_{calc} son los factores de estructura observado y calculado, respectivamente. El valor de R_{free} se calculó a partir de un juego de reflexiones seleccionadas al azar y que no se usaron en el afinamiento (5% de los datos)

^dNo aplica

Los modelos finales exhiben una buena calidad estereoquímica (Tabla 3). Los residuos del CDRL2 (Asp^{L182}-Ser^{L184}) forman parte de un giro- γ clásico en cada scFv de la estructura a 1.9 Å. El residuo Ala^{183L}, en la punta del CDRL2, está en una conformación forzada (Figura 10a) y sus ángulos de torsión ϕ y ψ (+69.4°, -42.9°) están cerca del valor promedio encontrado en este tipo de giro (+75°, -60°) [88]. Este residuo, asume ángulos de torsión prohibidos en la mayoría de las estructuras de V_L conocidas [44]. En la estructura a 2.55 Å (Figura 10b), los residuos del CDRL2 (Asp^{L182}-Ser^{L184}) forman un giro- β en cada scFv. Los ángulos dihedrales de la cadena principal de Ala^{183L} son diferentes (-46.3°, -41.6°) y se encuentran en una región permitida de la gráfica de Ramachandran.

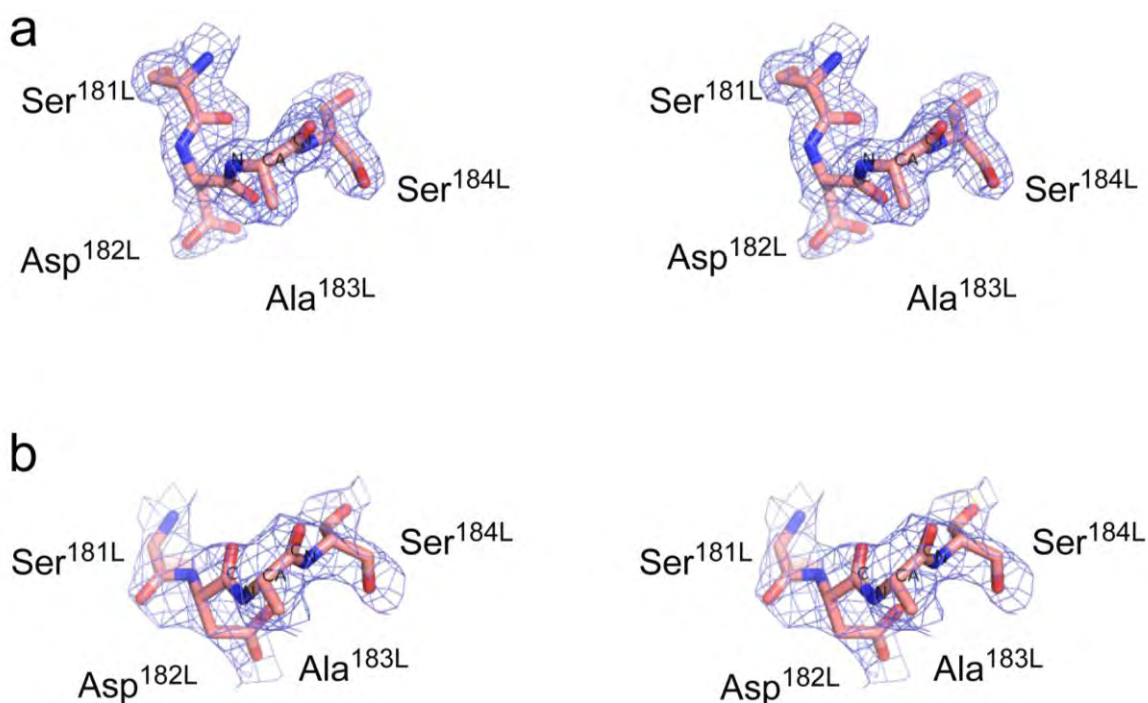


Figura 10. Representación en estéreo del CDRL2 de la V_L de 9004G en las estructuras del complejo 9004G-Cn2. (a) CDRL2 en la estructura a 1.9 Å. (b) CDRL2 en la estructura a 2.55 Å. Los residuos de los dominios V_H y V_L son seguidos por los superíndices ^H y ^L, respectivamente. El ángulo ϕ del residuo Ala^{183L} (que involucra los átomos C'-N-C α -C') es diferente en ambas estructuras. El ángulo ψ (que involucra los átomos N-C α -C'-N) es similar en ambas estructuras. El mapa de omisión de simulado recocido, ponderado a 1 σ (malla azul), se encuentra traslapado.

5.7 Características generales del complejo 9004G-Cn2

En las dos estructuras, cada complejo contiene una molécula de Cn2 y los dominios V_H y V_L del scFv 9004G. Aunque el empaquetamiento cristalino en las estructuras es diferente, la superposición de todos los complejos de las unidades asimétricas da un valor de RMSD de ~0.6 Å (para 288 C α comunes de 9004G y Cn2). Lo anterior indica que los complejos en ambas estructuras son casi idénticos. Debido a lo anterior, el análisis y discusión que se presentan a continuación se basan principalmente en la estructura del complejo 9004G-Cn2 a 1.9 Å.

Los dominios V_H (residuos 1 a 117) y V_L (residuos 133 a 239) de 9004G adoptan el plegamiento canónico de los dominios de inmunoglobulina (Fig. 11). No se observan las colas *myc* y de seis Histidinas del extremo carboxilo de 9004G en los mapas de densidad electrónica de las estructuras del complejo. Únicamente un tercio del conector (Gly_4-Ser)₃ es visible en la densidad electrónica que antecede a los dominios V_L de la estructura a 2.55 Å. Tanto el conector, como los extremos amino y carboxilo normalmente se encuentran desordenados en las estructuras cristalográficas de scFv [89-92].

La toxina Cn2 presenta una conectividad de cuatro puentes disulfuro que estabilizan un plegamiento globular altamente estructurado. El 38% de su secuencia está implicada en la formación de una hélice- α y una hoja- β . La hélice- α ($Asp^{23}-Tyr^{33}$) se encuentra altamente empacada contra una hoja β antiparalela formada por tres hebras β (Lys_1-Tyr_4 , $Gly^{38}-Tyr^{42}$ y $Ala^{45}-Tyr^{51}$). Estos elementos de estructura secundaria están conectados por asas que abarcan gran parte de la superficie de la toxina (Fig. 11). El C-terminal de Cn2 (Ser^{66}) no es visible en el mapa de densidad electrónica de las moléculas de Cn2.

La estructura del complejo 9004G-Cn2 muestra claramente que una molécula de la toxina es capturada por el scFv a través de múltiples interacciones mediadas por cinco CDR de 9004G (Fig. 11). Los CDR del scFv se proyectan hacia una región sobresaliente del núcleo con forma de cono de Cn2, con la cadena lateral del Glu^{15} como el “ancla” central. El CDRL2 ($Asp^{L182}-Ser^{L184}$) no forma parte de la interface del complejo debido a que se localiza en la periferia del sitio de unión.

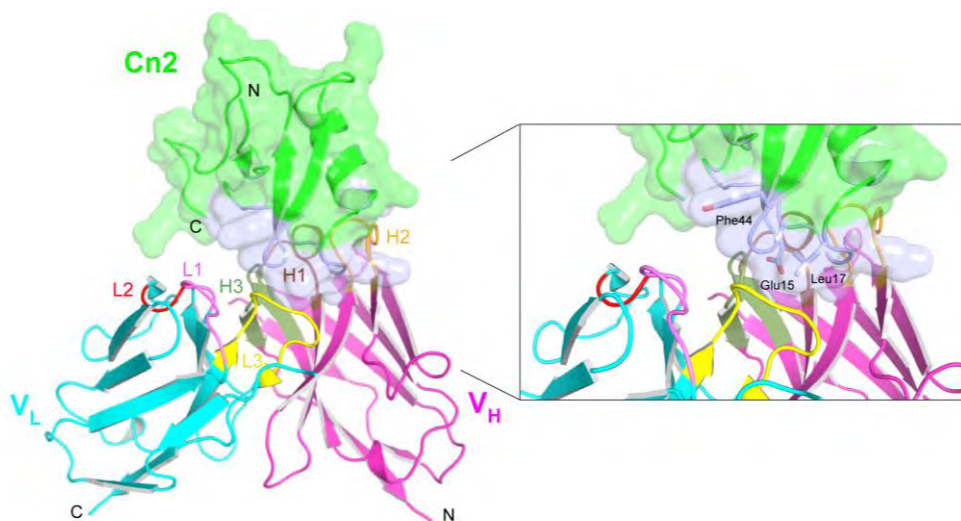


Figura 11. Representación de listón de la estructura del complejo 9004G-Cn2. La molécula de Cn2 se muestra con su superficie molecular transparente en verde y la región implicada en la interface en azul claro. Los dominios V_H y V_L de 9004G se presentan en magenta y cian, respectivamente. Los CDR 1, 2 y 3 de la V_H se muestran en café, naranja y verde, respectivamente y los CDR 1, 2 y 3 de la V_L en rosa, rojo y amarillo, respectivamente. La interface del complejo incluye cinco CDR de 9004G (con excepción de L2) que se proyectan hacia una región de Cn2 y que sobresale del núcleo de la molécula. En el recuadro se muestra un acercamiento de la interface, en dónde se muestran algunos residuos de Cn2 que forman parte de la interface del complejo.

Las regiones que no son visibles en la densidad electrónica de la estructura del complejo 9004G-Cn2 se encuentran en regiones accesibles al solvente y no forman parte de la interface. Para validar el modelo final se calculó un mapa de omisión de recocido simulado con los factores de estructura del modelo final. La interface 9004G-Cn2 presenta una densidad electrónica continua y bien definida (Fig. 12).

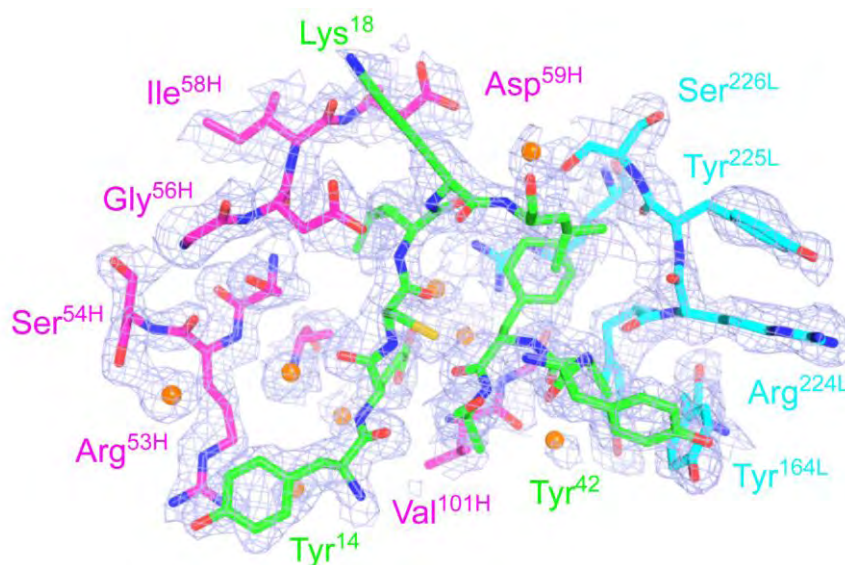


Figura 12. Densidad electrónica de la interface 9004G-Cn2. Representación de un segmento del mapa de omisión de simulado recocido, ponderado a 1σ (malla gris). Las esferas naranjas representan aguas que median puentes de hidrógeno en la interface. Los residuos de Cn2 están coloreados en verde y los dominios V_H y V_L de 9004G en magenta y cian, respectivamente. Los átomos de oxígeno, nitrógeno y azufre están coloreados en rojo, azul y amarillo, respectivamente.

El núcleo de la estructura cristalina de Cn2 en el complejo es muy similar a la estructura determinada en solución por medio de NMR (código de PDB 1CN2; [38]). El valor de RMSD entre la estructura cristalina y los modelos determinados por RMN es de 1.4 \AA (para 65 átomos Ca). En contraste a este núcleo estable, una de las asas de la superficie que interactúa con 9004G experimenta un arreglo significativo (Fig. 13). El asa comprende el segmento entre Lys^{18} y Asp^{21} . Los quince modelos de RMN reportados son más comparables entre ellos en esta región, que con la estructura cristalina de Cn2. El valor de RMSD entre las estructuras determinadas por RMN es de 1.4 \AA , mientras que entre la estructura cristalina de Cn2 y las estructuras de RMN es de 3.1 \AA .

Estos promedios desestiman la magnitud del cambio de conformación. El Ca de Lys^{18} se mueve 3.4 \AA hacia afuera del sitio de unión para evitar un impedimento estérico con Asp^{59H} del CDRH2 de 9004G y arrastra al resto del segmento con él. La cadena lateral del Asp^{21} se reorienta completamente, desplazando su $C\gamma$ por $\sim 10 \text{ \AA}$ debido a la repulsión electrostática con la cadena lateral del Asp^{57H} . En resumen, las alteraciones en el segmento Lys^{18} - Asp^{21} de Cn2 se deben a la presencia del anticuerpo en el complejo (Fig. 13).

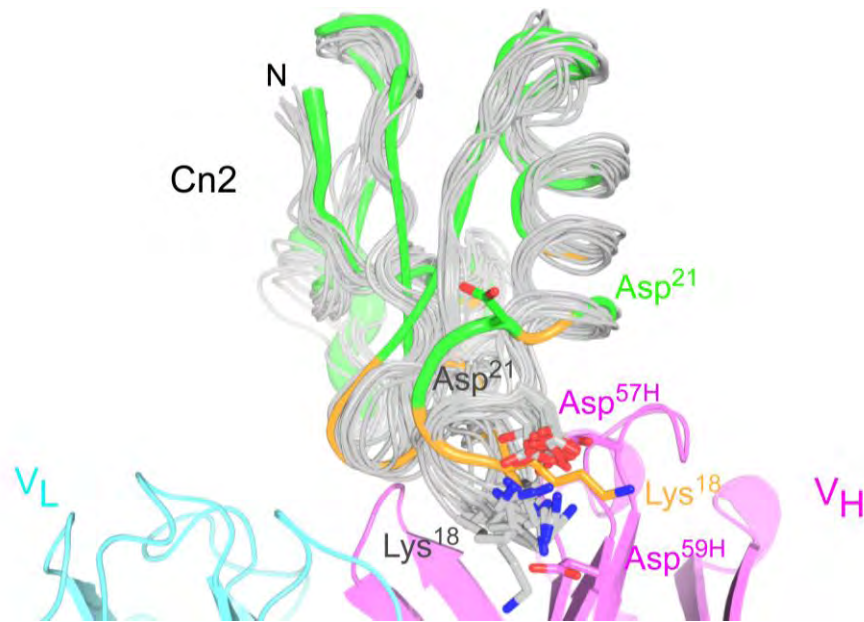


Figura 13. Las estructuras de Cn2 en solución y unida a 9004G difieren en un segmento que forma parte de la interface del complejo Cn2-9004G. Los modelos de RMN de Cn2 (en gris; código PDB 1CN2) y la Cn2 en complejo (representada en verde y con los dominios V_H y V_L de 9004G en magenta y cian, respectivamente) están superpuestas. En la Cn2 cristalina el ancho del listón representa los valores *B* de los Ca. Este valor es menor en las asas que interactúan con 9004G (segmentos coloreados de naranja), que en los extremos de la toxina. El movimiento del segmento entre los residuos Lys¹⁸ y Asp²¹ (cadenas laterales en naranja y verde, respectivamente) excede la variabilidad posicional en Lys¹⁸ y Asp²¹ (en gris) en los modelos de RMN. El reacomodo se debe a la repulsión electrostática entre Asp²¹ y Asp^{57H} y a impedimentos estéricos entre Lys¹⁸ y Asp^{59H}.

5.8 Complementariedad de la interface del complejo 9004G-Cn2

Las características de las interfaces proteína-proteína que son determinantes en el comportamiento de las proteínas se pueden dividir en dos categorías relacionadas: i) propiedades estructurales como el tamaño de la interface, que es el área de la superficie accesible al solvente (SAS) de las dos proteínas que se vuelve inaccesible al solvente debido a contactos proteína-proteína, y la complementariedad geométrica de la interface ii) propiedades químicas como la hidrofobicidad, el potencial electrostático y las interacciones que se establecen en la interface como son los puentes de hidrógeno y los puentes salinos.

La superficie de la interface del complejo 9004G-Cn2 es de 1,700 Å². Este valor es similar al de otras interfaces anticuerpo-antígeno [93]. El scFv 9004G contribuye con 829 Å². El 70% de esta superficie está localizada en el dominio V_H, lo cual es consistente con la noción de que la V_H usualmente hace más contribuciones a la unión del antígeno que la V_L [46]. En el centro de la interface, Val^{101H} aporta 111 Å², mientras que Arg^{53H} y Asp^{57H} contribuyen con 101 y 93 Å², respectivamente (Tabla 4) y actúan como “bisagras” moleculares que estabilizan la unión del complejo en la periferia de la interface [94]. La toxina Cn2 aporta 885 Å². Los residuos Glu¹⁵, Leu¹⁷ y Phe⁴⁴ aportan 43% de la superficie cubierta de Cn2. Leu¹⁷ es el residuo que más superficie contribuye a la interface (Tabla 4), actuando como un “ancla” alrededor de la cual se adapta el resto del complejo [94].

Tabla 4. ^aSuperficie accesible al solvente (SAS) y ^bsuperficie aportada a la interface (SI) de los residuos que forman parte de la interface del complejo 9004G-Cn2

Localización 9004G	residuo de 9004G	SAS (Å²)	SI (Å²)	
CDRH1	Asn ^{31H}	66.1	24.8	
	Tyr ^{32H}	68.6	17.4	
	Ala ^{33H}	33.8	31.6	
Andamio H2	His ^{35H}	30.8	18.4	
	Trp ^{47H}	73.0	6.4	
	Gly ^{50H}	5.2	5.2	
CDRH2	Ile ^{51H}	3.5	2.3	
	Ser ^{52H}	30.1	30.1	
	Arg ^{53H}	138.0	100.5	
	Ser ^{54H}	95.4	23.3	
	Gly ^{56H}	67.0	29.3	
	Asp ^{57H}	104.9	94.1	
	Ile ^{58H}	74.9	17.5	
	Asp ^{59H}	76.5	44.8	
Andamio H3	Gly ^{99H}	7.1	4.2	
	Val ^{101H}	158.1	110.7	
	Gly ^{102H}	78.7	29.0	
CDRL1	Arg ^{162L}	138.7	18.9	
CDRL3	Tyr ^{164L}	78.4	47.2	
	Tyr ^{223L}	75.0	37.3	
	Arg ^{224L}	74.7	21.6	
	Tyr ^{225L}	80.2	9.0	
	Ser ^{226L}	103.3	36.3	
	Arg ^{228L}	167.7	69.1	
Localización Cn2	residuo de Cn2	SAS (Å²)	SI (Å²)	
Hebra β ₁	Tyr ⁴	37.7	6.9	
Giro-β	Asp ⁷	40.7	27.2	
	Thr ¹⁰	58.9	20.9	
	Cys ¹²	38.1	18.9	
	Lys ¹³	78.6	28.5	
	Tyr ¹⁴	58.9	32.0	
	Glu ¹⁵	129.3	129.3	
	Cys ¹⁶	2.4	2.4	
	Leu ¹⁷	142.7	142.7	
	Lys ¹⁸	153.4	54.5	
	Leu ¹⁹	103.4	48.5	
	Asn ²²	20.0	8.0	
	α-hélice	Tyr ²⁴	79.5	75.0
		Arg ²⁷	140.4	31.5
		Glu ²⁸	19.5	6.7
Hebra β ₂	Tyr ⁴²	117.9	61.2	
Giro-β	Ala ⁴³	69.2	67.0	
	Phe ⁴⁴	104.7	104.7	
Hebra β ₃	Ala ⁴⁵	9.7	7.4	

^avalores por residuo de acuerdo al servidor PISA [77]

^bresiduos que aportan menos de 2 Å² a la interface del complejo no fueron considerados parte de la misma

El modo de unión de la Cn2 en el scFv 9004G se encuentra asociado con una notable complementariedad geométrica y química. El valor estadístico de la complementariedad geométrica (S_c) es una medida del ajuste geométrico entre dos superficies moleculares. Los valores van de 0 a 1.0, donde un valor de 1.0 describe a una interface con un ajuste geométrico perfecto (60). El valor de S_c para la interface 9004G-Cn2 (Tabla 5) representa una buena complementariedad geométrica, tomando en cuenta que los valores reportados para otras interfaces antígeno-anticuerpo usualmente van de 0.64 a 0.68 [95].

Jones y Thornton [96] calcularon la propensión de diferentes tipos de aminoácidos a estar en las interfaces proteína-proteína, y observaron que en general, los residuos hidrofóbicos son más comunes en las interfaces que en otras partes de la superficie de complejos heterogéneos. La interface 9004G-Cn2 tiene un gran componente no-polar e incluso, es un poco más hidrofóbica que el promedio de las interfaces anticuerpo-proteína (Tabla 5).

Tabla 5. Características de la interface 9004G-Cn2 y su comparación con interfaces similares

	Complejo 9004G-Cn2	[#] Complejos Anticuerpo-Proteína	[#] Complejos heterogéneos
Superficie de la interface (Å ²)	1,700	1,680 ± 260	1,940 ± 760
S_c	0.78	0.64–0.68	0.69
Área no polar (% interface)	57	52 ± 4	56 ± 6
Área polar neutra (% interface)	29	33 ± 3	29 ± 6
Área cargada (% interface)	14	15 ± 4	15 ± 6
Puentes de hidrógeno	8	9 ± 5	10
Moléculas de agua en la interface	15	-	18 ± 11

[#]Los valores de referencia se obtuvieron de [93], excepto los de S_c , que fueron reportados en [95].

En la Figura 14 (a y b) se muestra la superficie molecular de los residuos que forman parte de la interface de 9004G y Cn2, coloreada de acuerdo a sus valores de SAS (de azul a verde). En el centro de la interface se observan los valores más pequeños de SAS, como es de esperarse para un complejo proteína-proteína.

El potencial electrostático en la superficie de la interface 9004G-Cn2 es notablemente complementario. La superficie del sitio de unión al antígeno de 9004G está positivamente cargado (Fig. 14c) y se complementa con el epítipo de Cn2, negativamente cargado (Fig. 14d). La complementariedad del potencial electrostático de la interface entre 9004G y Cn2 es alta y consistente con la K_D de 0.21 nM entre estas dos proteínas [9].

En la figura 14e y f se muestra el potencial de hidrofobicidad molecular (MHP) de la interface 9004G-Cn2. En él, se observa que los CDRL1 y CDRL3 presentan un carácter hidrofóbico y están idealmente posicionados para encontrarse con la vuelta- β que conecta a las hebras β_2 y β_3 (Tyr⁴²–Ala⁴⁵), que corresponde a la superficie hidrofóbica conservada de la toxina. Por su parte, el residuo polar Glu¹⁵ que sobresale del núcleo de la toxina (Fig. 14d, parche en azul) está completamente protegido del solvente por una zona hidrofóbica del anticuerpo (Fig. 14e; en verde).

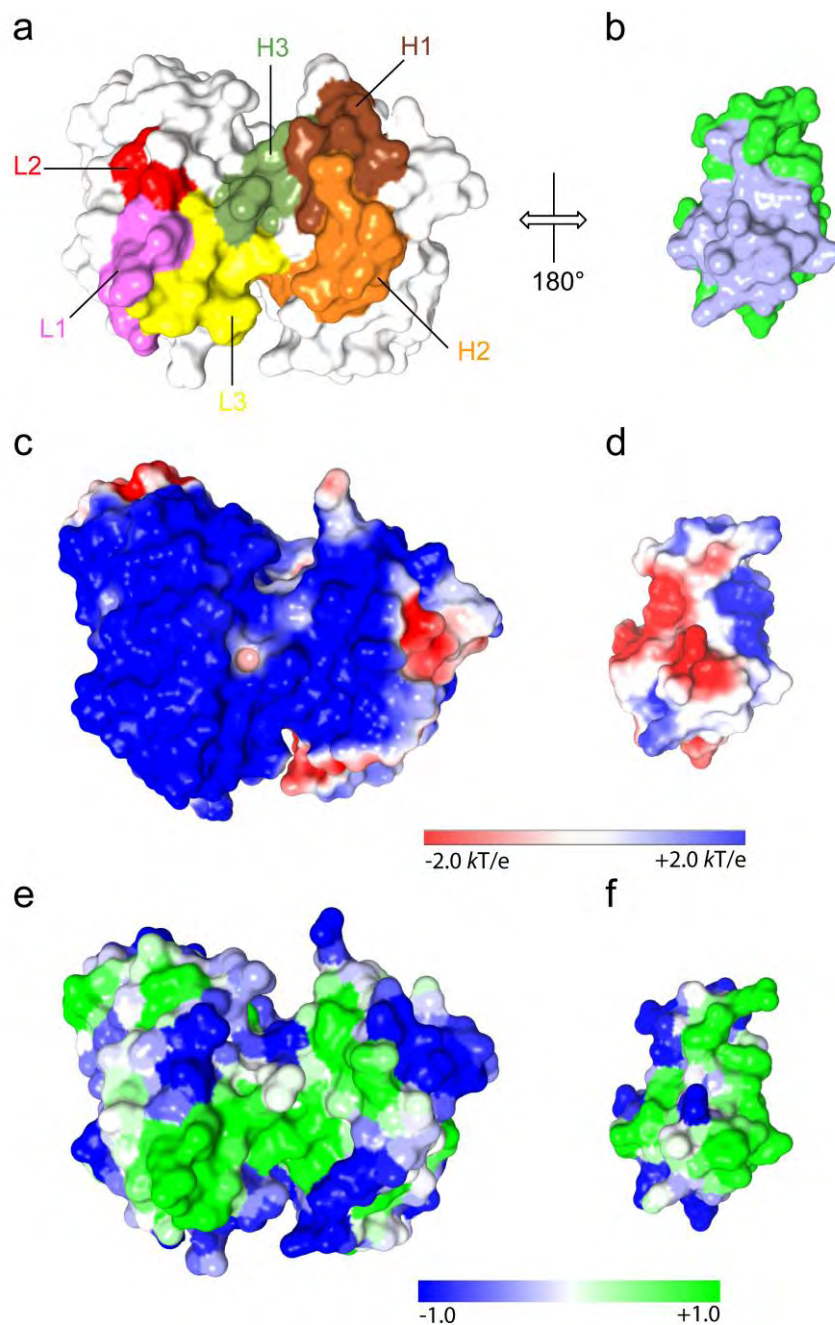


Figura 14. Complementariedad de la interface 9004G-Cn2. (a) Superficie molecular de 9004G (en blanco) vista desde la cara con que interactúa con Cn2. Los CDR 1-3 de V_H se muestran en café, naranja y verde, respectivamente y los CDR 1-3 de V_L en rosa, rojo y amarillo, respectivamente. (b) Superficie molecular de Cn2 (en verde) vista desde el sitio con que interactúa con 9004G, con la región implicada en la interface en azul claro. (c y d) Misma vista que en (a y b), con el potencial electrostático mapeado en la superficie molecular. La superficie sobresaliente y electronegativa de Cn2 (roja) interactúa con la superficie cóncava y electropositiva (azul) del sitio de unión de 9004G. (e y f) Misma vista que en (a y b), con el potencial de hidrofobicidad molecular (MHP) de -1 a +1 (de hidrofílico a hidrofóbico) mapeado en la superficie molecular de 9004G y Cn2. Ciertas regiones de la interface se complementan con valores altos de MHP (en color verde).

5.9 Interacciones en la interface del complejo 9004G-Cn2

La toxina Cn2 está unida al anticuerpo por su región amino terminal e incluye el largo segmento $\beta 1-\alpha$ (Tyr⁴, Asp⁷ y Cys¹²-Leu¹⁹) y el giro- β (Tyr⁴²-Ala⁴⁵), que se insertan en el sitio de unión del anticuerpo (Fig. 11). El asa Cys¹²-Leu¹⁹ hace numerosas interacciones polares y no polares con los CDRH2 y CDRL3 de 9004G (Tablas 6 y 7). Dos residuos sobresalen del núcleo de la toxina y están atrapados profundamente en la hendidura en el sitio de unión del anticuerpo. La Leu¹⁷ se inserta dentro de la hendidura formada por Ile^{51H} y Ser^{52H}, Asp^{57H} y Asp^{59H} (Fig. 15a); His^{35H}, Trp^{47H} y Gly^{50H} forman la base del sitio de unión al antígeno. La cadena lateral del Glu¹⁵ por su parte, forma un puente salino con el anillo imidazol de His^{35H}, en la base del sitio de unión del anticuerpo (Fig. 15b). Este residuo también interactúa con la Val^{101H}, que sobresale de la hendidura en el centro del sitio de unión del anticuerpo y está idealmente posicionada para mirar hacia el Glu¹⁵ (Fig. 15a).

Tabla 6. * Interacciones polares en la interface del complejo 9004G-Cn2

Localización 9004G	9004G (átomo)	Cn2 (átomo)	Distancia (Å)
Puentes de hidrógeno			
CDRH2	Arg ^{53H} (NH2)	Tyr ¹⁴ (OH)	3.4
	Arg ^{53H} (O)	Tyr ²⁴ (OH)	3.4
	Gly ^{56H} (O)	Arg ²⁷ (NH2)	3.0
	Asp ^{57H} (OD2)	Lys ¹⁸ (N)	3.0
CDRH3	Asp ^{57H} (OD2)	Asn ²² (ND2)	2.9
	Val ^{101H} (N)	Glu ¹⁵ (OE2)	2.9
CDRL1	Arg ^{162L} (NH1)	Tyr ⁴² (OH)	3.0
	Tyr ^{164L} (OH)	Tyr ⁴² (OH)	2.6
Puentes salinos			
Andamio H2	His ^{35H} (NH1)	Glu ¹⁵ (OE1)	2.7
CDRH2	Arg ^{53H} (NH2)	Asp ⁷ (OD1)	3.2
	Arg ^{53H} (NH1)	Asp ⁷ (OD1)	2.9

*basado en distancias donador-aceptor ≤ 3.5 Å

El segmento Tyr⁴²-Ala⁴⁵ es una superficie hidrofóbica conservada de la toxina y está intercalada entre la Val^{101H}, varios residuos del CDRL1 (Arg^{162L} y Tyr^{164L}) y la larga asa del CDRL3 (Tyr^{223L}, Arg^{224L}, Tyr^{225L} y Ser^{226L}). En esta región se producen interacciones polares y múltiples contactos de van der Waals adicionales que refuerzan las interacciones de la primera asa. Por ejemplo, la cadena lateral de Tyr⁴² se acomoda entre Arg^{162L} y Tyr^{164L}, mientras que Phe⁴⁴ forma una interacción tipo catión- π con Arg^{228L} (Fig. 15a). Varias interacciones carga-carga y de hidrógeno se encuentran en la periferia del sitio de unión del complejo (Fig. 15b). Los detalles de las interacciones de Cn2 con los CDR de 9004G se resumen en las Tablas 6 y 7.

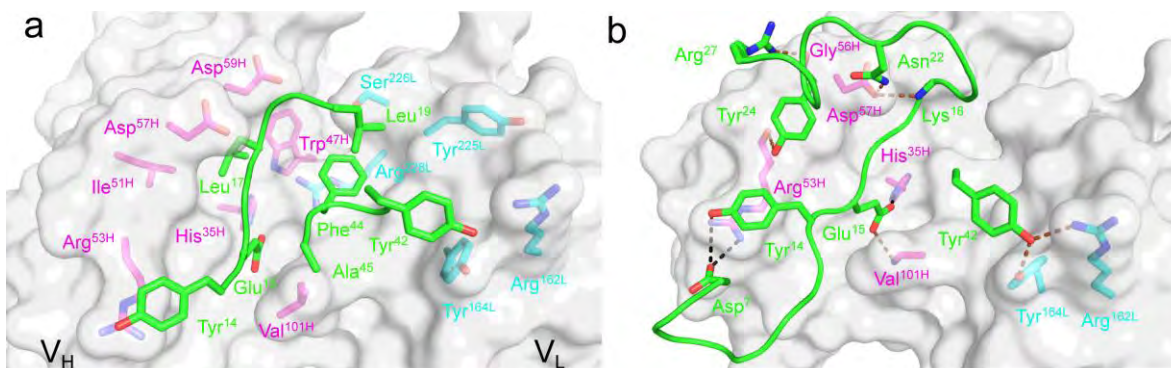


Figura 15. La interface del complejo 9004G-Cn2, vista desde la perspectiva de Cn2 (en verde). La superficie molecular de 9004G se muestra en gris, con algunos residuos de los dominios V_H y V_L en magenta y cian, respectivamente. (a) Los segmentos Cys¹²-Leu¹⁹ y Tyr⁴²-Ala⁴⁵ de Cn2 median la mayoría de los contactos antigénicos. La hendidura formada por los dominios V_H y V_L atrapa a Glu¹⁵ y Leu¹⁷ de Cn2. Se observan varias interacciones hidrofóbicas, aromática-aromática (Tyr^{164L}-Tyr⁴²) y catión- π (Arg^{53H}-Tyr¹⁴ y Arg^{228L}-Phe⁴⁴) en la interface. (b) Interacciones carga-carga y puentes de hidrógeno en la interface. Las interacciones carga-carga y los puentes de hidrógeno se representan mediante líneas punteadas negras y cafés, respectivamente. Los detalles de las interacciones se muestran en las Tablas 5 y 6).

Tabla 7. ^aInteracciones de van der Waals entre residuos de la interface 9004G-Cn2

residuo de Cn2 ^(b)	residuo de 9004G ^(b)
Tyr ¹⁴ (2)	Arg ^{53H} (2)
Glu ¹⁵ (5)	Ala ^{33H} (3), Gly ^{99H} (1), Val ^{101H} (1)
Leu ¹⁷ (8)	His ^{35H} (1), Trp ^{47H} (1), Gly ^{50H} (3), Ile ^{51H} (1), Asp ^{57H} (1), Asp ^{59H} (1)
Lys ¹⁸ (7)	Asp ^{57H} (4), Ile ^{58H} (2), Asp ^{59H} (1)
Leu ¹⁹ (2)	Tyr ^{225L} (2)
Tyr ²⁴ (5)	Ser ^{52H} (1), Gly ^{56H} (3), Asp ^{57H} (1)
Tyr ⁴² (4)	Tyr ^{164L} (4)
Phe ⁴⁴ (11)	Tyr ^{223L} (4), Arg ^{228L} (7)
Ala ⁴⁵ (1)	Val ^{101H} (1)

^abasadas en distancias interatómicas ≤ 4.0 Å

^blos números entre paréntesis se refieren a las interacciones de van der Waals que forma el residuo

5.10 Puentes de hidrógeno mediados por moléculas de agua en la interface del complejo 9004G-Cn2

En los dos complejos de la unidad asimétrica de la estructura a 1.9 Å se encontraron 15 moléculas de agua que median contactos entre 9004G (10 con residuos del dominio V_H y 5 con residuos del dominio V_L) y Cn2 (Fig. 16). Estas moléculas de agua llenan espacios vacíos entre las dos proteínas y contribuyen a optimizar la complementariedad de la interface 9004G-Cn2.

El valor del factor *B* promedio para las 15 moléculas de agua de la interface 9004G-Cn2 es de ~ 24 Å². Estas moléculas de agua se pueden clasificar en dos grupos de acuerdo a su posición en la interface y a sus valores *B* (Tabla 8). En la figura 16 se puede observar que

las aguas que están ocluidas en la cavidad del centro de la interface (coloreadas en azul oscuro) tienen un factor B más bajo que las aguas que se encuentran en la periferia del complejo. Estas moléculas de agua probablemente son las que más contribuyen a la estabilización del complejo, a través del aumento de los puentes de hidrógeno que mantienen a las dos proteínas juntas (Fig. 16).

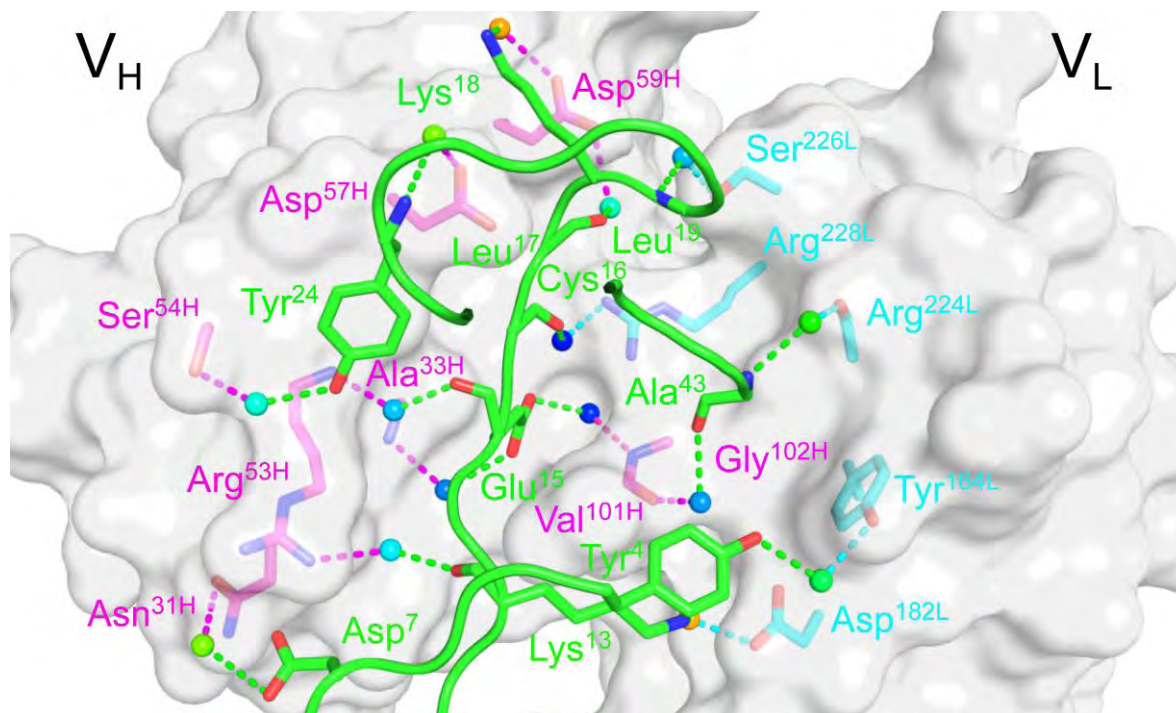


Figura 16. Puentes de hidrógeno mediados por moléculas de agua en la interface del complejo 9004G-Cn2, visto desde la perspectiva de Cn2 (en verde). Se presenta la superficie molecular de 9004G en gris, con los residuos de los dominios V_H y V_L en magenta y cian, respectivamente. Las moléculas de agua se representan como esferas coloreadas de acuerdo a su factor B (escala de color RGB, azul para los valores más bajos, ver Tabla 8). Los guiones de color verde, magenta y cian representan puentes de hidrógeno entre moléculas de agua y átomos de Cn2, V_H y V_L , respectivamente. Las moléculas de agua más ordenadas (con los valores de factor B más bajos) están ocluidas en una cavidad en el centro de la interface del complejo. El Glu¹⁵ está anclado al sitio de unión de 9004G por tres puentes de hidrógeno mediados por tres moléculas de agua.

En resumen, los residuos de Cn2 y del scFv 9004G que forman la interface 9004G-Cn2 forman seis puentes de hidrógeno, cuatro puentes salinos, quince puentes de hidrógeno mediados por moléculas de agua y numerosas interacciones de van der Waals que dictan el patrón de unión del complejo 9004-Cn2. Los detalles de estas interacciones se muestran en las tablas 6-8.

Tabla 8. ^aPuentes de hidrógeno mediados por agua en la interface 9004G-Cn2

Localización 9004G	9004G (átomo)	Cn2 (átomo)	Distancia (Å/Å)	Factor B (Å ²)
CDRH1	Asn ^{31H} (OD1)	Asp ⁷ (OD2)	3.3/2.8	33.1
	Ala ^{33H} (N)	Glu ¹⁵ (OE2)	3.0/2.9	16.8
CDRH2	Arg ^{53H} (NH1)	Lys ¹³ (O)	3.0/2.6	20.1
	Arg ^{53H} (N)	Glu ¹⁵ (O)	2.9/2.6	18.5
	Ser ^{54H} (O)	Tyr ²⁴ (OH)	2.8/2.8	32.9
	Asp ^{57H} (OD1)	Tyr ²⁴ (N)	3.3/3.3	22.6
Andamio H3	Asp ^{59H} (OD1)	Lys ¹⁸ (NZ)	2.9/3.3	42.7
	Asp ^{59H} (OD2)	Leu ¹⁷ (O)	3.1/2.6	23.1
CDRH3	Val ^{101H} (O)	Ala ⁴³ (O)	2.7/2.7	17.4
	Gly ^{102H} (N)	Glu ¹⁵ (OE1)	2.9/2.6	14.5
CDRL1	Tyr ^{164L} (OH)	Tyr ⁴ (OH)	2.8/2.7	26.1
CDRL2	Asp ^{182L} (OD1)	Ala ⁴³ (N)	2.7/2.8	42.3
CDRL3	Arg ^{224L} (O)	Lys ¹³ (NZ)	2.9/2.9	29.9
	Ser ^{226L} (OG)	Leu ¹⁹ (N)	3.0/2.9	18.3
	Arg ^{228L} (NH2)	Cys ¹⁶ (O)	2.8/2.9	13.5

^abasado en distancias donador-aceptor ≤ 3.5 Å

6.0 DISCUSIÓN

6.1. La interface del complejo 9004G-Cn2

El modo de unión de la toxina Cn2 al scFv 9004G puede asociarse con el alto nivel de complementariedad geométrica y química que muestra su interface, lo cual, es característico de un complejo canónico antígeno-anticuerpo [97].

En la estructura del complejo 9004G-Cn2 se identificaron varios residuos que probablemente dominan la formación y estabilización del complejo debido a que participan importantemente en la interface. El asa que va de la hebra β_1 a la α -hélice (Tyr¹⁴-Leu¹⁹) y el giro- β (Tyr⁴²-Ala⁴⁵) que conecta las hebras β_2 y β_3 de Cn2 interactúan con cinco de los CDR (Fig. 11). La alta complementariedad geométrica a lo largo de la superficie de la interacción parece ser importante. Los residuos Glu¹⁵ y Leu¹⁷ actúan como un ancla y se insertan dentro de una pequeña cavidad formada por el CDRH2 de 9004G y probablemente contribuyan con la mayoría de la energía libre de unión de la interacción. Recordemos que sólo un pequeño grupo de átomos en las interfaces proteína-proteína, designados como “hot spots”, hacen una contribución significativa a la energía libre de unión de la interacción.

La estabilidad del complejo 9004G-Cn2 parece deberse principalmente a las interacciones de van der Waals, puentes de hidrógeno y, en menor medida a los puentes salinos, tal como ocurre en otros complejos de anticuerpo-proteína [93]. Los puentes salinos en el sitio de unión probablemente participan en la asociación inicial proteína-proteína a través de interacciones electrostáticas de largo alcance, mientras que los puentes de hidrógeno deben ser la fuerza dominante para el acoplamiento del complejo final [98].

6.2 Bases estructurales de la neutralización de la toxina Cn2

Los detalles acerca de la interacción de las β -toxinas clásicas con el sitio 4 de los canales Na_v se han dilucidado recientemente mediante estudios estructurales y de mutágenesis, junto con ensayos de unión de las toxinas y los canales, tomando como modelo principal a la β -toxina Css4 [40, 99]. Los residuos que son cruciales para la unión de Css4 a los canales Na_v están espacialmente conservados en varias β -toxinas clásicas (Fig. 17a) y provienen de diferentes regiones de la estructura primaria, pero se encuentran cercanos en una superficie con forma de cuña en la estructura terciaria [100]. Una de estas regiones incluye varios residuos que se encuentran asociados con la α -hélice (Phe¹⁷, Tyr²⁴, Arg²⁷, Glu²⁸ y Gln³²). El otro grupo comprende residuos hidrofóbicos como Phe¹⁴, Leu¹⁹, Asn²², Tyr⁴⁰, Tyr⁴² y Phe⁴⁴, asociados a las hebras β de la toxina. En la zona del C-terminal el único residuo importante para la interacción de la toxina con el canal es el Trp⁵⁸.

El residuo Glu¹⁵ se encuentra conservado en las β -toxinas de mamíferos del género *Centruroides* y parece desempeñar un papel importante en la actividad de la intercepción del sensor de voltaje [28]. El cambio del residuo Glu por Arg en la posición 15 de las toxinas recombinantes rCss2 y rCss4 abate el efecto que tienen estas toxinas en el mecanismo de apertura y cierre de los canales rNa_v1.2 y rNa_v1.6 de rata y en canales hNa_v1.5 de humano; sin embargo, el cambio no afecta la afinidad de las toxinas por los canales [100, 101].

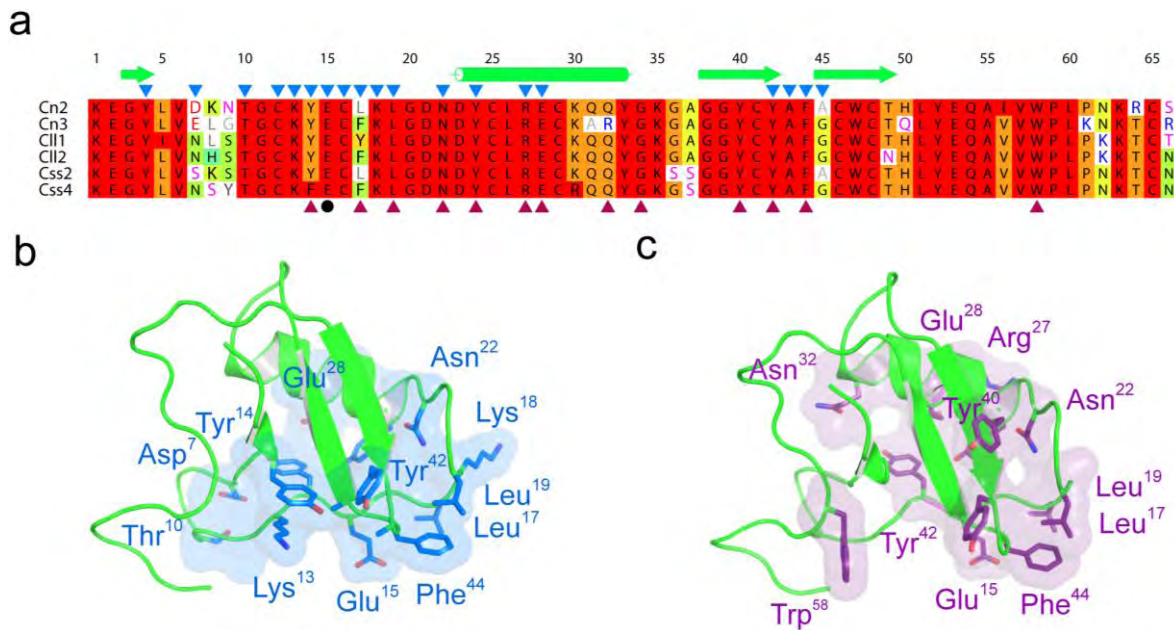


Figura 17. El epítipo de Cn2 que reconoce 9004G se traslapa con el sitio de unión de la toxina a los Na_v de mamífero. (a) Alineamiento de secuencia de β -toxinas “clásicas” de alacranes del género *Centruroides*. Los aminoácidos están coloreados en escala de cian a rojo de acuerdo a la conservación relativa de secuencia (rojo para los más conservados). En la parte superior del alineamiento se señalan los elementos de estructura secundaria de Cn2. Los residuos que forman parte de la interface 9004G-Cn2 se marcan con triángulos azules por arriba de la secuencia de Cn2. En la parte inferior del alineamiento se señalan los residuos importantes para la unión y la actividad de Ccss4 en los Na_v de mamífero [40, 100] con triángulos púrpuras y con un círculo negro, respectivamente. Las abreviaturas corresponden a las siguientes especies: Cn, *Centruroides noxius*; Ccss, *Centruroides suffusus suffusus*; Cll, *Centruroides limpidus limpidus*. (b) Se presenta en modelo de listón a Cn2 (en verde) con la superficie molecular del epítipo que reconoce 9004G en azul. (c) En Cn2 se muestra la superficie molecular de las posiciones equivalentes de Ccss4 que interactúan con los Na_v [100] en púrpura. Los segmentos Tyr¹⁴–Leu¹⁹ y Tyr⁴²–Ala⁴⁵ forman parte de una región de interacción que comparten el scFv 9004G y los Na_v de mamífero. Esta observación implica que el scFv 9004G neutraliza a Cn2, atrapando a un grupo de residuos de la toxina que forman parte de su superficie funcional.

Las β -toxinas de alacrán interactúan con un segmento corto del IIS1-S2 y una región más amplia del segmento IIS3-S4 de los canales $\text{rNa}_v1.2$ [28-30]. Estas regiones están bien conservadas en los canales $\text{Nav}1.2$ y 1.6 de mamífero [5, 39] (Fig. 18), lo cual es consistente con el efecto similar que ejerce la toxina Ccss4 en esos canales. Por lo tanto, es coherente suponer que las β -toxinas Ccss4 y Cn2 interactúan de manera similar con los canales $\text{Na}_v1.2$ y 1.6 de mamífero. Siguiendo este razonamiento, la comparación de los residuos de Ccss4 que interactúan con el sitio receptor 4 del canal $\text{rNa}_v1.2$ y los residuos de Cn2 que participan en la interface del complejo 9004G-Cn2 proporciona importantes datos sobre las bases moleculares de la neutralización de Cn2 por 9004G.

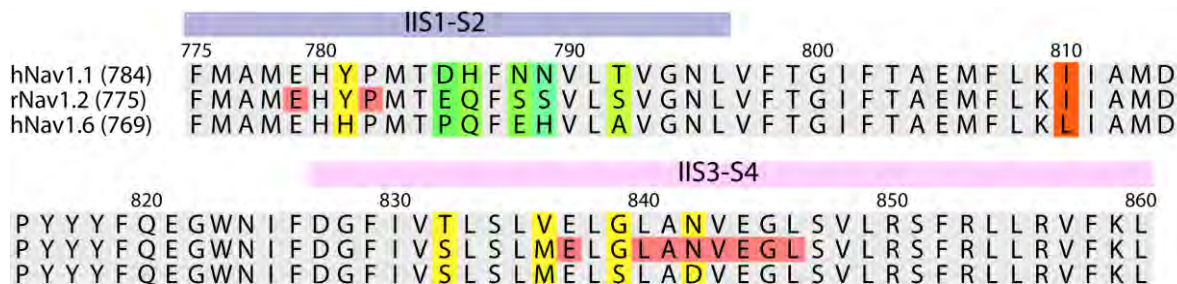


Figura 18. Alineamiento de secuencia de la región que va del segmento IIS1-S2 al S4 del dominio II de los $\text{Na}_v1.x$ de mamífero que son afectados por las β -toxinas Cn2 y Css4 [5], [39]. Los siguientes números de acceso se usaron para las secuencias (de arriba a abajo): P35498, P04775 y Q9UQD0. Arriba de la secuencia del canal $\text{hNa}_v1.1$ están señalados los segmentos IIS1-S2 (franja azul) y IIS3-S4 (franja rosa). Los cambios de aminoácidos están resaltados en escala de cian a rojo de acuerdo a la conservación relativa de secuencia (rojo para los más conservados). Los residuos marcados en rojo en la secuencia $\text{hNa}_v1.2$ señalan las posiciones mutadas por Cestèle y colaboradores [28, 29] y que son importantes para la unión de Css4 en los $\text{Na}_v1.2$.

El epítipo que reconoce 9004G está localizado en la larga asa que antecede a la hélice- α y al giro- β que conecta a las hebras β_2 y β_3 de Cn2 (Fig. 17b). Con excepción de Asn^{32} y Trp^{58} , los residuos que participan en la interacción de la toxina con el Na_v se encuentran formando parte de la interface del complejo 9004G-Cn2. En la Figura 17c se muestran las posiciones equivalentes de Css4 que interactúan con los canales Na_v [100] mapeadas en la estructura de Cn2. Claramente, el epítipo que reconoce 9004G traslapa con la superficie de la toxina involucrada en la interacción con el canal Na_v , aunque esta última se extiende a una región mayor. Este notable traslape explica como la captura de esta zona da lugar a la potente neutralización de la toxina Cn2 por 9004G. En otras palabras, la interacción de 9004G con Cn2 secuestra una gran parte de la superficie activa de Cn2 y de esta manera podría evitar la unión de la toxina con el canal.

6.3 Bases estructurales de la reactividad cruzada del scFv 9004G

La habilidad de identificar componentes específicos del antígeno independientemente del resto de la molécula, permite a un mismo anticuerpo acomodar en su sitio de unión a antígenos que comparten epítopos similares o equivalentes, fenómeno que se conoce como reactividad cruzada. Debido a que el anticuerpo 9004G puede neutralizar a Cn2 y Css2, las diferencias de secuencia entre ambas toxinas se mapearon dentro de la estructura del complejo 9004G-Cn2 (Fig. 19). Cinco de las seis diferencias de secuencia entre estas dos toxinas están asociadas con una región no interactiva de la toxina y no parecen ser importantes para la interacción con el scFv 9004G. El Asp^7 es el único residuo de la interface 9004G-Cn2 que es diferente en las dos toxinas. La cadena lateral de este residuo forma dos puentes salinos con $\text{Arg}^{53\text{H}}$ en Cn2 (Fig. 19a). En la toxina Css2 esta posición está ocupada por Ser, por lo que la interacción se vería modificada en la interface hipotética (Fig. 19). Sin embargo, la modificación de la interacción no parece ser energéticamente importante para la estabilización del complejo, debido a la pequeña diferencia que existe entre los valores de K_D de 9004G por Cn2 y Css2, 0.21 nM y 0.81 nM, respectivamente [9].

Así se pueden explicar las bases moleculares de la reactividad cruzada del anticuerpo 9004G contra las toxinas Cn2 y Css2.

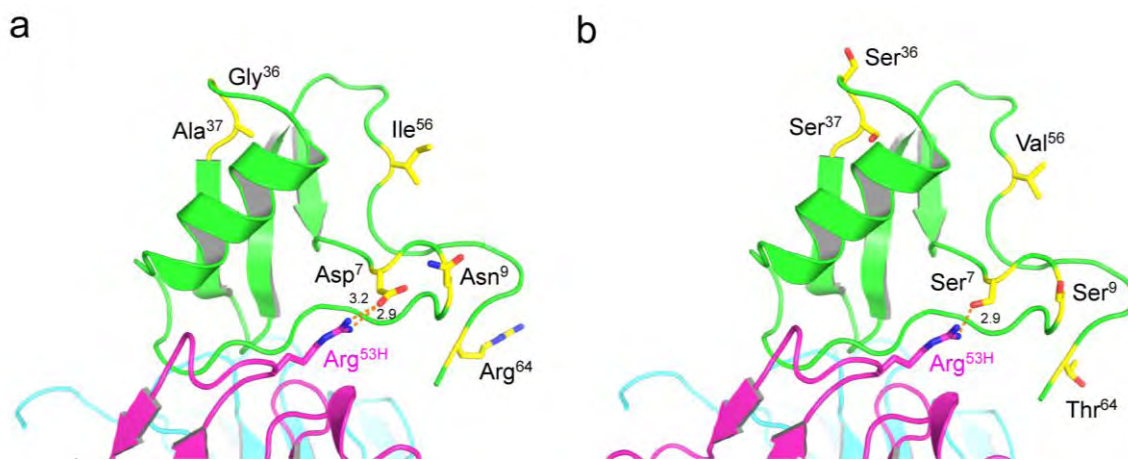


Figura 19. Base estructural de la neutralización de dos toxinas de alacrán de venenos diferentes con un solo scFv. (a) Complejo 9004G-Cn2. Los residuos que difieren entre las toxinas Cn2 (a) y Css2 (modelados en la estructura de Cn2 (b)) en representación de palos en amarillo (ver Fig. 17a). De los seis residuos que son diferentes entre las dos toxinas, solo Asp⁷ de Cn2 contacta a 9004G (formando dos puentes salinos con Arg^{53H} (ver Tabla 5). En la interface hipotética del complejo 9004G-Css2 sólo una de estas interacciones se encontraría a la distancia correcta. Sin embargo, esta diferencia no afecta substancialmente la fuerza de la interacción entre 9004G y Css2.

6.4 Comprensión de la estructura-función en la evolución de los diferentes scFv

Los ejemplos discutidos en esta sección muestran como el proceso de maduración de los scFv de origen humano dio lugar, de manera progresiva, a mejores anticuerpos con un incremento en el reconocimiento y/o estabilidad.

Un cambio clave que se llevó a cabo durante el proceso de maduración del scFv 9004G fue el cambio de Gly por Asp en la posición 59H (Figs. 13 y 20, a y b). Este cambio incrementa el reconocimiento de Css2 en una manera significativa [9]. En la estructura del complejo se puede observar que la presencia del Asp^{59H}, en lugar de Gly, incrementa las interacciones electrostáticas con Lys¹⁸, e incrementa la superficie de interacción con la toxina. A este cambio en el anticuerpo, se le puede atribuir el incremento en la afinidad de la interacción.

El primer estudio estructural del proceso de maduración de la afinidad de anticuerpos contra una proteína que se reportó fue el de anticuerpos monoclonales contra la lisozima. Los autores del trabajo concluyeron que el aumento en la afinidad de los anticuerpos por su antígeno se atribuye a un incremento de la complementariedad geométrica de la interface y al aumento de superficies no polares a expensas de las superficies polares [102].

El cambio Val por Phe en la posición 101H de 9004G (Fig. 20), propuesto a partir del contexto de la secuencia y de las propiedades de 6009F, dio origen al scFv LR [9]. Este anticuerpo es más estable que 6009F y 9004G y presenta una afinidad mayor por las

toxinas C_{ss}2 y C_n2. Un factor que puede contribuir a estas propiedades es que la cadena lateral de Phe^{101H} incrementa el área de contacto con las toxinas y probablemente mejora la geometría de la interface, a través de interacciones de apilamiento con Lys¹³ (Fig. 20, c y d).

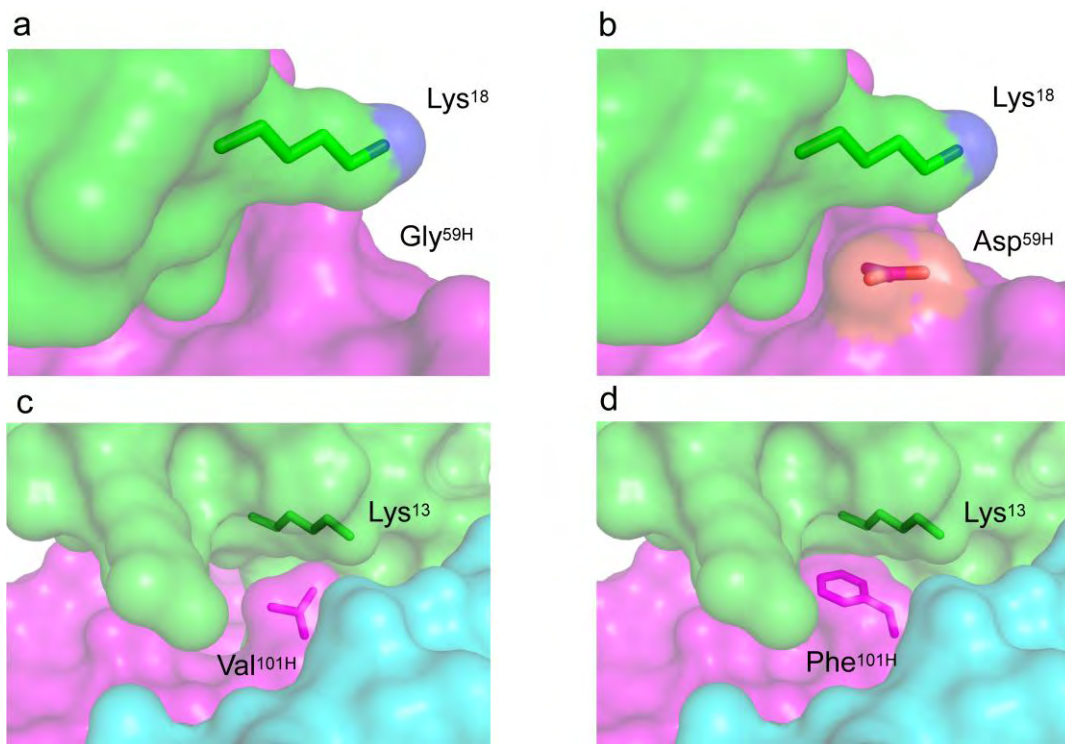


Figura 20. Ambiente estructural de mutaciones clave que aumentan el reconocimiento por la toxina en variantes de la familia de scFv de origen humano. (a, b). El cambio de Gly por Asp en la posición 59H incrementa el reconocimiento por C_{ss}2 en forma significativa (22). Este cambio (presente en 9004G) aumenta la superficie de contacto con la toxina y mejora la interacción electrostática con Lys¹⁸. (c, d). El cambio de Val por Phe en la posición 101H dio lugar al scFv LR [9], un anticuerpo más estable que 9004G. El cambio daría lugar a la formación de una interface más extensa, a través del apilamiento del residuo en la posición 101H con el residuo Lys¹³ de C_n2.

7.0 CONCLUSIONES

El scFv 9004G se aisló y purificó mediante una metodología diferente a la reportada. El nuevo protocolo permitió incrementar el rendimiento del anticuerpo (mg L^{-1}) hasta por cinco veces.

El scFv 9004G y la toxina Cn2 forman un complejo estable que pudo cristalizarse con los métodos de difusión de vapor, modalidad gota sentada y “*microbatch*”. La estructura del complejo se determinó en dos redes cristalinas diferentes. Los cristales en las redes ortorrómbica y cúbica difractaron a 2.55 y 1.9 Å de resolución, respectivamente.

El segmento que va de Lys¹⁸ a Asp²¹ en la toxina Cn2 se encuentra en una posición diferente en la forma cristalina, con respecto a los modelos determinados por RMN. El desplazamiento de este segmento en la estructura cristalina de Cn2 se debe a la presencia del anticuerpo en el complejo 9004G-Cn2.

La estructura del complejo 9004G-Cn2 muestra claramente la posición y orientación de la toxina unida al anticuerpo, así como las cadenas laterales implicadas en la interface del complejo. La estructura también muestra el papel que tienen cinco de los CDR del scFv 9004G en la formación de una hendidura en el centro del sitio de unión del anticuerpo. Este sitio atrapa una región aniónica de Cn2.

La interface entre ambas proteínas exhibe una alta complementariedad geométrica, química y electrostática, acorde al proceso de evolución dirigida al que se sometió el anticuerpo y a la afinidad de la interacción entre 9004G y Cn2.

El epítipo estructural de Cn2 consiste de un segmento discontinuo de 19 residuos que se traslapan con residuos esenciales para la unión y la función de las β -toxinas a su sitio receptor en los canales de sodio. La captura de estos residuos por el scFv 9004G explica la eficiente actividad neutralizante del anticuerpo en contra de la toxina Cn2.

La comparación de secuencia entre las toxinas Cn2 y Css2 indica que los principales residuos involucrados en el reconocimiento de Cn2 están presentes en Css2. El análisis de la interface 9004G-Cn2 sugiere que la interacción del anticuerpo 9004G con Css2 involucra principalmente a residuos que están presentes en ambas toxinas. Lo anterior explica las bases moleculares de la reactividad cruzada del anticuerpo 9004G contra las toxinas Cn2 y Css2.

El incremento en la afinidad de residuos clave durante el proceso de maduración de la familia de anticuerpos a la que pertenece 9004G puede inferirse a partir de la estructura cristalográfica del complejo 9004G-Cn2.

8.0 PERSPECTIVAS

La estructura tridimensional del complejo 9004G-Cn2 proporciona un templado útil para el diseño de nuevas variantes de anticuerpos tipo scFv con mejores propiedades de reconocimiento en contra de las principales toxinas del veneno de los alacranes del género *Centruroides*. Un ejemplo de la aplicación de este templado es que los determinantes de la unión del anticuerpo 9004G a la toxina Cn2 pueden usarse para modificar los anticuerpos existentes. La estructura del complejo 9004G-Cn2 también puede usarse en estudios de “*docking*” con otras toxinas de alacranes del género *Centruroides* que también son reconocidas por la misma familia de anticuerpos a la que pertenece el scFv 9004G.

Esta tesis sienta las bases para continuar la determinación de la estructura cristalográfica de otros complejos anticuerpo-toxina de alacrán. Se sabe que hay más de una región antigénica en Cn2, y que otros anticuerpos como el BCF2 y el suero polivalente “Alacramyn” reconocen epítomos diferentes al que reconoce el anticuerpo 9004G. La caracterización de los demás epítomos estructurales de Cn2 es importante no sólo para comprender la naturaleza antigénica de las β -toxinas de alacrán del género *Centruroides*, sino también para desarrollar anticuerpos más eficaces en contra el veneno de estos alacranes.

Recientemente, se sintetizaron dos péptidos que pretenden emular la superficie antigénica de Cn2, tomando como base el epítomo estructural de la toxina en la estructura del complejo 9004G-Cn2. El objetivo del trabajo será utilizar estos péptidos sintéticos como una vacuna que estimule la producción de anticuerpos en contra del epítomo discontinuo de la toxina Cn2 y que estos anticuerpos tengan la capacidad de neutralizar el veneno del alacrán *Centruroides noxius*.

9.0 LITERATURA CITADA.

1. Chippaux, J.P. and M. Goyffon, *Epidemiology of scorpionism: a global appraisal*. Acta Trop, 2008. **107**(2): p. 71-9.
2. Dehesa-Davila, M. and L.D. Possani, *Scorpionism and serotherapy in Mexico*. Toxicon, 1994. **32**(9): p. 1015-8.
3. Celis, A., et al., *Trends in mortality from scorpion stings in Mexico, 1979-2003*. Rev Panam Salud Publica, 2007. **21**(6): p. 373-80.
4. Martin-Eauclaire, M.F. and F. Couraud, *Scorpion neurotoxins: effects and mechanisms*. In: Chang, L.W., Dyer, R.S. (Eds.) Handk. Neurotoxicology Marcel-Dekker, New York,, 1992: p. 683-716.
5. Schiavon, E., et al., *Resurgent current and voltage sensor trapping enhanced activation by a beta-scorpion toxin solely in Nav1.6 channel. Significance in mice Purkinje neurons*. J Biol Chem, 2006. **281**(29): p. 20326-37.
6. Possani, L.D., et al., *The amino terminal sequence of several toxins from the venom of the Mexican scorpion Centruroides noxius Hoffmann*. Carlsberg Res Commun, 1981. **46**: p. 207-214.
7. Zamudio, F., et al., *Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion Centruroides noxius Hoffmann*. Eur J Biochem, 1992. **204**(1): p. 281-92.
8. Riano-Umbarila, L., et al., *A strategy for the generation of specific human antibodies by directed evolution and phage display. An example of a single-chain antibody fragment that neutralizes a major component of scorpion venom, in FEBS J2005*. p. 2591-601.
9. Riano-Umbarila, L., et al., *Exploiting cross-reactivity to neutralize two different scorpion venoms with one single chain antibody fragment*. J Biol Chem, 2011. **286**(8): p. 6143-51.
10. Goyffon, M. and C. Landon, *[Scorpion toxins and defensins]*. C R Seances Soc Biol Fil, 1998. **192**(3): p. 445-62.
11. Rochat, H., P. Bernard, and F. Couraud, *Scorpion toxins: chemistry and mode of action*. Adv Cytopharmacol, 1979. **3**: p. 325-34.
12. Kozminsky-Atias, A., et al., *Assembling an arsenal, the scorpion way*. BMC Evol Biol, 2008. **8**: p. 333.
13. Bosmans, F. and J. Tytgat, *Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion alpha-toxins*. Toxicon, 2007. **49**(2): p. 142-58.
14. Carbone, E., et al., *Selective blockage of voltage-dependent K⁺ channels by a novel scorpion toxin*. Nature, 1982. **296**(5852): p. 90-1.
15. Catterall, W.A., *Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1980. **20**: p. 15-43.
16. DeBin, J.A., J.E. Maggio, and G.R. Strichartz, *Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion*. Am J Physiol, 1993. **264**(2 Pt 1): p. C361-9.
17. Valdivia, H.H. and L.D. Possani, *Peptide toxins as probes of ryanodine receptor structure and function*. Trends Cardiovasc Med, 1998. **8**(3): p. 111-8.
18. Bosmans, F., M.F. Martin-Eauclaire, and K.J. Swartz, *Deconstructing voltage sensor function and pharmacology in sodium channels*. Nature, 2008. **456**(7219): p. 202-8.
19. Yu, F.H., et al., *Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2*. J Neurosci, 2003. **23**(20): p. 7577-85.

20. McCormick, K.A., et al., *The extracellular domain of the beta1 subunit is both necessary and sufficient for beta1-like modulation of sodium channel gating*. J Biol Chem, 1999. **274**(46): p. 32638-46.
21. Goldin, A.L., *Resurgence of sodium channel research*. Annu Rev Physiol, 2001. **63**: p. 871-94.
22. Yu, F.H. and W.A. Catterall, *Overview of the voltage-gated sodium channel family*. Genome Biol, 2003. **4**(3): p. 207.
23. Catterall, W.A., *From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels*. Neuron, 2000. **26**(1): p. 13-25.
24. Catterall, W.A., et al., *Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins*. Toxicon, 2007. **49**(2): p. 124-41.
25. Gordon, D., et al., *Functional anatomy of scorpion toxins affecting sodium channels*. J Toxicol Toxin Rev, 1998. **17**: p. 131-159.
26. Possani, L.D., et al., *Scorpion toxins specific for Na⁺-channels*. Eur J Biochem, 1999. **264**(2): p. 287-300.
27. Thomsen, W.J. and W.A. Catterall, *Localization of the receptor site for alpha-scorpion toxins by antibody mapping: implications for sodium channel topology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(24): p. 10161-5.
28. Cestele, S., et al., *Voltage sensor-trapping: enhanced activation of sodium channels by beta-scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II*. Neuron, 1998. **21**(4): p. 919-31.
29. Cestele, S., et al., *Structure and function of the voltage sensor of sodium channels probed by a beta-scorpion toxin*. J Biol Chem, 2006. **281**(30): p. 21332-44.
30. Cestele, S., et al., *Neutralization of gating charges in domain II of the sodium channel alpha subunit enhances voltage-sensor trapping by a beta-scorpion toxin*. J Gen Physiol, 2001. **118**(3): p. 291-302.
31. Martin, M.F., et al., *Purification and chemical and biological characterizations of seven toxins from the Mexican scorpion, Centruroides suffusus suffusus*. J Biol Chem, 1987. **262**(10): p. 4452-9.
32. Barhanin, J., et al., *Tityus serrulatus venom contains two classes of toxins. Tityus gamma toxin is a new tool with a very high affinity for studying the Na⁺ channel*. J Biol Chem, 1982. **257**(21): p. 12553-8.
33. Gordon, D., et al., *An 'Old World' scorpion beta-toxin that recognizes both insect and mammalian sodium channels*. Eur J Biochem, 2003. **270**(12): p. 2663-70.
34. Zlotkin, E., et al., *Functional duality and structural uniqueness of depressant insect-selective neurotoxins*. Biochemistry, 1991. **30**(19): p. 4814-21.
35. Rodriguez de la Vega, R.C. and L.D. Possani, *Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution*. Toxicon, 2005. **46**(8): p. 831-44.
36. Gurevitz, M., et al., *Diversification of neurotoxins by C-tail 'wiggling': a scorpion recipe for survival*. FASEB J, 2001. **15**(7): p. 1201-5.
37. Dent, M.A., Possani L.D., Ramirez G.A., Fletcher P.L. Jr., *Purification and characterization of two mammalian toxins from the venom of the Mexican scorpion Centruroides noxius Hoffmann*. Toxicon, 1980. **18**(3): p. 343-50.
38. Pintar, A., L.D. Possani, and M. Delepierre, *Solution structure of toxin 2 from centruroides noxius Hoffmann, a beta-scorpion neurotoxin acting on sodium channels*. J Mol Biol, 1999. **287**(2): p. 359-67.

39. Estrada, G., et al., *Four disulfide-bridged scorpion beta neurotoxin Cssl: heterologous expression and proper folding in vitro*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1770**(8): p. 1161-8.
40. Cohen, L., et al., *Design of a specific activator for skeletal muscle sodium channels uncovers channel architecture*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(40): p. 29424-30.
41. Brack, C., et al., *A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination*. *Cell*, 1978. **15**(1): p. 1-14.
42. Murre, C., *Epigenetics of antigen-receptor gene assembly*. *Curr Opin Genet Dev*, 2007. **17**(5): p. 415-21.
43. Amzel, L.M. and R.J. Poljak, *Three-dimensional structure of immunoglobulins*. *Annu Rev Biochem*, 1979. **48**: p. 961-97.
44. Al-Lazikani, B., A.M. Lesk, and C. Chothia, *Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins*. *J Mol Biol*, 1997. **273**(4): p. 927-48.
45. Chitarra, V., et al., *Three-dimensional structure of a heteroclitic antigen-antibody cross-reaction complex*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(16): p. 7711-5.
46. Wilson, I.A. and R.L. Stanfield, *Antibody-antigen interactions: new structures and new conformational changes*. *Curr Opin Struct Biol*, 1994. **4**(6): p. 857-67.
47. Sundberg, E.J., *Structural Basis of Antibody–Antigen Interactions*. *Methods in Molecular Biology, Epitope Mapping Protocols*, 2009. **524**: p. 23-36.
48. Harris, L.J., et al., *Refined structure of an intact IgG2a monoclonal antibody*. *Biochemistry*, 1997. **36**(7): p. 1581-97.
49. Stanfield, R.L., et al., *Crystal structures of an antibody to a peptide and its complex with peptide antigen at 2.8 Å*. *Science*, 1990. **248**(4956): p. 712-9.
50. Goldblatt, D., *Affinity of Antigen–Antibody Interactions*. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*, 2001: p. 1-5.
51. Licea, A.F., B. Becerril, and L.D. Possani, *Fab fragments of the monoclonal antibody BCF2 are capable of neutralizing the whole soluble venom from the scorpion *Centruroides noxius Hoffmann**. *Toxicon*, 1996. **34**(8): p. 843-7.
52. Carter, P.J., *Potent antibody therapeutics by design*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(5): p. 343-57.
53. Espino-Solis, G.P., et al., *Antidotes against venomous animals: state of the art and perspectives*. *J Proteomics*, 2009. **72**(2): p. 183-99.
54. Aubrey, N., et al., *Engineering of a recombinant Fab from a neutralizing IgG directed against scorpion neurotoxin Aahl, and functional evaluation versus other antibody fragments*. *Toxicon*, 2004. **43**(3): p. 233-41.
55. Hmila, I., et al., *A bispecific nanobody to provide full protection against lethal scorpion envenoming*. *FASEB J*, 2010. **24**(9): p. 3479-89.
56. Skerra, A. and A. Pluckthun, *Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli**. *Science*, 1988. **240**(4855): p. 1038-41.
57. Bird, R.E., et al., *Single-chain antigen-binding proteins*. *Science*, 1988. **242**(4877): p. 423-6.
58. Huston, J.S., et al., *Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(16): p. 5879-83.
59. Glockshuber, R., et al., *A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv fragments*. *Biochemistry*, 1990. **29**(6): p. 1362-7.
60. Begent, R.H., et al., *Clinical evidence of efficient tumor targeting based on single-chain Fv antibody selected from a combinatorial library*. *Nat Med*, 1996. **2**(9): p. 979-84.

61. Greenspan, N.S. and E. Di Cera, *Defining epitopes: It's not as easy as it seems*. Nat Biotechnol, 1999. **10**: p. 936-937.
62. Calderon-Aranda, E.S., et al., *Mapping of an epitope recognized by a neutralizing monoclonal antibody specific to toxin Cn2 from the scorpion Centruroides noxius, using discontinuous synthetic peptides*. Eur J Biochem, 1999. **264**(3): p. 746-55.
63. Selisko, B., et al., *Antibody BCF2 against scorpion toxin Cn2 from Centruroides noxius Hoffmann: primary structure and three-dimensional model as free Fv fragment and complexed with its antigen*. Proteins, 1999. **37**(1): p. 130-43.
64. Riaño-Umbarila, L., *Aislamiento y caracterización de anticuerpos humanos contra la toxina Cn2 del veneno del alacran Centruroides noxius a partir de una biblioteca de despliegue de scFvs* Tesis Doctorado (Doctorado en Ciencias Bioquímicas)-UNAM, Instituto de Biotecnología 2005: p. 1-72.
65. Davies, D.R. and G.H. Cohen, *Interactions of protein antigens with antibodies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(1): p. 7-12.
66. Gershoni, J.M., et al., *Epitope mapping: the first step in developing epitope-based vaccines*. BioDrugs, 2007. **21**(3): p. 145-56.
67. Leslie, A.G.W., *Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data*. Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletters on Protein Crystallography, 1992. **No. 26**.
68. Kabsch, W., *Xds*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. **66**(Pt 2): p. 125-32.
69. *The CCP4 suite: programs for protein crystallography*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1994. **50**(Pt 5): p. 760-3.
70. McCoy, A.J., et al., *Phaser crystallographic software*. J Appl Crystallogr, 2007. **40**(Pt 4): p. 658-674.
71. Brunger, A.T., *Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures*. Nature, 1992. **355**(6359): p. 472-5.
72. Adams, P.D., et al., *PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. **66**(Pt 2): p. 213-21.
73. Emsley, P. and K. Cowtan, *Coot: model-building tools for molecular graphics*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2004. **60**(Pt 12 Pt 1): p. 2126-32.
74. Laskowski, R.A., et al., *PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures*. Journal of Applied Crystallography, 1993. **26**(2): p. 283-291.
75. Sumathi, K., et al., *3dSS: 3D structural superposition*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(Web Server issue): p. W128-32.
76. Praveen, S., et al., *WAP (version 2.0): an updated computing and visualization server for water molecules*. J. Appl. Cryst., 2008. **41**: p. 952-954.
77. Krissinel, E. and K. Henrick, *Inference of macromolecular assemblies from crystalline state*. J Mol Biol, 2007. **372**(3): p. 774-97.
78. Vriend, G., *WHAT IF: a molecular modeling and drug design program*. J Mol Graph, 1990. **8**(1): p. 52-6, 29.
79. Costantini, S., G. Colonna, and A.M. Facchiano, *ESBRI: a web server for evaluating salt bridges in proteins*. Bioinformatics, 2008. **3**(3): p. 137-8.
80. Tina, K.G., R. Bhadra, and N. Srinivasan, *PIC: Protein Interactions Calculator*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(Web Server issue): p. W473-6.
81. Baker, N.A., et al., *Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(18): p. 10037-41.
82. Polyansky, A.A., P.E. Volynsky, and R.G. Efremov, *Computer simulations of membrane-lytic peptides: perspectives in drug design*. J Bioinform Comput Biol, 2007. **5**(2B): p. 611-26.

83. Bond, C.S. and A.W. Schuttelkopf, *ALINE: a WYSIWYG protein-sequence alignment editor for publication-quality alignments*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2009. **65**(Pt 5): p. 510-2.
84. Hudson, P.J. and A.A. Kortt, *High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies*. J Immunol Methods, 1999. **231**(1-2): p. 177-89.
85. Kortt, A.A., et al., *Recombinant anti-sialidase single-chain variable fragment antibody. Characterization, formation of dimer and higher-molecular-mass multimers and the solution of the crystal structure of the single-chain variable fragment/sialidase complex*. Eur J Biochem, 1994. **221**(1): p. 151-7.
86. Arndt, K.M., K.M. Muller, and A. Pluckthun, *Factors influencing the dimer to monomer transition of an antibody single-chain Fv fragment*. Biochemistry, 1998. **37**(37): p. 12918-26.
87. Langer, G., et al., *Automated macromolecular model building for X-ray crystallography using ARP/wARP version 7*. Nat Protoc, 2008. **3**(7): p. 1171-9.
88. Milner-White, E.J., et al., *One type of gamma-turn rather than the other gives rise to chain reversal in proteins*. J Mol Biol, 1988. **204**: p. 777-782.
89. Kaufmann, M., et al., *Crystal structure of the anti-His tag antibody 3D5 single-chain fragment complexed to its antigen*. J Mol Biol, 2002. **318**(1): p. 135-47.
90. Arnett, K.L., S.C. Harrison, and D.C. Wiley, *Crystal structure of a human CD3-epsilon/delta dimer in complex with a UCHT1 single-chain antibody fragment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(46): p. 16268-73.
91. Hwang, W.C., et al., *Structural basis of neutralization by a human anti-severe acute respiratory syndrome spike protein antibody, 80R*. J Biol Chem, 2006. **281**(45): p. 34610-6.
92. Leysath, C.E., et al., *Crystal structure of the engineered neutralizing antibody M18 complexed to domain 4 of the anthrax protective antigen*. J Mol Biol, 2009. **387**(3): p. 680-93.
93. Lo Conte, L., C. Chothia, and J. Janin, *The atomic structure of protein-protein recognition sites*. J Mol Biol, 1999. **285**(5): p. 2177-98.
94. Rajamani, D., et al., *Anchor residues in protein-protein interactions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(31): p. 11287-92.
95. Decanniere, K., et al., *Degenerate interfaces in antigen-antibody complexes*. J Mol Biol, 2001. **313**(3): p. 473-8.
96. Jones, S. and J.M. Thornton, *Principles of protein-protein interactions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(1): p. 13-20.
97. Nooren, I.M. and J.M. Thornton, *Diversity of protein-protein interactions*. EMBO J, 2003. **22**(14): p. 3486-92.
98. Getzoff, E.D., et al., *The chemistry and mechanism of antibody binding to protein antigens*. Adv Immunol, 1988. **43**: p. 1-98.
99. Leipold, E., et al., *Subtype specificity of scorpion beta-toxin Tz1 interaction with voltage-gated sodium channels is determined by the pore loop of domain 3*. Mol Pharmacol, 2006. **70**(1): p. 340-7.
100. Cohen, L., et al., *Common features in the functional surface of scorpion beta-toxins and elements that confer specificity for insect and mammalian voltage-gated sodium channels*. J Biol Chem, 2005. **280**(6): p. 5045-53.
101. Hernandez-Salgado, K., et al., *Heterologous expressed toxic and non-toxic peptide variants of toxin CssII are capable to produce neutralizing antibodies against the venom of the scorpion Centruroides suffusus suffusus*. Immunol Lett, 2009. **125**(2): p. 93-9.

102. Li, Y., et al., *X-ray snapshots of the maturation of an antibody response to a protein antigen*. Nat Struct Biol, 2003. **10**(6): p. 482-8.

10. ANEXO

Derivado de esta tesis se publicó un artículo en la revista The Journal of Biological Chemistry. En la publicación se describen las bases estructurales de la neutralización de la toxina Cn2 por el scFv 9004G.

Supplemental Digital Content is available for this article. Direct URL citations appear in the blue text and are hyperlinked to supplemental files. For more information on this feature see the article Web site.

DOI: 10.1074/jbc.M110.194000

Structural Basis of Neutralization of the Major Toxic Component from the Scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann by a Human-derived Single-chain Antibody Fragment^{1,2}

Juan Carlos Canul-Loeb³, Lidia Briano-Limbanla³, Enrique Rodiño-Pinara³, Baltasar Macentil³, Lourival U. Possenti³, and Alfredo Torres-Larios^{1,2}

From the ¹Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-70, Cuernavaca, Morelos C2270 and the ²Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de Física y Química, Universidad Autónoma de México, Ciudad de México, México and the ³Centro de Estudios Científicos, Universidad Veracruzana, Apartado Postal 70-242, Mexico City 06512, México

It has recently been reported that certain single-chain antibody fragments of human origin scFv3 can neutralize the effects of two different scorpion venoms through interactions with the primary toxins of *Centruroides noxius* Hoffmann (Cn2) and *Chorebus affinis affinis* (Ca2). Here we present the crystal structure of the complex formed between scFv3 (98-105) and the Cn2 toxin determined in two crystal forms at 2.5 and 1.9 Å resolution. A 15-residue span of the toxin is recognized by the antibody through a patch formed by residues from one of the complementary-determining regions of the scFv. Analysis of the catalytic site of the complex reveals three features. First, the binding of toxin Cn2 occurs with conserved residues for the binding of β -toxins to the Na⁺ channel receptor (i.e., Scn2B). The primary recognition of Cn2 involves mainly residues that are present in both Cn1 and Cn2 toxins. Finally, the effect on the inactivation kinetics of previously reported key residues during the inactivation process of different scFvs can be inferred from the structure. Taken together, these results provide the structural basis that explains the mechanism of the broad neutralizing activity and give insight into the process of directed evolution that gave rise to this family of neutralizing scFvs.

The most hazardous component of scorpion venoms are toxins that can selectively bind to voltage-gated sodium channels of their mammalian. A subgroup among these toxins, the long-chain Na⁺ channel toxins, are formed by 60–70 amino acid residues which adopt a highly preserved core with a pug-

fold (1). These Na⁺ channel toxins have for long been classified into two major classes Ia and Ib based on their effects in the gating mechanism of Na⁺ channels and their properties (2–5). The old world toxin II from *Centruroides noxius* Hoffmann (Cn2) and the new world toxin II from *Chorebus affinis affinis* (Ca2) are considered to be the archetypes of Ia and Ib toxins, respectively (6,7).

The human scorpion toxin receptor is located in the central nervous system, specifically in the brain (8) of humans. The most widely used scorpion antivenom is the serum of a horse against Cn2 (Cn2_h) of 0.1–0.25 mg/ml of the serum (9,10). In addition, the Mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann produces toxin Cn2, one of the most abundant and serious venoms against mammals (Cn2_h) of 0.25–0.5 mg/ml of serum (11,12). Sequence comparisons show that Cn2 presents a high similarity with other β -toxins from *C. noxius* species, such as Cn1 and Cn3 (genus I), and scFvs (13,14). Cn1 and Cn3, are specific to Na⁺ channel subtype Na_v1.8 (5,7).

Due to the fact that scorpion stings are a considerable public health problem, a number of antibodies (9,15) have been put forth to explore alternative treatments to generate more specific antibodies against the venoms of scorpions harmful to humans (reviewed in ref. 16). One of the most promising alternatives is monoclonal antibodies (the use of antibodies of human origin, Briano-Limbanla et al. (17)) and also of a monoclonal human antibody library. A single chain antibody fragment scFv, designed as 3', which recognizes the toxin Cn2, was selected by phage display technology. After three cycles of directed evolution, the authors selected scFv 1006, which binds with promolar affinity to Cn2 (from 3') but following a 4 d. Treatment with a heavy chain against scFv Cn2, the authors found scFv 9004G was found (12). Notably, both antibodies neutralized the voltage currents of *C. noxius* and *C. affinis* (17). Combination of key residues changes from both antibodies resulted in scFv 1E, an antibody fragment with a higher level of expression and better stability.

¹ This work was supported by Grant R-150 from Instituto Nacional de Salud Pública, Secretaría de Salud, México (A.T.L.), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (A.T.L.), Dirección de Apoyo a la Investigación Científica (A.T.L.), Dirección de Apoyo a la Investigación Científica (A.T.L.), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (A.T.L.), and Grant R-150 from Instituto Nacional de Salud Pública (A.T.L.).

² The authors are grateful to Dr. Carlos Rodríguez for his technical assistance during the X-ray data collection.

³ To whom all correspondence should be addressed. E-mail: alarios@icq.iaf.uam.mx.

⁴ Present address: Instituto de Física y Química, Universidad Autónoma de México, Ciudad de México, México. E-mail: canul@icq.iaf.uam.mx.

⁵ Present address: Instituto de Física y Química, Universidad Autónoma de México, Ciudad de México, México. E-mail: alarios@icq.iaf.uam.mx.

⁶ The authors are grateful to Dr. Carlos Rodríguez for his technical assistance during the X-ray data collection.

Despite previous biochemical and immunological studies, the localization of the toxin epitope and a structural perspective on the structure-function relationship of the different active residues remain elusive. Here we present the crystal structures of the 9004G-Cn2 complex in two crystal forms at 2.5 and 1.9 Å resolution. The structure analysis shows that a common binding region of the toxin, comprising the segments (Leu¹⁰ from the β₁ strand to the α helix (Tyr⁴⁷-Leu⁵⁷) and the β₂ loop (Tyr⁴⁷-Ala⁵⁷) that connects the β₁ and β₂ strands, is shared by the α-chain 9004G and the Nc₁ channels. These observations imply that 9004G neutralizes Cn2 by competing for a set of residues that form the bioactive surface of Cn2 and therefore blocks the receptor binding site.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cn2 Toxin Purification. Cn2 toxin was extracted from the soluble venom of the scorpion *C. mesas bulli* and was purified by a series of three ion exchange stages that included size exclusion chromatography followed by several rounds of cation exchange ion chromatography, as described previously (7). Fractions containing Cn2 were pooled, lyophilized, and further purified by high performance liquid chromatography (HPLC). For the HPLC purification, Cn2 aliquots were loaded onto an analytical Cn2 reverse phase column (Vydac, Hesperia, CA) in the presence of solvent A (0.2% TFA in water) and eluted with a linear gradient from 20 to 40% solvent B (0.1% trifluoroacetic acid in acetonitrile) over 20 min at a flow rate of 1 ml/min. The homogeneity of Cn2 was verified by mass spectrometry analysis using a Finnigan LCQTM ion trap mass spectrometer (ThermoFinnigan). Fractions containing the Cn2 toxin were pooled, vacuum-dried, and stored at -20°C until needed.

Antibody scFv 9004G Expression and Purification. Recombinant antibody scFv 9004G was expressed with a 12-mer histidine tag followed by a His₆ affinity purification tag in *Escherichia coli* (GE cells) as described previously (11). Cells were grown at 37°C until an A_{600} of 0.5 was reached. At that time, cells were induced for 5 h with a final concentration of 1 mM isopropyl β-D-thiogalactopyranoside at 30°C and were harvested by centrifugation (5,000 × g for 10 min). The resulting cell pellet from 2 liters of culture was frozen at -80°C until needed. For scFv 9004G purification, the cell pellet was thawed and resuspended in 20 ml of buffer A (50 mM sodium phosphate, pH 7.4, 300 mM sodium chloride, 40 mM imidazole). Cells were lysed by sonication on ice and then centrifuged at 27,410 × g for 30 min. The resulting supernatant was applied onto a 5-ml Ni²⁺-Spharose 6B column (GE Healthcare) connected to an Akta HP X system (GE Healthcare). This column was then washed with buffer A to elute nonspecifically bound proteins. The scFv sample was eluted with buffer A plus 60 mM imidazole. The fraction containing scFv 9004G was applied to two desalting columns (HiPrep 26/6, GE Healthcare) connected in tandem and previously equilibrated with 10 mM Tris, pH 8.5. Fractions containing the scFv 9004G were pooled and then applied to a MonoQ 10/100 column pre-equilibrated with 10 mM Tris, pH 8.5. The antibody was eluted with a linear gradient of NaCl from 0 to 200 mM in 40 min. Fractions containing the antibody were pooled, diluted with 3 volumes of 40 mM Tris, pH 8.5, and applied to an AKX Spharose 6B column (GE

Healthcare), previously pre-equilibrated with buffer B. The protein was again eluted with a linear gradient of NaCl from 0 to 200 mM in 40 min. Fractions containing the scFv 9004G were pooled and vacuum dried (Amicon Ultra filter, Millipore, 50 kDa) to 1 mg/ml. The protein sample was >99% pure as judged by denaturing gel electrophoresis.

Formation of the 9004G-Cn2 Complexes. Protein aliquots of scFv 9004G and toxin Cn2 were dialyzed in PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 9 mM Na₂HPO₄, 1.6 mM KH₂PO₄, pH 7.2). Complex 9004G-Cn2 was formed by mixing Cn2 with scFv 9004G (1:3:1 ratio) and incubating the reaction for 1 h at room temperature with mild agitation. The complex was then concentrated to ~2 mg/ml (Amicon Ultra filter, Millipore, 30 kDa). The 9004G-Cn2 complex was loaded onto a size exclusion chromatography Superdex S 75 10/300 analytical column (GE Healthcare) connected to an Akta HP X system (GE Healthcare) equilibrated with PBS. The column was run at a flow rate of 1 ml/min, and absorbance at 280 nm was monitored. Two peaks were eluted, corresponding to the dimeric and monomeric forms of the complex 9004G-Cn2. The monomeric complex peak at 1.5 min (scFv 9004G-Cn2) was collected and concentrated to 20 mg/ml.

Crystallization of the 9004G-Cn2 Complex and Data Collection. Crystals of the 9004G-Cn2 complex were obtained both by vapor diffusion using a sitting drop setup and also by microbatch, reverse diffusion methods, at 4°C. Via vapor diffusion, crystals appeared within 1 week in a drop containing 1 μl of a solution of the 9004G-Cn2 complex at 5 mg/ml and 1 μl of reservoir solution consisting of 100 mM HEPES, pH 5.5, 25% polyethylene glycol 2050, and 200 mM ammonium sulfate. Crystals were cryoprotected by increasing the concentration of polyethylene glycol 2050 in the crystal drop to 35%. Crystals obtained with the microbatch method appeared after 2 weeks in a drop containing 1 μl of a solution of the 9004G-Cn2 complex at 7.0 mg/ml and 1 μl of 1.4 M Na₂HPO₄/K₂HPO₄, pH 5.6, under paraffin oil. These crystals were cryoprotected, replacing the water in the mother liquor by 25% glycerol (v/v). Crystals were then flash frozen in liquid nitrogen. Diffraction data were collected at the Life Sciences Collaborative Access Team (LS-CAT) 23-ID-1 and 6 beamlines of the Advanced Photon source (Argonne National Laboratory). Data were indexed with MOSFLM (12) and XDS (14) and reduced with XSCALE (15).

Structure Determination and Refinement. The structure of the 9004G-Cn2 complex was determined by molecular replacement using PHASER (16) to the P2₁-2₁ (data collected at 2.5 Å resolution) and P2₁ space groups (data collected at 1.9 Å resolution). The search models that gave rise to the initial phases were generated by dividing a model of the 6005-Cn2 complex into three parts (the heavy and light variable domains of 6005F and toxin Cn2) and subdividing these three partial models as separate search models (Z-scores for correlation and translation) of 1.8 units respectively (1) and 0.03, 0.1, and 0.03, and 0.7 and 0.7 for the three models as in the asymmetric unit of the light (L) chain: 7.1 and 33.6, 6.1 and 28.1, and 6.7 and 26.4 for the heavy (H) chain: 6.4 and 22.5, 4.9 and 38.9, and 6.4 and 33.9

W. Drenth was at the Life Science Collaborative Access Team, Argonne National Laboratory.

Scorpion Toxin Neutralization by scFv

TABLE 1

X-ray data collection and refinement statistics

Values in parentheses are for the last 5% of data

Parameters	9004G	924
Data collection statistics		
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁
Unit cell dimensions (Å)	150.166 (1.172) ^a	119.7 (14.7), 71.7 (7)
Resolution range (Å)	30.0–3.00 (3.00)	30.0–4.00 (4.00)
No. of reflections	228,709 (24,885)	180,215 (22,816)
No. of unique reflections	25,179 (2,573)	16,854 (1,773)
Completeness (%)	99.2 (99.0)	100.0 (100.0)
R_{int} (%)	1.2 (11.5)	2.0 (25.6)
R_{σ}	0.0 (7.7)	0.1 (7.5)
$MCC/3\sigma$	242 (5.1)	222 (8.1)
No. of observations (redundancy)	1	2
Refinement statistics		
Resolution range (Å)	40.75–2.6 (2.6–2.6)	40.75–3.10 (3.10–3.10)
R_{work} (%)	21.1 (30.5) (26.0 (22.5))	18.6 (25.1) (21.4 (20.0))
R_{free} (%) (initial refinement)	27.0 (30.4) (23.0)	16.7 (21.6) (19.0)
Mean χ^2 per atom (initial refinement)	17.9 (24.7) (17.0)	21.4 (31.0) (17.7)
σ -cutoff from Wilson plot (Å ⁻¹)	22.8	20.1
Fourier map peak electron density (e/Å ³)	1.01	0.07
Low-angle square deviation and high-angle slope	126	112
Cross-validation R factor (initial refinement)	1.28	0.73
Test set is Ramachandran plot (%)		
Allowed region	145 (94.1)	139 (91.1)
Allowed region	7 (4.0 (2.1))	36 (21.1)
Disallowed region	2 (0.4 (0.2))	2 (0.4 (0.2))
Disallowed region	1 (0.0 (0.1))	2 (0.4 (0.2))

^a Not available.

^b Values in parentheses are for the refinement of 2–5 Å.

for the Cn2 toxin. Tight non-crystallographic symmetry restraints were imposed at the beginning of the refinement of this structure at 2.7 Å resolution assuming the three copies of the complex in the asymmetric unit. The restraints were relaxed during the last cycles of refinement, since initial refinement difference maps showed the 19 changes that exist between 9004G and 9249 scFvs (see Fig. 1). The structure of the 9004G-Cn2 complex (space group P2₁2₁2₁ with two complexes in the asymmetric unit) was solved using the coordinates of the first 9004G-Cn2 complex as the search model (Z-score 5.3 and 20.5 for the rotation and translation functions, respectively, for one complex and 30.8 and 55 for the second complex in the asymmetric unit). Refinement was performed using REFMAC (15) and Phenix (17). Refinement was alternated with manual building/refinement in COOT (18). Five percent of the data were used to validate the refinement. Water molecules were first located using the program ARP/wARP (19) and then validated in COOT. Behaviors concluded in Phenix after the addition of alternate side-chain conformations (σ_A -weighted C_{α}^2), simulated annealing omit maps were used to further validate the quality of the model and the presence of water molecules. Data collection and refinement statistics are summarized in Table 1.

Structure Analysis.—Quality of the final model was evaluated using PROCHECK (20) and the RCSR validation server ADIT. Superposition and location of invariant water molecules were made using the program Selsk (21). Interfacial water molecules were located with the program Water Analysis Package (22). Geometric parameters (χ_1 and the ψ proline angles) were calculated with Se (17) and the protein-protein interaction server (23), respectively. Analysis of the interface was made using the PISA server (24). Interface residues were identified using CONTACT (15). Hydrogen bonds and salt bridges were identified using the programs WHA (11) and SBR (25–26), respec-

tively. Hydrophobic and non-covalent contacts were identified using the POC server (27) with the following criteria: Å for hydrophobic contacts, 4.5–7 Å for aromatic-aromatic interactions, and 5 Å for cation- π interactions. Electrostatic potentials were calculated with APBS (28). Figures were prepared using PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2, Schrödinger, LLC) and A DLCE (29).

RESULTS

General Features of the scFv-9004G-Cn2 Complex.—Crystal structures of the scFv-9004G-Cn2 complex were determined in two different space groups. One structure, with three complexes in the asymmetric unit, was determined in the orthorhombic space group P2₁2₁2₁ at 2.6 Å resolution. A second structure, with two complexes in the asymmetric unit, was determined in the cubic space group P2₁ at 1.9 Å resolution (Table 1). Although the contacts in the two structures into the crystalline matrix are different (Supplemental Fig. S1), the superposition of the scFv-9004G-Cn2 complexes gives a root-mean-square deviation value of 0.6 Å (288 common residues). Each complex is composed of one Cn2 molecule and one scFv chain (V_H and V_L domains). The final model comprises residues 1–66 of Cn2 toxin, residues 7–117 of the heavy variable domain (V_H), and residues 35–332 of (scFv) variable domains (V_L) of 9004G (residues of V_H and V_L are designated with superscripts H and L, respectively). The overall model geometry is good; residue A183^H in the structure at 1.9 Å is the only amino acid located in a disallowed region of the Ramachandran plot (Table 1) due to its presence in a classic γ -turn of complementary determining region (CDR) 1 (30).

In the structure at 1.9 Å resolution, no electron density was observed for residue R240^H at 9004G, the C-terminus of Cn2 (Ser²⁴⁰), and the residues 114–119 in domain linker between the

Downloaded from www.jbc.org at Middle East Technical Univ on 05/06/15. See the Terms and Conditions (http://www.jbc.org/page/info/about/policies/terms.jsp)

Scorpion Toxin Neutralization by scFv

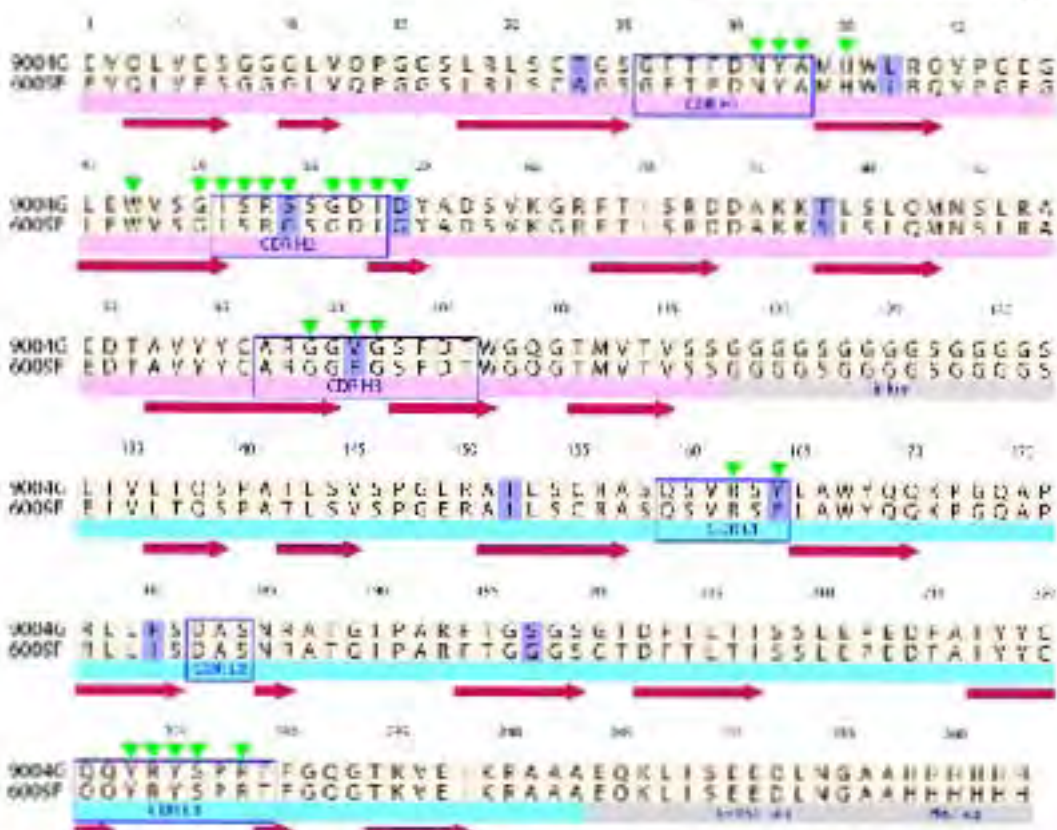


FIGURE 10. Amino acid sequence of the variable region of scFvs 9004G and 6005F. The alignment of scFvs 9004G and 6005F with scorpion toxin is described in Supplementary Tables 1 and 2. The top part of scFvs 9004G and 6005F is aligned with scorpion toxin residues 1–179, and the bottom part of scFvs 9004G and 6005F is aligned with scorpion toxin residues 180–320. The alignment is shown in pink, purple, cyan, and light blue regions, which correspond to the CD2H1, CD2H2, CD2H3, and CD2H4 regions of scFv, whereas green arrows indicate the positions of scFv disulfide bonds. The alignment is shown in pink, purple, cyan, and light blue regions, which correspond to the CD2H1, CD2H2, CD2H3, and CD2H4 regions of scFv, whereas green arrows indicate the positions of scFv disulfide bonds. The alignment is shown in pink, purple, cyan, and light blue regions, which correspond to the CD2H1, CD2H2, CD2H3, and CD2H4 regions of scFv, whereas green arrows indicate the positions of scFv disulfide bonds.

V_L and V_H domains (Fig. 1). In both structures, no electron density was visible for the C-terminal α -Asp and β -His tags of scFv 9004G. In addition, all regions not visible in the electron density maps are located far away from the complex interface (Fig. 3a) and are normally disordered in other scFv crystal structures (77–79). The regions that comprise the interface of the complex are well defined, as indicated by the inspection of a simulated annealing difference omit map (Fig. 2b). Given the similarities between the two crystal structures, most of the analyses and conclusions presented herein will be those taken from the 9004G–Cn2 complex at the higher resolution.

The overall structure of the 9004G–Cn2 complex is shown in Fig. 3a. The complex involves five of the scFv CD2H loops, which are well ordered in association with the Cn2 toxin. The V_L and V_H domains of the scFv 9004G exhibit the typical fold of the variable domains of an immunoglobulin, whereas Cn2 adopts the highly ordered scaffold typical of scorpion β -toxins. The toxin α helix (Asp²²–Lys²⁰³) is packed against a three-stranded antiparallel strand, with four disulfide bridges stabilizing the core. These regular secondary structural elements are con-

nected by irregular loops that cover much of the surface of the toxin. The β -turn (Asp¹⁶–His¹⁹) following the β_1 strand (His²–Lys⁷) and the β_2 -turn (Gly⁸⁹–Ala⁹¹) running between the α -helix and the β_2 strand (His¹⁹–Lys²⁰) can be characterized as type I β -turns, whereas a type I β -turn (Pro⁸²–Ala⁸⁵) connects β_1 and β_2 (Ala⁸²–Pro⁸⁵) α -strands.

The Cn2 structure in the complex is similar to the structure determined by X-ray (PDB code 1CN21A3). The superposition of the structure of Cn2 bound to scFv 9004G and the reported NMR (structural) models gives an overall root mean square deviation value of 1.4 \pm 0.1 Å (85 common residues). However, some differences exist between the crystal and the NMR structures (supplied as Fig. S3 and S4). In particular, the segment between residues Lys¹⁹ and Asp²² adopts a significant rearrangement, which is probably due to the binding of the antibody (supplemental Figs. S3 and S4). In this region, the 15 reported NMR structural models are quite similar to each other with each other than they do with the crystal structure reported here. This conformation may result from steric hindrance between Lys¹⁹ and Asp²² and the residues in between

Downloaded from www.physoc.org at UNIV OF CALIFORNIA on April 10, 2015



Scorpion Toxin Neutralization by scFv

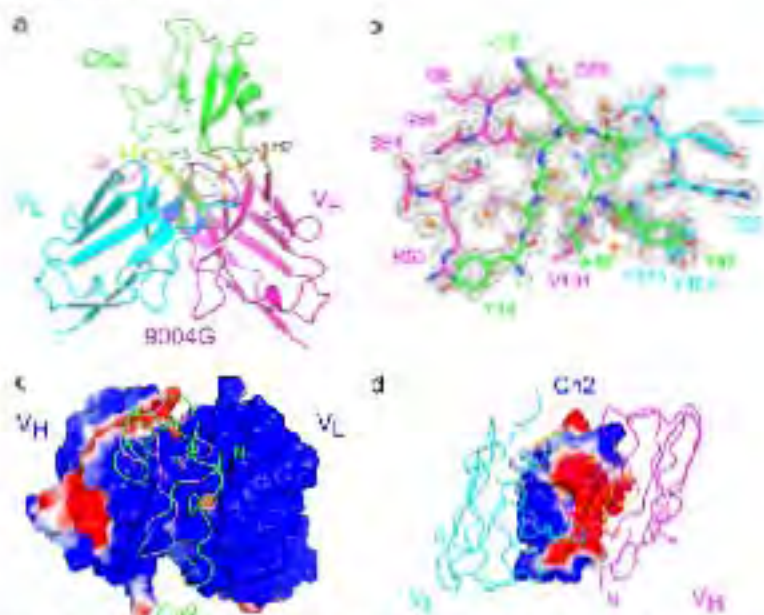


FIGURE 2. Crystal structure of the complex between the scFv 9004G and the Cn2 toxin. **a**, Overview of the scFv 9004G-Cn2 complex at 1.5 Å resolution. The complex is a dimer of the scFv complementarity-determining region 1 (CDR1) loops, which interact with the protein loops of Cn2 toxin. Cn2 is colored in green. **b**, Close-up of the 9004G_{CDR1} variable region in contact with toxin. The toxin is colored in cyan, and the scFv is colored in magenta. The scFv CDR1 loop is shown in stick representation, and the toxin is shown in ribbon representation. The toxin is colored in cyan, and the scFv is colored in magenta. **c**, Electrostatic potential surface of the scFv 9004G-Cn2 complex. The toxin is colored in cyan, and the scFv is colored in magenta. **d**, Electrostatic potential surface of the Cn2 toxin. The toxin is colored in cyan, and the scFv is colored in magenta.

opposite electrostatic surfaces between Asp²² and Trp²⁷ and binding of 9004G (supplemental Figs. S1 and S2).

Shape and electrostatic complementarity between scFv 9004G and Cn2. Two parameters commonly used to characterize shape complementarity were calculated for the 9004G-Cn2 complex. One is the gap volume index, which evaluates how tightly the two surfaces are packed by measuring the volumetric empty space between them. The gap volume index for the 9004G-Cn2 complex is 2.4, indicating a poor complementarity (with 1 to 1000 Å³ for example in enzyme-inhibitor complexes). The value is also within the average of 3.0 ± 3.8 reported for other antigen-antibody complexes (36, 37).

The second calculated parameter was the shape complementarity statistics score (*S*_{sc}), a measure of the geometric fit at an interface (in units of Å). Its value for the scFv 9004G-Cn2 complex is 0.78, which is higher than the average value (0.62 ± 0.08) that has been reported for antibody-antigen complexes (27).

Moreover, the electrostatic potential, as seen in the solvent-accessible surface at the 9004G-Cn2 interface, is strikingly complementary (Fig. 2, *c* and *d*). On Cn2, the negatively charged epitope surface (Fig. 2*c*) complements with the positively charged paratope surface (Fig. 2*d*). Taken together, these parameters provide a quantitative characterization of the complex interface: a good electrostatic and electrostatic complementarity.

Finally, this is consistent with the known high affinity interaction observed between 9004G and Cn2 (17).

Major 9004G-Cn2 hydrogen bonds. Details of the scFv 9004G-Cn2 contacts with Cn2 are presented in Figs. 1–3 and supplemental Table S1. The total buried surface area at the interface between scFv 9004G and Cn2 is 3,700 Å². This value is similar to the average size for antigen-antibody complexes (38). The scFv 9004G contributes with 929 Å² of surface area (90% belongs to V_H domain V10^H, R53^H, and D57^H contribute with 37%), and Cn2 provides 373 Å² (Cn2, 1.1 nm², and Phe²² contribute with 33%) (read as Leu²² contributes with 44 Å² to the buried surface area of Cn2) (and 100 Å² of surface area on the complex (supplemental Table S1). As an example, it modifies the "anchors" residues around which the remainder of the complex then adapts (39). At the center of the antigen binding site of 9004G, V_H11^H protrudes from the binding site with its side chain in a small cavity surrounded by the hydrophobic cluster of Cn2 formed by Tyr⁴⁴, Ala⁴⁷ (e.g., Val. Residue V10^H contributes to the total buried surface area with 1.1 Å² and could be considered as an additional anchor residue (supplemental Table S1). At the periphery of the complex, Trp²⁷ and Trp²² cooperate with 104 and 90 Å², respectively, and also act as molecular "bricks" that lock the complex together (29).

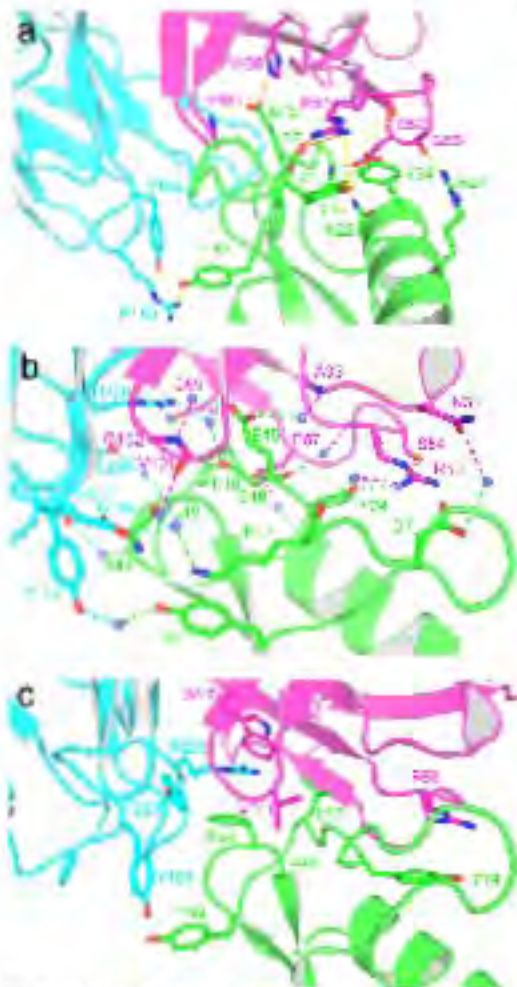


FIG. 15. The 9044G-C2 complex interface is mainly stabilized by charge-charge and hydrogen-bonding interactions involving five 9044G CDRs. (a) View of the charge-charge and hydrogen-bonding interaction between residues of the interface of the 9044G CDR complex (one chain is colored in green and V_H and V_L chains of 9044G are colored in magenta and cyan, respectively). The polyanionic epitope (blue-colored hydrophobic and charged residues) is shown in magenta. (b) View of the hydrophobic interactions between residues of the interface of the 9044G CDR complex (one chain is colored in green and V_H and V_L chains of 9044G are colored in magenta and cyan, respectively). The polyanionic epitope (blue-colored hydrophobic and charged residues) is shown in magenta. (c) View of the charge-charge and hydrogen-bonding interaction between residues of the interface of the 9044G CDR complex (one chain is colored in green and V_H and V_L chains of 9044G are colored in magenta and cyan, respectively). The polyanionic epitope (blue-colored hydrophobic and charged residues) is shown in magenta. Details of these interactions are shown in Table 2 and supplemental Tables 14–16 and 18.

TABLE 2

Four interactions between residues at the scFv 9044G-C2 interface: H249 (magenta), H250 (cyan), H249 (magenta), and H250 (cyan).

Epitope Residue ^a	C2		
	Residue	Distance (Å)	Angle (°)
H249 (magenta)	W12 ^b (blue)	3.2	108
	W13 ^b (green)	3.2	108
	W12 ^b (blue)	3.2	108
	W13 ^b (green)	3.2	108
H250 (cyan)	W12 ^b (blue)	3.2	108
	W13 ^b (green)	3.2	108
	W12 ^b (blue)	3.2	108
	W13 ^b (green)	3.2	108
H249 (magenta)	W12 ^b (blue)	3.2	108
	W13 ^b (green)	3.2	108
	W12 ^b (blue)	3.2	108
	W13 ^b (green)	3.2	108
H250 (cyan)	W12 ^b (blue)	3.2	108
	W13 ^b (green)	3.2	108
	W12 ^b (blue)	3.2	108
	W13 ^b (green)	3.2	108

^aResidues are color-coded as in Fig. 15.

Asparagine and Hydrophobic Interactions of the scFv 9044G-C2 Interface. CDRs 12 and 13 make the majority of the antigenic contact (Fig. 2a). Four residues of C2 framework regions 112 (H249), W12^b, and G12^b and H13 (H250) also participate in the binding of C2 (Fig. 3, a and c). The epitope of C2 recognized by 9044G is distributed through the segment that runs from the β_1 strand to the α -helix (Tyr²⁴, Asp²⁵, Tyr²⁶-Leu²⁷, and Asn²⁸) and includes part of the α -helix (Tyr²⁹ and Asp³⁰) and the β turn (Tyr³¹, Ala³²) that connects the β_2 and β_3 strands. Two segments of C2, Tyr²⁴-Leu²⁷ and Tyr²⁶-Ala³², form a part of the contact with 9044G (Fig. 3, a–c). Residue G12^b, in the middle of the segment that runs between the β_1 strand and the α -helix, participates in the binding of C2 and interacts with C2. In the active binding site, the side chain of G12^b inserts into a small cleft formed by hydroxy acids and basic residues contributed by C78^b, H⁷⁹, H⁸¹, and L⁸³, Asp⁸⁴, Cys⁸⁵, V104^b, C107^b, and R120^b (Leu¹²¹ also forms a salt bridge with residue H83^b, which forms the α helix). The side chain of Leu¹²¹ also forms a salt bridge with residue Lys¹²² (C78^b, H⁷⁹, H⁸¹, Asp⁸⁴, Cys⁸⁵, V104^b, C107^b, and R120^b also forms a salt bridge with residue Lys¹²²). The segment Tyr²⁴-Ala³² is bound by C101^b and L¹⁰³. Tyr²⁴ forms a salt bridge interaction with V164^b and W¹⁶⁵ (residue R220^b forming a calcium ion interaction (Fig. 3c). This segment also makes several polar interactions with 9044G (Table 2 and supplemental Tables 14 and 15).

The antigen binding site of 9044G is composed of the small cleft and two hydrophilic patches that surround it. Two patches have a positive electrostatic potential in their solvent-accessible surface. One of them is composed of several residues of CDRs 12 and 13: R163^b, S164^b, V165^b, R166^b, V167^b, and S168^b. These residues form polar and hydrophobic interactions with Leu²⁷, Tyr²⁸, and Thr²⁹ of C2 (Fig. 3, a and c). Residue Tyr²⁸ settles its side chain into a shallow cavity on C2 surface of V_L and forms hydrogen bonds with S164^b and V165^b in addition to an aromatic-aromatic interaction with V167^b (Fig. 3c and Table 2). The second positive patch is composed by residues of CDRs 12 and 13: V163^b, S164^b, R165^b, and G166^b. R165^b forms two salt bridges with Asp²⁵ and a cation- π interaction with Tyr²⁶ (Fig. 3c and Table 2). The main chain of G166^b forms a hydrogen bond with Asp²⁵. This patch also makes several van der Waals interactions that involve Tyr²⁴ and Tyr²⁶ (supplemental Table 16). A patch with a negative electrostatic poten-

Scorpion Toxin Neutralization by scFv

are located at the periphery of the binding site. This is compensated by residues of C100 (E236⁺, L68⁺, and D99⁺) that interact with negatively charged residues that stabilize Ca²⁺ binding by residues L99⁺, L97⁺, and A98⁺ (Fig. 3). D99⁺ forms two hydrogen bonds with L97⁺ and A98⁺ in scFv to confer stability to the complex with L97⁺ and L99⁺ (Fig. 3a and Table 2).

Total-resolved hydrogen bonds of the scFv 9004G-Cx2 interface. There are 45 invariant water molecules involved in water-mediated contacts at the interface of the 9004G-Cx2 complex. Invariant water molecules are defined as those that were observed among both complexes in the asymmetric unit of the structure at 1.9 Å resolution and interact with scFv 9004G and Cx2. Most of these are shown in Fig. 3b (see also supplemental Fig. S2). There are 25 hydrogen bonds between invariant water molecules and 9004G (12 with residues of V₁ domain and 13 with residues of V₂ domain) and the same number of additional bonds between the invariant water molecules and Cx2 (Fig. 3b and supplemental Table S1). These water molecules fill voids between the two proteins, although only a few of them contribute substantially to stabilize the antibody-toxin interface through enhancing the number of hydrogen bonds between the two protein ligands. The invariant water molecules at the interface of the complex 9004G-Cx2 are classified in two groups based on their locations and its B-values (supplemental Fig. S2 and supplemental Table S1). The five more invariant water molecules (those with lower B-values) are probably bound in a cavity in the center of the interface of the complex and are likely the most important for the stabilization of the complex (supplemental Fig. S3).

DISCUSSION

A combination of parameters that describe protein-protein interfaces is used to characterize the interface of the scFv 9004G-Cx2 complex has a significant level of shape and chemical complementarity. The analysis of the interface of the complex identified residues in both proteins that dominate the formation and stabilization of the complex. The segments that run from the β_1 strand to the α helix (Tyr⁴⁸, Leu⁴⁹) and the β turn (Tyr⁴⁷, Asp⁴⁶) that connects the β_1 and β_2 strands interact with one of the 9004G C100s (Fig. 2b). The most important Cx2 anchor residue is Leu¹¹, which inserts into a small cavity formed by residues of the V₁ domain of 9004G. As a result of the protein-antibody interaction (35), the analysis of the interface of the 9004G-Cx2 complex revealed that its stability is provided by van der Waals interactions, hydrogen bonds, and, to a lesser extent, salt bridges. These interactions stabilize the complex and are limited by the initial protein-protein association trough (e.g., supports hydrophobic interactions, whereas hydrogen bonds are the dominant force in the stabilization of the complex) (40).

Structural basis of Scorpion Toxin Neutralization. Many of the biochemical details describing the residues of scorpion β -toxin (Cox1 to m1) sufficient to allow interaction of its interaction with receptors are 1 of mammalian voltage-gated Na⁺ channels have been recently uncovered (41). Indeed, a model depicting how Cox1 might interact with the voltage sensor of Nav1.2 has been proposed (Fig. 4a and supplemental Fig. S5) (22). Cohen et al. (11) also suggested residues Glu²³ and Glu²² at their sites on the surface of interaction of Cox1 with rat brain

Na⁺ channels. Residue Glu²³ is conserved in mammalian scorpion β -toxins of the genus *Opisaurus* (Fig. 4a) and plays a subtle role in the inactivation of the voltage sensor, according to the mechanism of the "voltage sensor trapping" model of the voltage-gated sodium channels (42). When Glu²³ is mutated to Arg on the recombinant protein Cx2 and Cox1, the left shift of the voltage-dependent current induced in rat brain channel Na_v1.2a and rat brain channel Na_v1.6 is abolished (41, 44). In Cx2, residue Glu²³ protrudes from the core of the toxin and is sequestered within a cavity at the center of Ca²⁺ binding site of 9004G (Fig. 4b).

Comparison of the functional surface of Cox1 and the interface of the 9004G-Cx2 complex provides important clues to the molecular basis of the antibody-mediated toxin neutralization. Cohen et al. (11, 43) have shown that single substitutions in Phe¹⁵, Ile²⁷, Leu⁴⁹, Asp⁵¹, Tyr⁵⁰, Arg⁵⁷, Glu⁵⁹, Asp⁶², Tyr⁶², Phe⁶⁴, and Tyr⁶⁶ with alanine considerably increase Cox1 binding affinity to rat brain synaptosomes. In close correlation to these findings, here it is clearly demonstrated that residues Tyr⁴⁸, Leu⁴⁹, Leu⁵⁰, Asp⁵¹, Tyr⁵⁰, Arg⁵⁷, Glu⁵⁹, Tyr⁶², and Phe⁶⁴ from Cx2 form part of the epitope recognized by 9004G (Fig. 4a). Because Cox1, Cox2, and Cx2 recognize Na_v1.6 channels (5), it is highly likely that these motifs interact with a similar region of α_1 channels and that Cox1, Cox2, and Cx2 share a similar region for their binding to Na_v1.6 channels (see supplemental Fig. S6).

The equivalent portions of Cox1 that interact with rat brain Na_v1 channels (11) are shown in Fig. 4c, superimposed on the epitope of Cox1 that is recognized by 9004G (shown in Fig. 4a). The epitope is located in one major segment around the α -helix and the region that connects the β_1 with β_2 of Cx2 and overlaps with the site previously defined by the interaction of Na⁺ channel although the latter seems to cover a slightly larger area. Thus, the local sequence of 9004G (a) appears to be the counterpart of a conserved part of the functional surface of Cox1 with Na⁺ channels (11a). In terms of structural conservation relationships, we propose for the competition results in the potent neutralization effect of toxin Cx2 by the antibody scFv 9004G.

Structural Basis of Cross-reactivity of scFv 9004G. As scFv 9004G proved to be cross-reactive with toxins Cx2 and Cox2, we mapped the sequence differences between them into the crystal structure of the complex 9004G-Cx2 (supplemental Fig. S6). Only residue 7 belongs to the interface region. The side chain of Asp⁷ makes a salt bridge with the side chain of His²¹ in the scFv 9004G-Cx2 complex (supplemental Fig. S6a). As this residue is substituted by asparagine in Cox2 (Fig. 4b), direction is probably lost in the native complex (supplemental Fig. S6b). The loss of this interaction is probably reflected in the slightly different K_D values of 9004G for Cx2 and Cox2, which are 0.33 and 0.51 nM, respectively (34).

Structural Basis of Inactivation of the Different scFvs. We have analyzed a key change that took place during the interaction of scFv 9004G. Although 9004G is a recombinant (Fig. 5a) and its interaction is significant to Cx2 as a significant interaction (35) with its cross-reactive toxin Cox2, in particular with residue Tyr⁶² (see the text), and an increased interaction surface with the toxin can be attributed to this higher affinity.

Scorpion Toxin Neutralization by scFv

REFERENCES

1. Bessis, M., Basset, G., Nguyen, H., and Brevet, J. (2002) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 984, 207–208.
2. Carlier, M., Serrano, A., Laveau, B., and Chippaux, J. (2002) *Neurobiol. Toxicol.* 29, 1121–1129.
3. Arino, E., Goussard, F., and Rivaud, H. (1989) *Toxicol. Europe. Res. Soc.* 95, 340–341.
4. Bolognini, J., Vago, M. G., and Bessis, M. (1992) *Toxicol. Europe. Res. Soc.* 107, 1–2.
5. Goussard, F., Arino, E., Dubois, E. M., and Jochak, H. (1992) *Toxicol. Europe. Res. Soc.* 107, 1–2.
6. Bessis, M., Garcia, E. J., Edwards, E., Ojeda, E., Goussard, F., Wark, E., Rivaud, H., and Chippaux, J. (1992) *Toxicol. Europe. Res. Soc.* 107, 1–2.
7. Zamboni, E., Goussard, F., Martin, E. M., Goussard-Edwards, C., Héritier, D., and Rivaud, H. D. (1992) *Toxicol. Europe. Res. Soc.* 107, 1–2.
8. Bessis, M., Serrano, A., Carlier, M. F., Nguyen, H., Vago, M., Rivaud, H., and Rivaud, H. (1992) *Toxicol. Europe. Res. Soc.* 107, 1–2.
9. Chippaux, J. J., and Rivaud, H. (1992) *Toxicol. Europe. Res. Soc.* 107, 1–2.
10. Goussard, F. J., Rivaud, H., and Rivaud, H. (1992) *Toxicol. Europe. Res. Soc.* 107, 1–2.
11. Bessis, M., Garcia, E. J., Edwards, E., Ojeda, E., Goussard, F., Wark, E., Rivaud, H., and Chippaux, J. (1992) *Toxicol. Europe. Res. Soc.* 107, 1–2.
12. Rivaud, H., Bessis, M., Goussard, F., and Rivaud, H. (1992) *Toxicol. Europe. Res. Soc.* 107, 1–2.
13. Bessis, M., Garcia, E. J., Edwards, E., Ojeda, E., Goussard, F., Wark, E., Rivaud, H., and Chippaux, J. (1992) *Toxicol. Europe. Res. Soc.* 107, 1–2.
14. Rivaud, H., Bessis, M., Goussard, F., and Rivaud, H. (1992) *Toxicol. Europe. Res. Soc.* 107, 1–2.
15. Bessis, M., Garcia, E. J., Edwards, E., Ojeda, E., Goussard, F., Wark, E., Rivaud, H., and Chippaux, J. (1992) *Toxicol. Europe. Res. Soc.* 107, 1–2.
16. Rivaud, H., Bessis, M., Goussard, F., and Rivaud, H. (1992) *Toxicol. Europe. Res. Soc.* 107, 1–2.
17. Bessis, M., Garcia, E. J., Edwards, E., Ojeda, E., Goussard, F., Wark, E., Rivaud, H., and Chippaux, J. (1992) *Toxicol. Europe. Res. Soc.* 107, 1–2.
18. Rivaud, H., Bessis, M., Goussard, F., and Rivaud, H. (1992) *Toxicol. Europe. Res. Soc.* 107, 1–2.
19. Bessis, M., Garcia, E. J., Edwards, E., Ojeda, E., Goussard, F., Wark, E., Rivaud, H., and Chippaux, J. (1992) *Toxicol. Europe. Res. Soc.* 107, 1–2.
20. Rivaud, H., Bessis, M., Goussard, F., and Rivaud, H. (1992) *Toxicol. Europe. Res. Soc.* 107, 1–2.
21. Bessis, M., Garcia, E. J., Edwards, E., Ojeda, E., Goussard, F., Wark, E., Rivaud, H., and Chippaux, J. (1992) *Toxicol. Europe. Res. Soc.* 107, 1–2.
22. Rivaud, H., Bessis, M., Goussard, F., and Rivaud, H. (1992) *Toxicol. Europe. Res. Soc.* 107, 1–2.
23. Bessis, M., Garcia, E. J., Edwards, E., Ojeda, E., Goussard, F., Wark, E., Rivaud, H., and Chippaux, J. (1992) *Toxicol. Europe. Res. Soc.* 107, 1–2.
24. Rivaud, H., Bessis, M., Goussard, F., and Rivaud, H. (1992) *Toxicol. Europe. Res. Soc.* 107, 1–2.
25. Bessis, M., Garcia, E. J., Edwards, E., Ojeda, E., Goussard, F., Wark, E., Rivaud, H., and Chippaux, J. (1992) *Toxicol. Europe. Res. Soc.* 107, 1–2.