



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**Producción recombinante y caracterización fisicoquímica de la  
Escorpina**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

QFB. Sergio Alland Colorado Cortes

Dr. José Federico del Río Portilla

Instituto de Química

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, enero 2019



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

***PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS***

**Producción recombinante y caracterización fisicoquímica de la Escorpina.**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**QFB. Sergio Alland Colorado Cortes**



Ciudad de México, enero 2019

## ***Agradecimientos***

Agradezco a la UNAM y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas por mi formación profesional. También a mi tutor el Dr. José Federico del Río Portilla por todo el apoyo, guía y paciencia que me ha brindado a lo largo de mi desarrollo académico.

Este proyecto fue posible gracias la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de becario: 606117 y con el apoyo del proyecto PAPIIT IN207516 de la DGAPA.

Agradezco a mis sinodales por su tiempo y dedicación para la revisión de este trabajo: Dra. Adela Rodríguez Romero, Dra. Nuria Esturau Escofet, Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Montes Dr. Rogelio Rodríguez Sotres y al Dr. Luis Fernando Olguín Contreras.

Al laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Química a cargo de la Dra. Patricia Cano Sánchez y al Laboratorio Universitario de RMN a cargo de la Dra. Nuria Esturau Escofet por los experimentos realizados.

Agradezco al Departamento de Supercómputo de la DGTIC por los recursos computacionales ocupados en este trabajo.

A la Dra. Bertha Espinoza del IIB por las pruebas antiparasitarias y a la Dra. Elisa Carrillo del IFC por las pruebas de electrofisiología.

## **ÍNDICE GENERAL**

<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>II</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>II</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES</b> .....	<b>2</b>
2.1 Péptidos antimicrobianos de escorpión.....	2
2.2 Características generales de la escorpina y sus aplicaciones biotecnológicas.....	2
2.2.1 Péptidos tipo escorpina.....	2
2.3 Producción de proteínas recombinantes.....	3
2.4 Determinación estructural de proteínas mediante Resonancia Magnética Nuclear.....	4
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>7</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>7</b>
<b>5. DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>8</b>
5.1 Construcción de los vectores.....	8
5.2 Expresión de la proteína de fusión.....	8
5.2.1 Marcaje isotópico del dominio C-terminal [ <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N].....	9
5.3 Lisis celular mediante sonicación.....	9
5.4 Purificación de la PF mediante Cromatografía de Afinidad Metal Quelato (CAMQ).....	9
5.5 Corte de la proteína de fusión con la proteasa TEV.....	9
5.6 Segunda purificación mediante CAMQ.....	10
5.7 Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia.....	10
5.8 Caracterización por MALDI-TOF.....	10
5.9 Caracterización por RMN.....	10
5.10 Pruebas de actividad antiparasitaria.....	11
5.11 Pruebas de actividad en canales iónicos regulados por voltaje.....	11
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>12</b>
6.1 Optimización de la expresión de la proteína de fusión.....	12
6.2 Purificación de las proteínas escorpina, C-terminal y N-terminal.....	12
6.3 Purificación mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia.....	13
6.4 Rendimiento final.....	13
6.5 Determinación de la masa molecular por MALDI-TOF.....	14
6.6 RMN del extremo N-terminal.....	15
6.7 RMN del extremo C-terminal.....	17
6.8 Pruebas preliminares de actividad contra parásitos.....	19
6.9 Pruebas de actividad en el canal iónico Kv1.3.....	21
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>22</b>
<b>8. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>22</b>
<b>9. REFERENCIAS</b> .....	<b>23</b>

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

		<b>Página</b>
Figura 1	<b>1 A.</b> Comparación de la secuencia primaria de aminoácidos de la escorpina con algunos péptidos antimicrobianos tipo cecropina y defensina. <b>1 B.</b> Secuencia primaria de la escorpina.	<b>3</b>
Figura 2	Espectro de protón de una proteína.	<b>5</b>
Tabla 1	Valores de desplazamiento esperados para los protones- $\alpha$	<b>6</b>
Figura 3	Proteína de fusión diseñada para la síntesis de las proteínas recombinantes.	<b>8</b>
Figura 4	Cinéticas de expresión de las proteínas recombinantes producidas en medio LB.	<b>12</b>
Figura 5	Monitoreo de la purificación de la escorpina mediante SDS-PAGE.	<b>13</b>
Tabla 2	Rendimiento de las proteínas recombinantes.	<b>13</b>
Figura 6	Purificación de las proteínas mediante CLAE.	<b>14</b>
Tabla 3	Comparación de los resultados obtenidos por MALDI-TOF con los datos teóricos.	<b>14</b>
Figura 7	Titulación del dominio N-terminal con TFE.	<b>15</b>
Figura 8	Sistemas de espines asignados en el experimento TOCSY del dominio N-terminal.	<b>16</b>
Figura 9	Índice de desplazamiento químico del N-terminal.	<b>16</b>
Figura 10	Estructura tridimensional del dominio N-terminal de la escorpina.	<b>17</b>
Figura 11	Espectros de RMN protónica del C-terminal.	<b>18</b>
Figura 12	Experimento TOCSY con 80 ms de tiempo de mezclado del dominio C-terminal.	<b>19</b>
Figura 13	Señales NOE pertenecientes a láminas beta.	<b>20</b>
Figura 14	Efecto de la escorpina y de sus dominios N-terminal y C-terminal sobre diversos parásitos.	<b>20</b>
Tabla 4	Actividad bloqueadora en canal Kv <sub>1.3</sub> de la escorpina	<b>21</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

<sup>1</sup> H	Hidrógeno 1
ACN	Acetonitrilo
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
CSI	Índice de desplazamiento químico
IPTG	Isopropil B-D-tiogalactopiranosido
kDa	kilo Dalton; 1Da= 1g/mol
Kv	Canal de potasio dependiente de voltaje
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
PAM	Péptido antimicrobiano
PF	Proteína de fusión
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
TFA	Ácido trifluoro acético
TFE	Trifluoro etanol
TOCSY	Total Correlated Spectroscopy

## 1. INTRODUCCIÓN

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son moléculas de naturaleza proteica, cargados positivamente y de carácter anfipático. Son producidos por microbios, plantas y animales y forman parte del sistema inmune innato siendo la primera barrera química de defensa del hospedero. Recientemente, estos péptidos y sus derivados sintéticos han demostrado tener una buena actividad como potentes inhibidores de microorganismos causantes de infecciones en humanos<sup>1,2</sup>.

Los PAMs son una estrategia de defensa natural que ha prevalecido con el paso del tiempo y son efectivos contra patógenos invasores. Debido a su selectividad hacia membranas de procariontes, los microorganismos desarrollan muy baja resistencia. Por lo tanto, estos péptidos se han propuesto como un novedoso medicamento de origen biológico<sup>1,2,3</sup>.

La escorpina es el primer péptido antimicrobiano aislado del veneno de escorpión que contiene cisteínas<sup>4</sup> y, de acuerdo al alineamiento de secuencia primaria, posee una estructura “híbrida” compuesta por un dominio N-terminal muy similar a algunas cecropinas de insectos y un dominio C-terminal parecido a defensinas de escorpión. Por esto, la escorpina posee una estructura muy peculiar<sup>1,4,5</sup>. En estudios anteriores, esta proteína se ha producido de forma recombinante en diferentes sistemas heterólogos y se le ha atribuido como principal aplicación biotecnológica erradicar los parásitos de la malaria: *Plasmodium berghei* y *Plasmodium falciparum*, así como a bacterias Gram positivas y negativas<sup>5,6</sup>.

En el presente trabajo se reporta el proceso de biosíntesis, purificación y caracterización estructural de la escorpina recombinante y de sus dominios amino (residuos 1-28) y carboxilo terminal (residuos 29-75). También, se reportan las pruebas preliminares contra parásitos causantes de la enfermedad tripanosomiasis y leishmaniasis, así como pruebas de actividad en el canal Kv1.3.

## 2. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

### 2.1 Péptidos antimicrobianos de escorpión

Recientemente, se ha descubierto que el veneno de escorpión no solo provee de moléculas capaces de bloquear canales iónicos en las células, sino que contienen una fuente abundante de PAMs. Se piensa que estos péptidos tienen la función de potenciar el efecto de otras neurotoxinas y, principalmente, de proteger de infecciones a la glándula donde se produce el veneno, debido a que se expone al exterior durante la picadura y, por lo regular, muestran una amplia actividad contra diversos microorganismos<sup>1,7,8</sup>.

### 2.2 Características generales de la escorpina y sus aplicaciones biotecnológicas.

La escorpina es el primer PAM aislado a partir de veneno del escorpión africano *Pandinus imperator* por el grupo de Possani<sup>4</sup>. Dicha proteína está constituida por 75 residuos de aminoácidos, posee tres puentes disulfuro con una posible conectividad convencional (C1-C4, C2-C5, C3-C6), tiene una masa molecular de 8,350 Da en su estado oxidado y actualmente solo se conoce su estructura primaria. La secuencia primaria de aminoácidos de la escorpina se asemeja en su extremo carboxilo terminal con las defensinas<sup>9</sup> y en el extremo amino terminal es similar a las cecropinas<sup>4,5,7</sup> (Figura 1). Tanto las defensinas y las cecropinas son péptidos antimicrobianos que se ven involucrados en la respuesta innata de escorpiones e insectos, respectivamente. Se descubrió que la escorpina posee actividad antibacteriana y erradica el crecimiento de los parásitos causantes de malaria *Plasmodium berghei* y *Plasmodium falciparum* en fase de fecundación y en la fase de ooquineto. Actualmente, la escorpina se clasifica como toxina bloqueadora de canales de potasio  $\beta$ -KTx subclase III o péptido tipo escorpina y por similitud de estructura primaria, se sugiere que la escorpina posee un plegamiento estabilizado por cisteínas  $\alpha/\beta$  (CS  $\alpha/\beta$ ) en su dominio C-terminal y en su dominio N-terminal podría estar conformado por una hélice.

#### 2.2.1 Péptidos tipo escorpina.

La contribución de los dos dominios de los péptidos tipo escorpina aún permanece incierta. Algunas toxinas dentro de la familia  $\beta$ -KTx ha sugerido que el dominio N-terminal es indispensable para ejercer

la actividad antimicrobiana. Sin embargo, se ha demostrado que en el caso de la HgeScplp1 (subclase III) que posee actividad citolítica, al remover su N-terminal se ha logrado desenmascarar la actividad contra canales iónicos. También, la AaTXK-beta (subclase I) después de perder el residuo N-terminal se vuelve un potente activador del canal de potasio Kv7, mientras que la fracción completa es inactiva<sup>10</sup>.

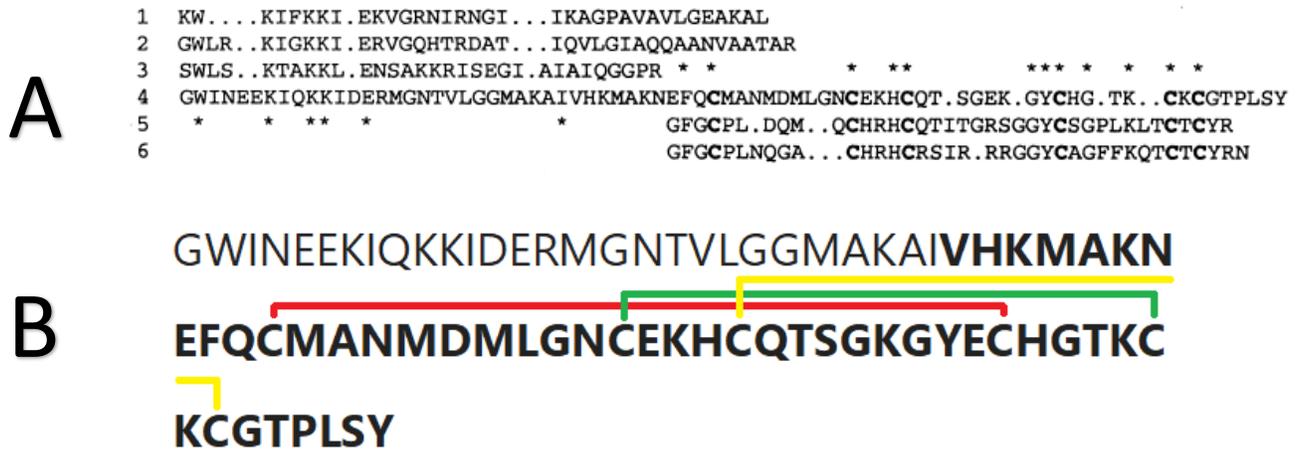


Figura 1. **A.** Comparación de la secuencia primaria de aminoácidos de la escorpina con algunos péptidos antimicrobianos tipo cecropina y defensina. Las secuencias comparadas son: 1. cecropina B, 2. sarcotoxina IC, 3. cecropina P1, 4. escorpina, 5. defensina de *Aeschna cyanea*, 6. defensina del escorpión *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. **B.** Secuencia primaria de la escorpina. Se marca con líneas la posible conectividad de puentes disulfuro que formaría la proteína en su estado oxidado<sup>4</sup>.

### 2.3 Producción de proteínas recombinantes

La ingeniería genética en conjunto con la biología molecular nos ha permitido utilizar la tecnología del DNA recombinante para diseñar diversos sistemas de expresión heteróloga; para esto se requiere de cepas modificadas genéticamente junto con un vector para sobre expresar una proteína y de esta forma obtener mayores rendimientos en comparación su extracción a partir de la fuente natural. La producción de proteínas recombinantes es una herramienta básica para la química estructural de proteínas debido a que puede obtenerse la cantidad suficiente para realizar este tipo de estudios o incluso se pueden generar proteínas marcadas con algún isótopo.

## 2.4 Determinación estructural de proteínas mediante Resonancia Magnética Nuclear

La RMN es una técnica espectroscópica utilizada para la determinación estructural de moléculas, incluso de proteínas. La técnica se basa en que los núcleos poseen una propiedad cuántica llamada espín nuclear y está definido por el número cuántico de espín  $I$ ; si este valor es diferente de cero entonces el núcleo posee un momento angular, es magnéticamente activo y es observable en RMN. Los núcleos de importancia en RMN de proteínas son  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ . Todos ellos tienen un valor de  $I=1/2$ . Cualquiera de estos núcleos al ser sometidos a un campo magnético externo genera dos estados con diferentes niveles energéticos. La diferencia de energía entre estos niveles se describe en la siguiente ecuación<sup>11</sup>:

$$\Delta E = h\nu = \gamma\hbar B_0(1 - \sigma)$$

Donde  $h$  es la constante de Planck,  $\nu$  es la frecuencia,  $\gamma$  es la constante giromagnética del núcleo observado,  $B_0$  es el campo magnético externo y  $\sigma$  la constante de apantallamiento. Esta ecuación, indica que a mayor campo magnético aumenta la sensibilidad del experimento y de igual forma a mayor constante giromagnética, mayor es la sensibilidad del experimento. El  $^1\text{H}$  es el núcleo más sensible porque posee la constante giromagnética más grande.

Cuando se desea realizar estudios estructurales mediante RMN de proteínas, primero es necesario recurrir a los experimentos monodimensionales de  $^1\text{H}$ , el cual muestra la transición de espín de todos los protones de los aminoácidos presentes en la molécula. A pesar de que no se pueden interpretar estos experimentos en proteínas, son de vital importancia porque nos dan información presuntiva acerca del estado de la proteína; si se encuentran los picos dispersos y definidos nos indica que la proteína posee un plegamiento definido. Por lo general, esperamos que las señales de los protones de amida se encuentren entre 6.5 y 10 ppm que se asocian a proteínas plegadas en estado nativo (Figura 2).

Debido a la complejidad de un espectro de proteínas, el traslape de señales que presenta el experimento de  $^1\text{H}$  hace imposible la asignación de señales, por ello, se debe recurrir experimentos multidimensionales. Wüthrich y colaboradores<sup>12</sup> proponen un método sistemático para realizar la asignación de aminoácidos en un espectro de RMN.

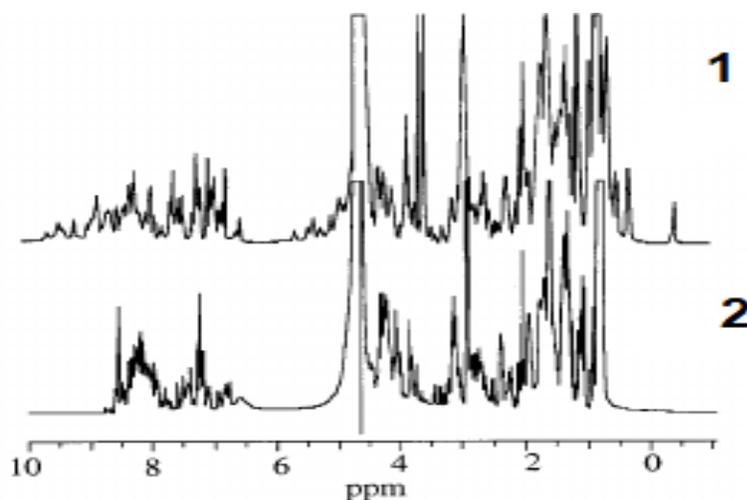


Figura 2. Espectro de protón de una proteína. En 1 se puede observar que en la región de protones de amida (6.5-9 ppm) y en protones alfa (3.5-5.5 ppm) hay señales dispersas y definidas, por lo tanto, se espera que la proteína tenga un plegamiento definido y en 2 es la misma proteína, pero se infiere que no está plegada debido a la poca dispersión de señales en ambas regiones.

Para comenzar con la asignación de espectros bidimensionales primero se realizaron los experimentos COSY y TOCSY, en donde se observan los acoplamientos de tipo escalar o indirecto (J) que transmiten la información a través de los electrones que forman el enlace químico. El COSY nos muestra correlaciones de dos a tres enlaces de distancia y el TOCSY proporciona la información de todos los núcleos que se encuentran formando un sistema de espín; es decir, todos los núcleos que se encuentran acoplados escalaramente de forma continua. Para encontrar el sistema de espín nos podemos apoyar de tablas y aun cuando varios aminoácidos poseen el mismo sistema podemos corroborarlo al realizar la asignación secuencial del siguiente aminoácido con el experimento NOESY, por esta razón para realizar elucidación estructural por esta técnica es requisito indispensable contar con la estructura primaria de la proteína. El experimento NOESY se basa en el acoplamiento dipolar o directo y se observa el efecto nuclear Overhauser. Este efecto es proporcional a la distancia de los núcleos que interactúan, de esta forma nos permite encontrar correlaciones entre dos núcleos cercanos espacialmente a menos de 5 Å de distancia<sup>13</sup>. Con este experimento identificamos las interacciones a corta, mediana y larga distancia, es decir, provee de las restricciones para realizar los cálculos de estructura y se obtiene una estructura afinada con cálculos de dinámica molecular. Cabe mencionar que este es un proceso cíclico, una vez que se tienen las suficientes restricciones se realiza un cálculo, donde se obtiene como resultado 20

estructuras más estables, con base en esto se rectifica si las asignaciones son correctas y se vuelven a buscar más señales NOES que puedan definir la estructura secundaria que se tiene sospecha, hasta que la mayoría del espectro se encuentre asignado. Una vez que todas las estructuras varíen muy poco en el cálculo de dinámica molecular, se dice que hemos logrado obtener la estructura tridimensional<sup>14</sup>.

El método del índice de desplazamiento químico (CSI)<sup>15</sup> nos permite obtener información preliminar acerca de la estructura secundaria y aunque no es absolutamente confiable es útil para realizar un análisis rápido sin la necesidad de métodos computacionales. Se fundamenta en el cambio del desplazamiento químico de los protones alfa de los 20 aminoácidos más comunes dependiendo del tipo de estructura secundaria en el que se encuentre cada aminoácido. El desplazamiento químico observado para un núcleo en particular se compara con ciertos valores de referencia (Tabla 1), se asignan 3 índices -1, 0 ó 1, dependiendo de la variación en el desplazamiento observado, si se encuentra por arriba del intervalo ( $\pm 0.1$ ) se asigna el 1 y si el desplazamiento químico se encuentra por debajo del mismo intervalo se asigna el -1 o el 0 si se encuentra dentro del intervalo de la tabla. Cualquier grupo de tres 1 sin interrupciones corresponde a una hebra beta, para un grupo de cuatro -1 sin interrupciones evidencia hélice alfa, cualquier otro grupo se marca como estructura aleatoria (asas, giros, etc.).

Tabla1. Valores de desplazamiento esperados para los protones- $\alpha$

Residuo	Intervalo de H $\alpha$ (ppm)	Residuo	Intervalo H $\alpha$ (ppm)
<b>A</b>	4.35 $\pm$ 0.1	<b>M</b>	4.52 $\pm$ 0.1
<b>C</b>	4.65 $\pm$ 0.1	<b>N</b>	4.75 $\pm$ 0.1
<b>D</b>	4.76 $\pm$ 0.1	<b>P</b>	4.44 $\pm$ 0.1
<b>E</b>	4.29 $\pm$ 0.1	<b>Q</b>	4.37 $\pm$ 0.1
<b>F</b>	4.66 $\pm$ 0.1	<b>R</b>	4.38 $\pm$ 0.1
<b>G</b>	3.97 $\pm$ 0.1	<b>S</b>	4.50 $\pm$ 0.1
<b>H</b>	4.63 $\pm$ 0.1	<b>T</b>	4.35 $\pm$ 0.1
<b>I</b>	3.95 $\pm$ 0.1	<b>V</b>	3.95 $\pm$ 0.1
<b>K</b>	4.36 $\pm$ 0.1	<b>W</b>	4.70 $\pm$ 0.1
<b>L</b>	4.17 $\pm$ 0.1	<b>Y</b>	4.60 $\pm$ 0.1

### **3. HIPÓTESIS**

El dominio C-terminal de la escorpina posee actividad inhibitoria contra canales iónicos de potasio activados por voltaje, pero el dominio N-terminal asociado a la actividad citolítica provoca interferencia con tal actividad.

### **4. OBJETIVOS**

#### **Generales**

- Medir la actividad inhibitoria de la escorpina y de sus dominios N-terminal (residuos 1-28) y C-terminal (residuos 29-75) sobre el canal kv1.3.
- Determinar la importancia del dominio N-terminal de la escorpina en la actividad antimicrobiana.

#### **Particulares**

- Expresar y purificar la proteína escorpina de forma recombinante en un sistema de expresión heterólogo con el plásmido pET-32a modificado en *Escherichia coli*, así como los dominios N-terminal (residuos 1-28) y C-terminal (residuos 29-75) de la escorpina.
- Caracterizar las proteínas purificadas con las técnicas de MALDI-TOF y Resonancia Magnética Nuclear.
- Realizar pruebas de actividad antiparasitarias en diversas cepas causantes de la enfermedad de Chagas y leishmaniasis.

## 5. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para este proyecto se realizó la biosíntesis de la proteína escorpina recombinante y de sus respectivos dominios. A continuación, se muestran las secuencias primarias de las proteínas producidas:

	1	6	11	16	21	26	31	36	41	46	51	56	61	66	71	
Escorpina	GWINE	EKIQK	KIDER	MGNTV	LGGMA	KAI	VH	KMAKN	EFQCM	ANMDM	LGNC	KHCQT	SGEKG	YCHGT	KCKCG	TPLSY
N-terminal	GWINE	EKIQK	KIDER	MGNTV	LGGMA	KAI										
C-terminal							VH	KMAKN	EFQCM	ANMDM	LGNC	KHCQT	SGEKG	YCHGT	KCKCG	TPLSY

### 5.1 Construcción de los vectores

La compañía GenScrip sintetizó los genes que codifican para la escorpina y su dominio C-terminal con optimización de codones para *Escherichia coli*. Estos genes fueron insertados en el pET32a modificado para obtener la PF (Figura 3).



Figura 3. Proteína de fusión diseñada para la síntesis de las proteínas recombinantes. Se muestra que la PF está conformada por la Tiorredoxina, una etiqueta de histidinas para purificar mediante CAMQ, una secuencia de aminoácidos que permite el corte con la proteasa TEV; esto permite liberar a las dos fracciones anteriores (residuo de corte) y a nuestra proteína de interés.

Para construir el vector que codifica para el dominio N-terminal se realizó en el vector que codifica para la escorpina una mutación del codón para V29 por un codón sin sentido (TAA).

### 5.2 Expresión de la proteína de fusión

Se coloca un preinóculo con medio Luria Bertani o LB (Tryptona 10g/L, Extracto de levadura 5g/L y NaCl 10 g/L) con una colonia transformada a 37 °C por 16 horas con agitación. Se resiembró y se monitorea su crecimiento a una longitud de onda a 600 nm hasta llegar a una densidad óptica de 0.700. En este punto inducimos con IPTG al 0.5 Mm y se expresa a 30 °C durante el tiempo óptimo, previamente determinado para cada proteína.

## **5.2.1 Marcaje isotópico del dominio C-terminal [<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N]**

Primero, se produce la biomasa de *E. coli* cepa Rosetta en medio LB, hasta llegar a una densidad óptica de 0.8 de absorbancia. Se colecta el paquete celular en campana de flujo laminar en tubos para centrifuga estériles y se realiza un lavado con solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

Una vez lavadas las células se centrifugan a 6500 rpm por 10 min y se elimina el sobrenadante en zona estéril. Se resuspenden las células en medio mínimo M9 (D-Glucosa-<sup>13</sup>C6 0.4 g/L y NH<sub>4</sub>Cl-<sup>15</sup>N) en una proporción 1 a 4. Se incuba el medio de cultivo a 37°C durante una hora y se induce la expresión de la proteína con IPTG al 2 mM a 37°C con agitación durante 4 horas.

## **5.3 Lisis celular mediante sonicación**

Se resuspende el paquete celular en una solución amortiguadora de carga para lisis (50 mM TrisHCl, NaCl 300 mM) y la muestra se sónica a 5.5 Hz con 15 segundos de choque sónico y 35 segundos de reposo durante un tiempo efectivo de 8 minutos y se clarificarla muestra con centrifugación.

## **5.4 Purificación de la PF mediante Cromatografía de Afinidad Metal Quelato (CAMQ)**

El clarificado obtenido después de la centrifugación se filtra y se hace pasar por una columna de CAMQ (HisTrap FF. 5mL) previamente equilibrada con el amortiguador de carga para lisis y se eluye la proteína de fusión con un gradiente de imidazol de 20, 50, 100, 200 y 300 mM.

## **5.5 Corte de la proteína de fusión con la proteasa TEV**

Se cuantifica la fracción a cortar y se ajusta a concentración a 1 mg/mL. Se adiciona una proporción de 1 mg de TEV por cada 100 mg de PF, se coloca el contenido anterior en una membrana de celulosa con corte de 500 Da y se mantiene dializando en la disolución amortiguadora de corte para la proteasa TEV (50 mM TrisHCl, 300 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25mM DTT, 5% Glicerol) durante 18 horas a 4°C.

## 5.6 Segunda purificación mediante CAMQ

Se vuelve a realizar otra CAMQ para retener tanto el residuo de corte de la proteína de fusión como la proteasa TEV. En este punto, la fracción no retenida es la que contiene la proteína de interés y la fracción retenida es eluida.

## 5.7 Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia

Antes de iniciar con este paso de purificación la muestra se concentra y desala mediante extracción en fase sólida (strata C18 de phenomenex). La muestra se eluye al 70% de ACN/agua desionizada y se secan las muestras mediante liofilización; se disuelven en 15% de ACN con 0.05% de TFA y se filtran con una membrana con tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  justo antes de inyectar al cromatógrafo. Se utilizó una columna Phenomenex Júpiter Proteo C12, con un tamaño de partícula de 4 $\mu\text{m}$  y poro de 90 Å y como fase móvil se utilizó un gradiente de ACN/Agua optimizado, previamente determinado para cada proteína.

## 5.8 Caracterización por MALDI-TOF

Se determinó la masa molecular mediante espectroscopía de masas MALDI-TOF en un equipo OMNIFLEX de Bruker Daltonics con analizador en modo reflectrón, la ventana espectral fue de 2,500 a 10,000 Da. La muestra se prepara disolviendo la proteína en 15% de ACN con TFA al 0.05% y se hacen diluciones de las respectivas muestras con la matriz  $\alpha$ -cianohidroxicinámico.

## 5.9 Caracterización por RMN

Para obtener los espectros de cada proteína se prepara cada muestra en 3% de agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) / agua desionizada filtrada, se coloca en un tubo para resonancia de 3 mm a una concentración final de al menos 5 mM y se utilizaron los equipos de RMN de 500 MHz Varian UnityPlus y/o 700 MHz Bruker con sonda criogénica. Se utilizó el programa CARGA para la asignación de los espectros, con el software CYANA se realizó el cálculo de estructura y con AMBER se realizó el afinamiento molecular.

### 5.10 Pruebas de actividad antiparasitaria

Se utilizaron epimastigotes de diversas cepas de *Trypanosoma cruzi* y de *Trypanosoma rangeli*, o bien promastigotes de *Leishmania mexicana* y *major*. Fueron cultivadas  $6 \times 10^6$  células a 28°C en presencia o ausencia de las concentraciones 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$  de cada proteína (escorpina, dominio N-terminal y dominio C-terminal) durante 24 horas. Se realizaron lavados y se resuspendieron en 120 microlitros de isopropanol. Las muestras fueron transferidas a una placa suave de 96 pozos (50  $\mu\text{L}$ /pozo) y la absorbancia fue leída a 595 nm con referencia de 655 nm. Los valores de absorbancia fueron interpretados como porcentaje de viabilidad tomando como 100 % el valor obtenido en cada capa en ausencia de proteína.

### 5.11 Pruebas de actividad en canales iónicos regulados por voltaje

Para realizar esta prueba se utilizaron ovocitos de *Xenopus laevis* tratados previamente con 10 ng de ARN<sub>c</sub> para expresar el canal Kv1.3 de humano. Se adicionaron los péptidos escorpina, C-terminal y N-terminal en las concentraciones de 18, 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$  y se empleó como control positivo la toxina CPY-PI1.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Optimización de la expresión de la proteína de fusión

Los geles de la figura 4 muestran las bandas de proteínas separadas mediante electroforesis SDS-PAGE, que incluye los pesos esperados de la escorpina y sus respectivos dominios carboxilo y amino terminal, todas se expresan en fracción soluble. Por lo tanto, es de esperarse que haya rendimientos aceptables al final de la purificación. Como este tipo de toxinas provienen de un organismo eucarionte hace difícil expresarla en un sistema menos complejo como en *Escherichia coli*, por lo que se utilizan algunas estrategias en la expresión para permitir obtener una proteína con plegamiento estable. Por ejemplo, el diseño de la PF con tioredoxina permite que las proteínas con puentes disulfuro se mantengan solubles, evitando la agregación durante su expresión y purificación.

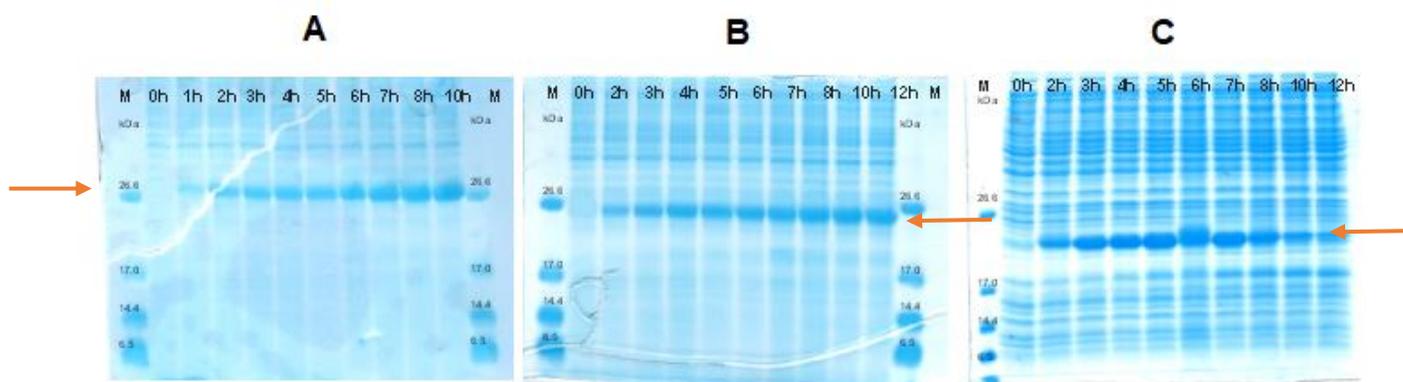


Figura 4. Cinéticas de expresión de las proteínas recombinantes producidas en medio LB. Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 16% con SDS de la fracción soluble o lisado celular. En A se encuentra la expresión de la PF que tiene la escorpina, en B su dominio C-terminal y en C el dominio N-terminal. En todos los casos se utilizó la cepa Rosetta de *E. coli*.

### 6.2 Purificación de las proteínas escorpina, C-terminal y N-terminal.

Se utilizó el mismo método para la purificación de las proteínas, pero con su respectiva optimización de cada una de las técnicas utilizadas. En la figura 5 se muestra un ejemplo del monitoreo de la purificación en una SDS-PAGE. Todo este proceso nos ha permitido generar a la proteína de interés a partir de la PF, además podemos observar en el carril 7 que hemos separado las proteínas que se encontraban en citoplasma, obteniendo a la proteína prácticamente sin contaminantes.

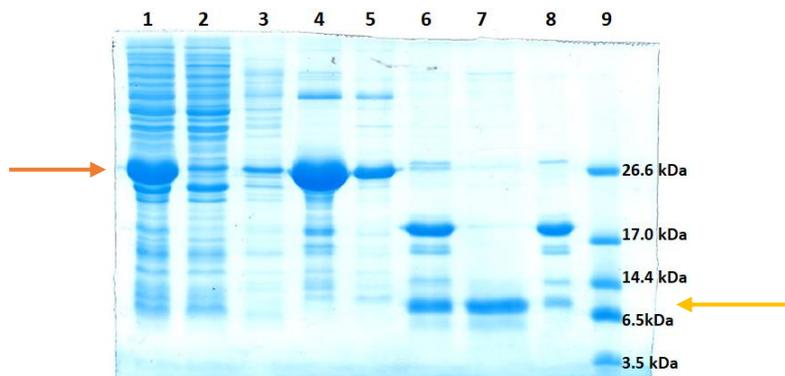


Figura 5. Monitoreo de la purificación de la escorpina mediante SDS-PAGE. **(1)** Se muestra la fracción soluble después de clarificar la muestra, en ella se observan todas las proteínas citoplasmáticas y la sobre expresión de la proteína de interés con una masa molecular de aproximadamente 26 kDa (flecha anaranjada). **(2)** Fracción no retenida por la CAMQ. **(3)** Elución de la proteína con 20 mM de imidazol. **(4)** Elución con 150 mM de imidazol. **(5)** Elución con 200 mM de imidazol. **(6)** Corte de la PF con la proteasa TEV. Se observa que aparece la banda de 8.3 kDa correspondiente a la masa molecular de la escorpina (flecha amarilla) y la banda del residuo de corte (aproximadamente 18 kDa). **(7)** Segunda purificación por CAMQ. En este carril se presenta la fracción no retenida y se observa la aparición de solo la banda correspondiente de la escorpina (flecha amarilla). **(8)** Fracción retenida por la CAMQ. Se presentan las bandas correspondientes al residuo de corte de la proteína de fusión y la proteasa TEV.

### 6.3 Purificación mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia

Una vez que la muestra haya sido retenida en la strata se eliminan los iones y el glicerol que contenía la solución amortiguadora de corte, permitiendo concentrar y desalar a la proteína en cuestión. Los picos más abundantes se colectan después de inyectar las muestras al cromatógrafo con el método, previamente optimizado para cada péptido (Figura 6) y como esta técnica cuenta con un gran poder de separación y discriminación, podemos esperar una única conformación. Finalmente, las fracciones colectadas se liofilizan para su posterior caracterización por masas.

### 6.4 Rendimiento final

En la tabla 2 se muestra el rendimiento que se obtiene por cada proteína recombinante que fue producida en este proyecto. Se consideran aceptables los rendimientos obtenidos.

Tabla 2. Rendimiento de las proteínas recombinantes.

Proteína	Producción de PF (mg/ L de cultivo)	Rendimiento final (mg/ L de cultivo)
Escorpina	85	2.3
C-terminal	83	2.1
N-terminal	90	1.2

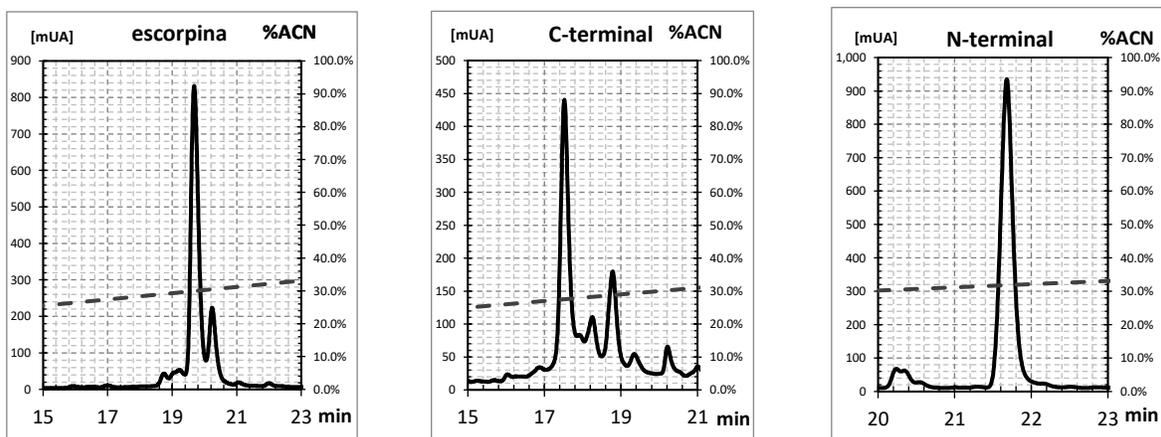


Figura 6. Purificación de las proteínas mediante CLAE. Se muestran los cromatogramas correspondientes a cada proteína purificada, en todos los casos se colectó el pico mayoritario. La línea continua representa la corrida de la proteína, las líneas punteadas son el gradiente de ACN que se utiliza en el método. En todos los casos se leyó a una longitud de onda de 230 nm.

## 6.5 Determinación de la masa molecular por MALDI-TOF

Como se puede observar en la tabla 3, se comparan las masas moleculares esperadas con las experimentales. En todos los casos podemos confirmar la secuencia primaria de cada proteína y en el caso de la escorpina y el C-terminal las seis cisteínas se encuentran en su estado oxidado, formando 3 puentes disulfuro. Además, en los espectros no se observan picos inesperados, por lo tanto, en las fracciones colectadas contamos con la suficiente pureza para realizar tantos estudios estructurales como pruebas de actividad.

Tabla 3. Comparación de los resultados obtenidos por MALDI-TOF con los datos teóricos.

Proteína	Masa molecular teórica oxidada $M+1[H^+]$ (Da)	Masa molecular experimental oxidada $M+1[H^+]$ (Da)
escorpina	8,351.7	8,351.2
N-terminal	3,130.7	3,130.6
C-terminal	5,296.1	5,296.1
C-terminal U [ $^{13}C$ ] [ $^{15}N$ ]	5,578.4	5,510.3

## 6.6 RMN del extremo N-terminal

El dominio N-terminal está desestructurado en agua (figura 7-A) debido a la poca dispersión de señales. Por este motivo se procedió a realizar una titulación con Trifluoro etanol (TFE), este disolvente otorga un ambiente químico no polar y permite que las proteínas adquieran estructura secundaria, esencialmente de  $\alpha$ -hélices.

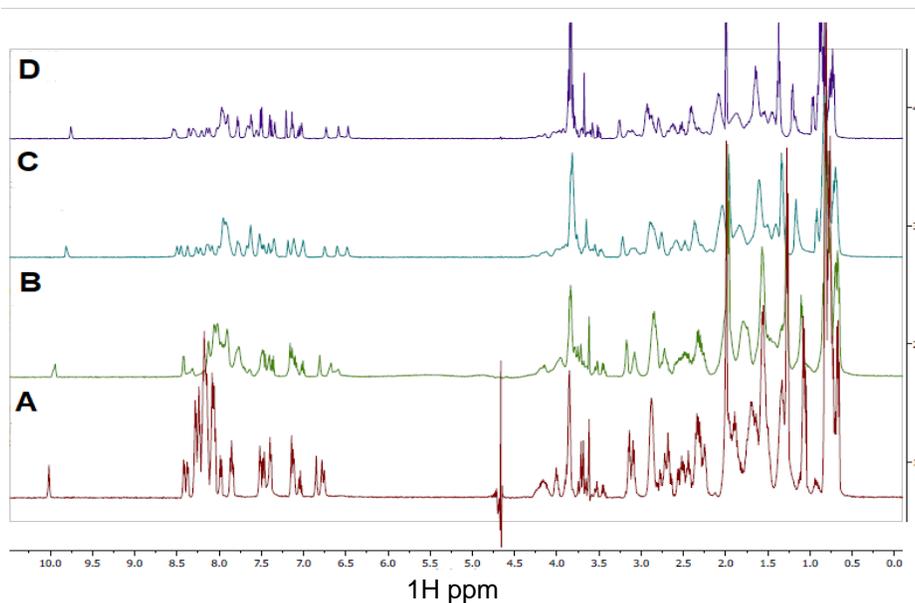


Figura 7. Titulación del dominio N-terminal con TFE. Mediante RMN protónica se monitoreó este experimento, en **A** se observa la proteína sin TFE y se observan señales definidas sin dispersión, en **B** se tiene el espectro al 20 % de TFE y comienza a observarse dispersión, pero sin señales definidas, en **C** la proteína se encuentra al 40 % de TFE y se observan las señales dispersas y definidas, en **D** se adquirió al 50% de TFE y es el que contiene las señales definidas y con mayor dispersión.

Se puede observar en la figura 7 B-D que al aumentar el porcentaje de TFE deuterado, aumenta la dispersión de las señales de los protones de amida (6.5-8.5 ppm); esto nos indica la formación de estructura secundaria. Por este motivo, se adquirieron los experimentos dimensionales al 50 % de TFE.

En la figura 8, se observa el experimento TOCSY con todos los sistemas de espín asignados del dominio N-terminal, en el recuadro rojo se ven las correlaciones HN-H $\alpha$  con una buena dispersión de las señales; esto nos facilita la asignación de la proteína. Además, se pueden observar la cantidad de sistemas de espín como número de aminoácidos que conforma esta proteína. En el recuadro amarillo se observa las

señales correspondientes a la cadena lateral o grupo R; el cual es indispensable para identificar el tipo de aminoácido.

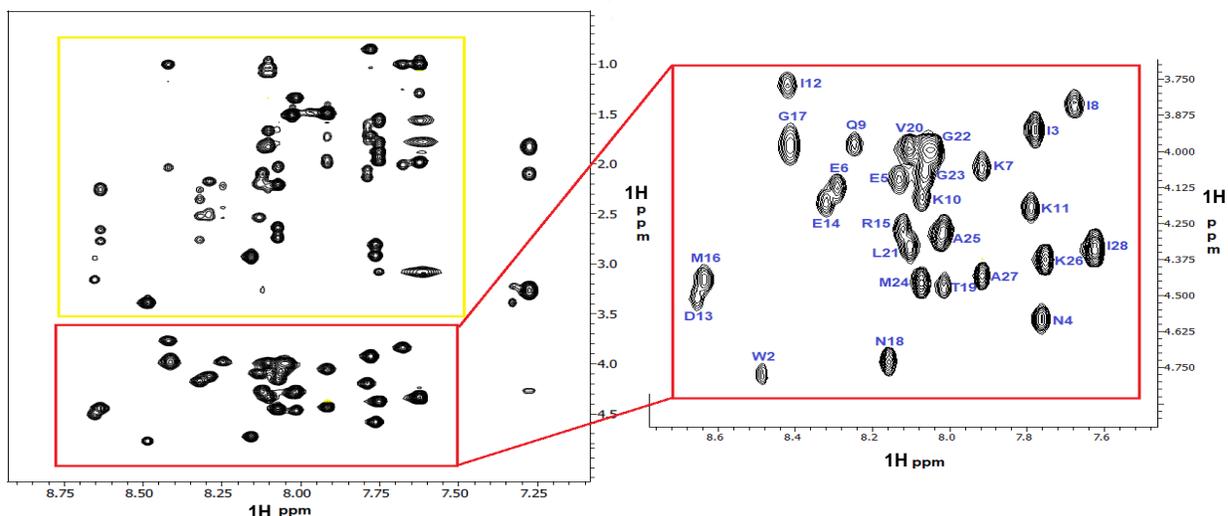


Figura 8. Sistemas de espines asignados en el experimento TOCSY del dominio N-terminal.

Se determinó el índice de desplazamiento químico (CSI) para confirmar el tipo de estructura que esperamos. En la figura 9 se observa que hay 13 aminoácidos consecutivos con el índice -1, por tal motivo se espera que tenga una hélice continua en esta región y en la región del C-terminal indica que se encuentra sin estructura debido a que no hay un patrón continuo que confirme la presencia de estructura secundaria.



Figura 9. Índice de desplazamiento químico del N-terminal. Se observan 13 aminoácidos con un índice consecutivo de -1 e indica la presencia de una hélice continua.

Una vez realizada la asignación de los sistemas de espines en el programa CARA, se procedió a iniciar los cálculos de dinámica molecular con el programa CYANA. Para esto, utilizó el espectro NOESY con 150 ms de tiempo de mezclado para evitar el fenómeno de difusión de espín. Los resultados obtenidos por CYANA indican que se obtuvo un modelo con RMSD de 0.61 Å en el ensamble de las estructuras

obtenidas y un gráfico de Ramachandra con un 71.5% de los ángulos en las regiones principalmente favorecidas y un 28.5% en la región adicionalmente permitida. Cabe mencionar que otro parámetro que se evalúa en RMN de proteínas son las violaciones de distancia, éstas deben ser menores de 0.5 Å y las 20 estructuras obtenidas del dominio N-terminal cumplen con este parámetro.

Una vez evaluado y corregido el modelo que se obtuvo en el software CYANA se procedió a realizar el afinamiento con el programa informático AMBER16 en vacío y en disolvente explícito; esto con el fin de obtener un modelo más cercano a la realidad debido a que las estructuras obtenidas por CYANA tienden a tener niveles energéticos altos. Por lo tanto, con estos últimos cálculos de dinámica molecular se obtiene una estructura con un mínimo de energía potencial mediante ciclos de calentamiento y enfriamiento de las estructuras. Además, se realizó una simulación con moléculas de disolvente y de esta forma se obtuvo la estructura afinada (figura 10).



Figura 10. Estructura tridimensional del dominio N-terminal de la escorpina. Como era de esperarse se observa una hélice al estar disuelta esta proteína al 50% de TFE.

### 6.7 RMN del extremo C-terminal.

Primero se realizó un experimento monodimensional de  $^1\text{H}$  para evaluar el plegamiento de este dominio disuelto en agua (Figura 11-1), se observaron señales definidas en los protones de amida (6.5 ppm-9ppm) pero con una baja dispersión. Al realizarse los experimentos bidimensionales se observaron muchas regiones traslapadas en los sistemas de espín, además de una cantidad baja de señales en el experimento NOESY (no mostrado); esto nos indica un bajo porcentaje de estructura secundaria debido al poco contacto espacial entre los átomos de protón. Por tal motivo, se procedió a encontrar otras condiciones de disolvente para obtener una mejor dispersión de señales y se determinó que al adicionar PBS 10 mM

a un pH de 7.04 con 300 mM de NaCl se obtiene mejor dispersión (figura 11-2) en comparación de la misma proteína disuelta solo en agua (figura 11-1). Sin embargo, después de repetir los experimentos bidimensionales con las nuevas condiciones de disolvente en un equipo de RMN de 700 MHz con sonda criogénica, continuaba observándose una región con un gran número de señales traslapadas (figura 12). Esto imposibilitó que se lograra una correcta asignación de varios sistemas de espín, pero se lograron observar señales NOE características de láminas beta, como HN-H $\alpha$  y H $\alpha$ -H $\alpha$  (figura 13), esto indica que podríamos estar obteniendo el plegamiento esperado (CS  $\alpha/\beta$ ) en el dominio C-terminal de acuerdo con la clasificación de toxinas de veneno de escorpión al cual pertenece la escorpina.

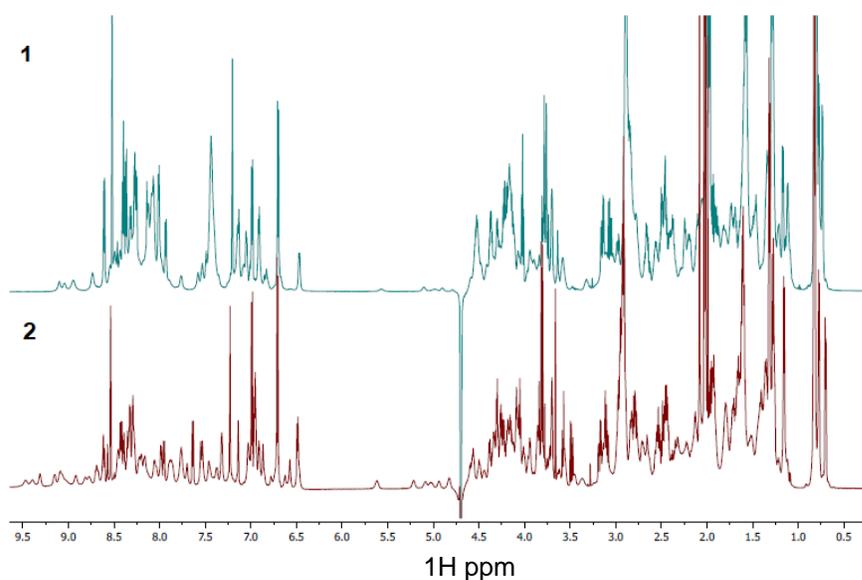


Figura 11. Espectros de RMN protónica del C-terminal. En **1** se adquirió el espectro solo al 3% de D<sub>2</sub>O y en **2** se adicionó PBS al 10 mM, pH 7.04 con 300 mM de NaCl. Se observa una mejora en la dispersión de señales en los NH, en los aromáticos e incluso en los H $\alpha$ .

Para lograr adquirir la estructura tridimensional del dominio C-terminal se requiere un marcaje isotópico y adquirir experimentos en tres dimensiones como 15N TOCSY-HSQC y 15N NOESY-HSQC o experimentos de triple resonancia bajo las condiciones que se definieron anteriormente. Para realizar marcaje isotópico de proteínas se requiere de expresar en medio mínimo como fuente de carbono a la glucosa y sulfato de amonio marcado. Sin embargo, después de haber realizado varias pruebas de expresión no se logró una adecuada producción de la proteína debido a que el rendimiento final fue muy bajo y no se obtuvo la suficiente cantidad para obtener los experimentos en tres dimensiones.

### 6.8 Pruebas preliminares de actividad contra parásitos.

En colaboración con la doctora Bertha Espinoza del IIB se lograron realizar las pruebas antiparasitarias. Al concluir el tiempo de incubación de los cultivos en presencia de la escorpina, el dominio N-terminal y el dominio C-terminal, los epimastigotes de las diversas cepas de *Tripanozoma cruzi* y *Tripanozoma rangeli*, o bien los promastigotes de *Leishmania mexicana* y *major* fueron observados al microscopio y no se observaron cambios en la movilidad o en la morfología de los distintos parásitos. El efecto sobre la reducción de viabilidad solo fue evidente sobre *T. rangeli* entre el 17 y 20 % con el compuesto C-terminal a las 24 horas y después de 48 horas el efecto se pierde (Figura 14-A). Las demás proteínas tuvieron un efecto sobre los tripanosomátidos igual o menor al 15% y fue considerado como no significativo (Figura 14-B). Para validar el ensayo se utilizó como control positivo agua oxigenada en *T. cruzi* cepa Qro. Los resultados indican que la actividad que lleva a cabo el dominio C-terminal sobre *T. rangeli* no es de tipo citolítica debido a que hay una recuperación en la viabilidad y porque no se observan cambios morfológicos del parásito en el microscopio.

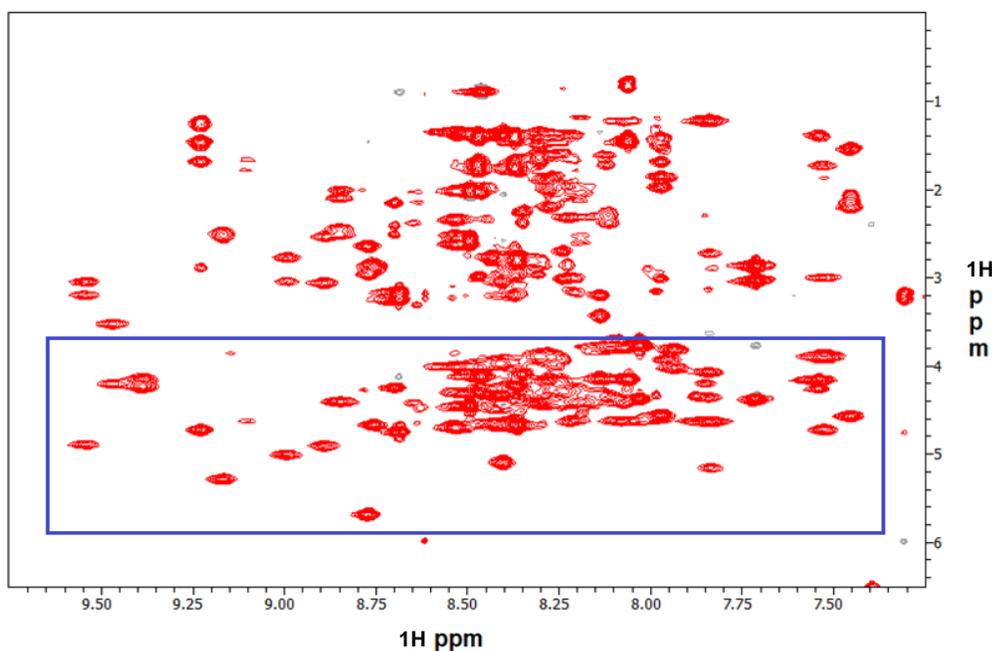


Figura 12. Experimento TOCSY con 80 ms de tiempo de mezclado del dominio C-terminal. Se puede observar que en la región de las correlaciones HN-H $\alpha$  (recuadro azul) hay una región con alto traslape entre 8.1 y 8.5 ppm, esto imposibilitó la asignación de los sistemas de espín.

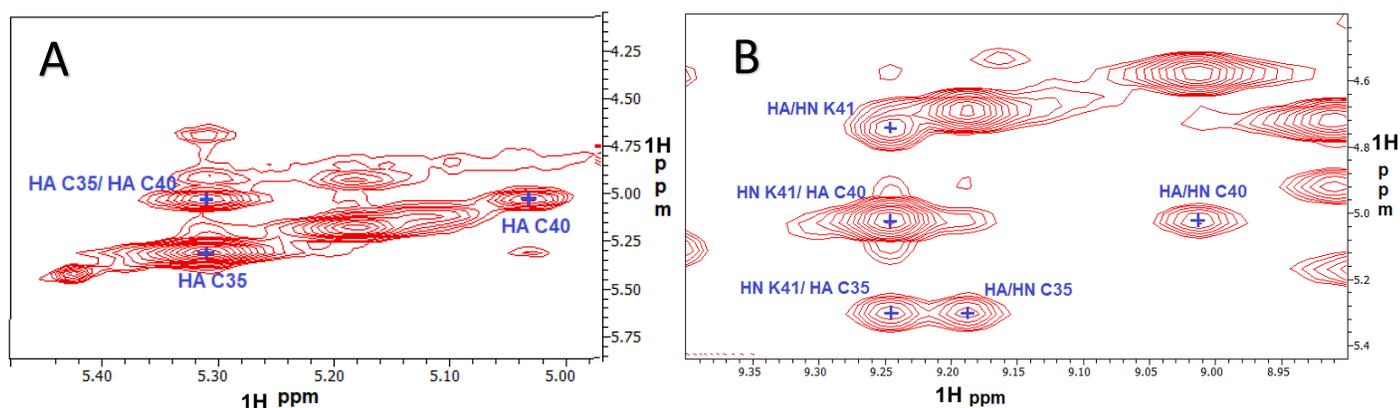


Figura 13. Señales NOE pertenecientes a láminas beta. En A se puede observar una correlación entre los protones alfa de los aminoácidos cisteína C35 y C40, en B se observa el NOE secuencial de la K41 con el aminoácido C40 y otra correlación entre el protón de amida del K41 con el protón alfa del C35. Las señales que se presentan indican la presencia de lámina beta, por lo tanto, es muy probable que se haya obtenido el motivo estructural esperado en el dominio C-terminal.

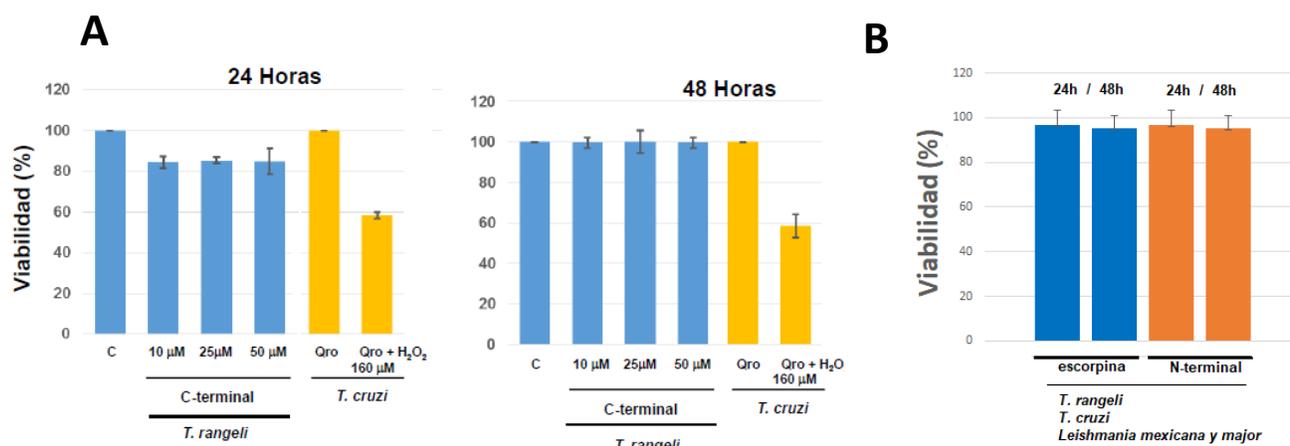


Figura 14. Efecto de la escorpina y de sus dominios N-terminal y C-terminal sobre diversos parásitos. En A se puede observar que después de las 24 hay una inhibición, pero a las 48 horas el parásito recupera la viabilidad por lo que este péptido posee un efecto estático. En B se observa que la escorpina y el dominio N-terminal no tienen efecto en la reducción de la viabilidad en los parásitos utilizados.

### 6.9 Pruebas de actividad en el canal iónico Kv1.3.

Se realizó esta prueba de actividad con apoyo de la doctora Elisa Carrillo del IFC de la UNAM, con el fin de revelar la actividad contra canales iónicos de potasio que posee la escorpina en su dominio C-terminal. Para validar el estudio, se evaluó la escorpina y su dominio N-terminal y como era de esperarse, estas proteínas tienen actividad citolítica en ovocitos, esto hace imposible medir una señal asociada al canal en estudio. Por esta razón, además de utilizarse las concentraciones de la tabla 4, se realizaron diluciones hasta dejar de presentar actividad citolítica e incluso a concentraciones bajas tampoco se observó inhibición del canal Kv1.3 con la escorpina o en su dominio N-terminal.

Sin embargo, el dominio C-terminal logró reducir en 65% la respuesta del potencial eléctrico debido al bloqueo del canal Kv<sub>1.3</sub> de humano (tabla 5), puesto que se redujo la actividad citolítica con la presencia del dominio N-terminal. Cabe mencionar que solo se ha evaluado el dominio C-terminal en el canal Kv1.3, aun no se cuenta con la información necesaria para determinar si esta proteína tiene actividad específica sobre este canal o con otros canales de potasio dependientes de voltaje.

El canal Kv1.3 es de importancia médica porque se ha reportado que se encuentra presente en varios tipos de tumores debido a que promueve la proliferación celular e inhibe la apoptosis. En el 2013 se logró suprimir de forma significativa la proliferación celular y se activó el sistema de CASPASAS-3/7 (apoptosis) en células de osteosarcoma al realizar un knockdown del gen que codifica para este canal<sup>16</sup>. Además, el canal Kv<sub>1.3</sub> se ha propuesto como diana para el tratamiento en ciertas enfermedades autoinmunes porque al ser bloqueado genera un mecanismo inmunoregulatorio en linfocitos T<sup>17</sup>. Como se ha mencionado, encontrar un ligando que permita bloquear este canal nos podría permitir entender los mecanismos moleculares del cáncer o incluso poder curar enfermedades cardiovasculares de origen autoinmune.

Tabla 4. Actividad inhibitoria en canal Kv<sub>1.3</sub> de la escorpina

<i>Proteína</i>	Concentración (µM)	Actividad
<b><i>Escorpina</i></b>	<b>200, 100, 50</b>	<b>Citolítica en ovocitos</b>
<b><i>Dominio N-terminal</i></b>	<b>200, 100, 50</b>	<b>Citolítica en ovocitos</b>
<b><i>Dominio C-terminal</i></b>	<b>200, 100, 50 y 18</b>	<b>Citolítica en ovocitos</b>
<b><i>Dominio C-terminal</i></b>	<b>10</b>	<b>Inhibe 65% del potencial eléctrico</b>

### **7. CONCLUSIONES**

- El dominio N-terminal de la escorpina parece ser el determinante estructural relevante para explicar la actividad citolítica de la escorpina.
- El dominio C-terminal tuvo un efecto estático dentro de las primeras 24 horas en el parásito *Trypanosoma rangeli*. Al no estar presente el dominio N-terminal, posiblemente, el efecto estático que generó el dominio C-terminal pudiera estar mediado a través del bloqueo de canales de potasio.

### **8. PERSPECTIVAS**

- Determinar si la actividad del dominio C-terminal posee actividad con otros canales de potasio dependientes de voltaje.

## 9. REFERENCIAS

1. Harrison, P. L., Abdel-rahman, M. A., Miller, K. & Strong, P. N. Toxicon Antimicrobial peptides from scorpion venoms. *Toxicon* **88**, 115–137 (2014).
2. Patel, S. & Akhtar, N. Biomedicine & Pharmacotherapy Antimicrobial peptides ( AMPs ): The quintessential offense and defense ' molecules are more than antimicrobials. *Biomed. Pharmacother.* **95**, 1276–1283 (2017).
3. Fuente-núñez, C. De, Silva, O. N., Lu, T. K. & Luiz, O. Pharmacology & Therapeutics Antimicrobial peptides : Role in human disease and potential as immunotherapies. **178**, 132–140 (2017).
4. Conde, R., Zamudio, F. Z., Rodr, M. H. & Possani, L. D. Scorpine , an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Lett.* **471**, 165–168 (2001).
5. Carballar-Lejarazú, R. *et al.* Recombinant scorpine: A multifunctional antimicrobial peptide with activity against different pathogens. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 3081–3092 (2008).
6. Possani, L. D., Corona, M., Zurita, M. & Rodríguez, M. H. From noxiustoxin to scorpine and possible transgenic mosquitoes resistant to malaria. *Arch. Med. Res.* **33**, 398–404 (2002).
7. Zeng, X. *et al.* Peptides Three new antimicrobial peptides from the scorpion *Pandinus imperator*. *Peptides* **45**, 28–34 (2013).
8. Al-Asmari, A. K., Alamri, M. A., Almasoudi, A. S., Abbasmanthiri, R. & Mahfoud, M. Evaluation of the in vitro antimicrobial activity of selected Saudi scorpion venoms tested against multidrug-resistant micro-organisms. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **10**, 14–18 (2017).
9. Sharma, H. & Nagaraj, R. *Structure-activity relationships in the host-defense antimicrobial peptides defensins*. *Studies in Natural Products Chemistry* **46**, (Elsevier B.V., 2015).
10. Flores-Solis, D. *et al.* Solution structure and antiparasitic activity of scorpine-like peptides from *Hoffmanniadrurus gertschi*. *FEBS Lett.* **590**, 2286–2296 (2016).
11. Keeler, J. Spectroscopy. Understanding NMR spectroscopy (2002), University of Cambridge, Department of chemistry
12. Würz, J. M., Kazemi, S., Schmidt, E., Bagaria, A. & Güntert, P. NMR-based automated protein structure determination. *Arch. Biochem. Biophys.* **628**, 24–32 (2017).
13. Güntert, P. & Buchner, L. Combined automated NOE assignment and structure calculation with CYANA. *J. Biomol. NMR* **62**, 453–471 (2015).
14. Universidad de Sevilla. Resonancia Magnética Nuclear. **XXVII**, 65–83 (2018).
15. Wishart, D. S., Sykes, B. D. & Richards, F. M. Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure. *J. Mol. Biol.* **222**, 311–333 (1991).
16. Wu, J. *et al.* Voltage-gated potassium channel Kv1.3 is highly expressed in human osteosarcoma and promotes osteosarcoma growth. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 19245–19256 (2013).
17. Zhao, N. *et al.* Lovastatin blocks Kv1.3 channel in human T cells : a new mechanism to explain its immunomodulatory properties. *Nat. Publ. Gr.* (2015). doi:10.1038/srep17381