



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

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

**ESTUDIO DE PROTEÍNAS CON INTERÉS BIOLÓGICO Y SU DETERMINACIÓN  
ESTRUCTURAL POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR EN DISOLUCIÓN.**

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. ANDREA ESTEFANÍA LÓPEZ GIRALDO

TUTOR: DR. JOSÉ FEDERICO DEL RÍO PORTILLA  
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO DE 2022



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**

**ESTUDIO DE PROTEÍNAS CON INTERÉS BIOLÓGICO Y SU DETERMINACIÓN  
ESTRUCTURAL POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR EN DISOLUCIÓN**

**T E S I S  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**M. en C. ANDREA ESTEFANÍA LÓPEZ GIRALDO**

**TUTOR: DR. JOSÉ FEDERICO DEL RÍO PORTILLA  
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM**



Ciudad de México, 2022.

## **Dedicatorias**

*A mi abuela Blanca Ligia Cardona, A mi padre José David López, A mi madre Patricia Giraldo, A mi hermana Alexandra Perilla*

## Agradecimientos

Son muchas las personas y entidades involucradas en el desarrollo de cada uno de los proyectos desarrollados en mi doctorado y quiero agradecer inmensamente a cada uno de ellos. Inicialmente quiero agradecer a cada uno de los miembros de mi jurado por su participación y esfuerzo en este proceso.

### Miembros del jurado

Presidente	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Alejandra Hernández Santoyo	Instituto de Química, UNAM
Vocal	Dra. Karina Martínez Mayorga	Instituto de Química, UNAM
Vocal	Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga	Universidad Autónoma de Ciudad de México
Secretario	Dr. Luis Fernando Olguín Contreras	Facultad de Química, UNAM

Agradezco a cada uno de los miembros de mi comité tutor que formaron parte importante en este proceso del doctorado, pues siempre estuvo presente su apoyo, guía y motivación para concluir el doctorado de manera exitosa.

### Comité tutor

Dra. Nuria Esturau Escofet	Instituto de Química, UNAM
Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda	Facultad de Química, UNAM

Agradezco al **Dr. Federico del Río Portilla** por su apoyo incondicional, por los conocimientos compartidos, por la motivación día tras día y por guiarme en este camino de la ciencia que tanto me apasiona. Agradezco inmensamente a él porque aportó muchísimo tanto en mi formación académica, como humana.

Agradezco al Dr. Enrique Romo Arévalo de la Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud por permitirme el uso de su FPLC.

Agradezco a la Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig por sus importantes consejos en la purificación de proteínas y por permitirme utilizar su FPLC para el desarrollo de mi trabajo.

Los proyectos de investigación desarrollados en mi doctorado fueron posibles gracias al apoyo económico otorgado por:

- El consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT):
  - Beca de doctorado 766250
- Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM):
  - Proyecto PAPIIT IN210319
- Supercómputo de la Universidad Nacional Autónoma de México
  - Proyecto LANCAD-UNAM-DGTIC-145

## Lugar de trabajo, publicaciones y presentaciones en congresos

Este proyecto fue desarrollado bajo la supervisión del Dr. Federico del Río Portilla en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México en los siguientes laboratorios:

1. Laboratorio 1 dentro del departamento de Química de Biomacromoléculas.
2. Laboratorio de Biología Molecular del departamento de Química de Biomacromoléculas.  
Responsable: Dra. Patricia Cano
3. Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear UNAM.  
Responsable: Dra. Nuria Esturau Escofet
4. Laboratorio de ITC del Dr. Enrique García, departamento de Química de Biomacromoléculas, UNAM.

También fue desarrollado en los siguientes laboratorios:

1. Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, México, México.  
Laboratorio de la Dra. Eliza Azuara.
2. Laboratorio 1 de la Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud.

Los resultados del capítulo 2 fueron publicados como (anexo 5):

López-Giraldo, A. E. *et al.* (2020) *The three-dimensional structure of the toxic peptide Cl13 from the scorpion *Centruroides limpidus**, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 184(June), pp. 158–166. doi: 10.1016/j.toxicon.2020.06.011.

Los resultados del capítulo 3 se encuentran en proceso de publicación como:

*“Structural and Functional Studies Reveal the Presence of Two Different Activities for Scorpine: One Blocking Channel Activity and One Cytolytic Activity”*

Estefanía López-Giraldo, Elisa Carrillo, Gustavo Titau Delgado, Patricia Cano-Sánchez, Alland Colorado, Lourival Possani-Postay and Federico del Río-Portilla

Los resultados del capítulo 4 están en proceso de publicación como:

*“Beta-KTx14.3, a large scorpion toxin, blocks the human potassium channel KCNQ1”*

Gustavo Titau-Delgado\*, Andrea Estefanía Lopez-Giraldo\*, Elisa Carrillo, Luis Fernando Cofas-Vargas, Luis Enrique Carranza, Estuardo López-Vera, Enrique García-Hernández and Federico del Rio-Portilla.

*\*Ambos como primer autor*

Los resultados experimentales incluidos en este trabajo fueron presentados en las siguientes conferencias:

- Internacional

62th Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference, Virtual. “The Three-Dimensional Structure of the Neurotoxin SCNTX”. **López-Giraldo A. E.**, De-la-Rosa G. and del Rio-Portilla F. March 29 - 31, 2021.

- Nacional

- Simposio Interno Anual del Instituto de Química UNAM, CDMX (2016-2020)
- Conferencias anuales de Resonancia Magnética Nuclear Experimental MEX (2016-2020)

## RESUMEN

El siguiente escrito incluye los resultados más relevantes obtenidos durante el desarrollo de mis estudios de doctorado, los cuales involucran el estudio de diversas proteínas con relevancia biológica, empleando principalmente resonancia magnética nuclear.

Inicialmente se presenta la caracterización estructural de la toxina Cl13 proveniente del alacrán *Centruroides limpidus*; la cual fue aislada directamente del veneno del alacrán, se observó que presenta un motivo estructural  $\alpha/\beta$  estabilizado por cisteínas comúnmente encontrado en las toxinas-beta bloqueadoras de canales de sodio. También se encontraron ciertos aminoácidos, los cuales podrían ser responsables de la falta de eficiencia de los anticuerpos protectores de cadena sencilla para la neutralización total de toxinas del veneno *Centruroides limpidus*. Este proyecto se encuentra publicado en López-Giraldo, A. E. *et al.* (2020) 'The three-dimensional structure of the toxic peptide Cl13 from the scorpion *Centruroides limpidus*', *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 184(June), pp. 158–166. doi: 10.1016/j.toxicon.2020.06.011.

También se presenta la caracterización estructural mediante resonancia magnética nuclear de los dominios N-terminal y C-terminal de la escorpina proveniente del alacrán *Pandinus imperator*. Los dominios fueron obtenidos de manera recombinante. Se observó que el dominio C-terminal presenta un motivo estructural  $\alpha/\beta$  estabilizado por cisteínas (CS- $\alpha/\beta$ ), mientras que, el dominio N-terminal presenta hélice- $\alpha$  en presencia de 50% de TFE. Además, se determinaron posibles bases estructurales de la interacción con las membranas de las células cargadas negativamente. De este proyecto se encuentra un manuscrito sometido en la revista *Frontiers in Pharmacology*, ver anexo 4.

Adicional a esto fue posible realizar la caracterización estructural de la toxina TcoKIK proveniente del alacrán *Tityus costatus*. Esta toxina fue obtenida de manera recombinante y caracterizada mediante resonancia magnética nuclear. La estructura tridimensional de TcoKIK mostró en la región C-terminal el motivo estructural CS  $\alpha/\beta$  convencional para las toxinas  $\beta$ , mientras que la región del N-terminal se encuentra desestructurada. Cabe mencionar que, no existe información estructural o de función biológica reportada para esta toxina actualmente. Este artículo se encuentra enviado al *Biophysical Journal* como Beta-KTx14.3, a scorpion toxin, blocks the human potassium channel KCNQ1.

Otra proteína de interés biológico estudiada en este trabajo fue la neurotoxina SCNTX, para la cual fue necesario obtener la toxina marcada isotópicamente con  $^{15}\text{N}$  y  $^{13}\text{C}$ . Se realizó la caracterización estructural de la neurotoxina SCNTX empleando experimentos de resonancia magnética nuclear 2D y 3D, se observó que la arginina 47 se encuentra expuesta al disolvente y podría ser un residuo clave en la interacción con el receptor nAChR. Este

proyecto fue desarrollado en colaboración con el Dr. Gerardo Corzo Burguete del Instituto de Biotecnología de la UNAM y el Dr. Guillermo de la Rosa de la Universidad de Toronto.

Por último, se estudiaron los diferentes dominios presentes en el factor de transcripción A-MYB de humano. Se optimizaron las condiciones de expresión y purificación para cada uno de los dominios en estudio. Y se determinó que todos los dominios se encuentran plegados y a su vez presentan un plegamiento activo debido a que interactúan con su blanco correspondiente.

De esta manera fue posible involucrar en este proyecto diversas proteínas con actividades biológicas como citolítica, neurotóxica, bloqueadora de canales y transcripcional. Para el estudio de ellas se empleó una amplia variedad de herramientas cromatográficas, fisicoquímicas, espectroscópicas y computacionales; las cuales nos permitieron obtener información estructural y funcional para cada una de ellas, tal como se desarrolla en el presente documento.



# Contenido

<b>Agradecimientos</b> .....	III
<b>Lugar de trabajo, publicaciones y presentaciones en congresos</b> .....	V
<b>RESUMEN</b> .....	VI
<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</b> .....	X
<b>CAPITULO 1</b> .....	11
1. 1 INTRODUCCIÓN .....	11
1.2 Diseño experimental capítulos 2, 3, 4, 5 .....	12
1.2.1 Clonación de los péptidos .....	13
1.2.2 Obtención y purificación de los péptidos .....	13
1.2.3 Espectrometría de masas .....	14
1.2.4 Resonancia magnética nuclear .....	14
1.2.5 Cálculo estructural .....	15
1.3 Diseño experimental capítulo 6.....	16
1.3.1 Clonación de los péptidos .....	17
1.3.2 Expresión y purificación de los péptidos.....	17
1.3.3 Determinación estructural por dicroísmo circular (DC) .....	19
1.3.4 EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) .....	19
1.3.5 Caracterización preliminar mediante ITC (Isothermal titration calorimetry) y termoforesis .....	19
1.3.6 Caracterización estructural por resonancia magnética nuclear 1D .....	20
1.3.7 Caracterización por espectrometría de masas.....	20
<b>CAPITULO 2 Estructura tridimensional del péptido tóxico Cl13 del alacrán <i>Centruroides limpidus</i>.</b> ....	21
2.1 INTRODUCCIÓN .....	21
2.2 HIPÓTESIS .....	22
2.3 OBJETIVOS .....	22
2.3.1 OBJETIVO GENERAL .....	22
2.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	22
2.5 CONCLUSIÓN .....	33
<b>CAPITULO 3. Caracterización estructural mediante resonancia magnética nuclear del extremo N-terminal y C-terminal de la escorpina proveniente del alacrán <i>Pandinus imperator</i>.</b> .....	33
3.1 INTRODUCCIÓN .....	33
3.2 HIPÓTESIS .....	34
3.3 OBJETIVOS .....	35
3.3.1 OBJETIVO GENERAL .....	35

3.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
3.4 CONCLUSIÓN .....	45
<b>CAPITULO 4. Expresión, purificación y caracterización estructural de la toxina TcoKIK.</b> .....	<b>46</b>
4.1 INTRODUCCIÓN.....	46
4.2 HIPÓTESIS.....	46
4.3 OBJETIVOS .....	46
4.3.1 OBJETIVO GENERAL .....	46
4.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
4.5 CONCLUSIÓN .....	51
<b>CAPITULO 5. Colaboración: Estructura tridimensional de la neurotoxina SCNTX</b> .....	<b>53</b>
5.1 INTRODUCCIÓN.....	53
5.2 HIPÓTESIS.....	53
5.3 OBJETIVOS .....	53
5.3.1 OBJETIVO GENERAL .....	53
5.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
5.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
5.5 CONCLUSIÓN .....	58
<b>CAPITULO 6. Caracterización molecular de las interacciones del factor transcripcional A-MYB de humano con sus blancos CBP Y ADN</b> .....	<b>58</b>
6.2 HIPÓTESIS.....	61
6.3 OBJETIVOS .....	61
6.3.1 OBJETIVO GENERAL .....	61
6.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	61
6.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
6.5 CONCLUSIONES .....	70
<b>7 BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>70</b>
<b>8 ANEXOS</b> .....	<b>79</b>

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Abreviaturas	Significado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BL	Amortiguador de lisis
$^{13}\text{C}$	Carbono trece
CAMQ	Cromatografía de afinidad metal quelato
COSY	Correlated spectroscopy (Espectroscopia de correlación)
CS- $\alpha/\beta$	Cysteine Stabilized alpha-beta motif (Motivo alfa sobre beta estabilizado por cisteínas)
DC	Dicroísmo circular
DPFGCE	Double Pulsed Field Gradient Spin Echo (Eco de giro de gradiente de campo pulsado Doble)
EM	Espectrometría de masas
$^1\text{H}$	Hidrógeno
H $\alpha$	Protón alfa de un aminoácido.
H $\beta$	Protón beta en la cadena lateral de un aminoácido.
H $\text{N}$	Protón de amida en la cadena principal de un aminoácido.
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía de líquidos de alta eficiencia)
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
KTx	Toxina bloqueadora de canales iónicos de potasio.
LB	Luria Bertani
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time of Flight Desorción/ionización de matriz asistida por láser/ Tiempo de vuelo
MHZ	Mega Hertz

NOE	Nuclear overhauser effect (Efecto nuclear overhauser)
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy (Espectroscopía del efecto Nuclear overhauser)
<sup>15</sup> N	Nitrógeno quince
ppm	partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMSD	Root Mean Square Deviation (Desviación cuadrática media)
TFA	Ácido trifluoroacetic
TOCSY	Total correlated spectroscopy (Espectroscopía de correlación total)

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Espectros de RMN de Cl13 .....	23
<b>Figura 2.</b> A) Estructura de menor energía obtenida para la Cl13 mediante RMN en solución B) Sobreposición de las 20 estructuras de menor energía obtenidas para la Cl13. ....	24
<b>Figura 3.</b> NOEs utilizados en el cálculo estructural de la toxina Cl13.....	25
<b>Figura 4.</b> Sobreposición de la estructura tridimensional de la Cl13 con y sin restricciones de enlace disulfuro. ....	26
<b>Figura 5.</b> Región Hβ-Hβ de la correlación de enlace disulfuro entre Cys29-Cys48 en el espectro NOESY 2D de la Cl13 .....	27
<b>Figura 6.</b> Comparación estructural entre Cn2 (rosa), Css2 (verde) y Cl13 (azul) en donde se puede observar que todas las toxinas tienen estructura similar .....	27
<b>Figura 7.</b> A) Alineación de secuencia de las toxinas beta Cl13, Cn2, Css2, Cl11, Cl12 y CsEv2. B) Alineamiento secuencial de la Cn2 y Cl13 se resaltan los aminoácidos reconocidos en la Cn2 por scFv LR.....	29
<b>Figura 8.</b> Las superficies de hidrofobicidad para A) Cl13, B) Css2 and C) Cn2.....	30
<b>Figura 9.</b> Espectros de masas MALDI-TOF obtenidos para A. C-escorpina y B. N-escorpina .....	36
<b>Figura 10.</b> Espectros de RMN de C-escorpina .....	38
<b>Figura 11.</b> Estructura de menor energía obtenida para la A) C-escorpina y C) N-escorpina. Sobreposición de las 20 estructuras de menor energía obtenidas para la B) C-escorpina y D) N-escorpina.....	40
<b>Figura 12.</b> NOE's utilizados para el cálculo estructural. A) C-escorpina y B) N-escorpina.....	41
<b>Figura 13.</b> Sobreposición de las estructuras obtenidas de cálculos con (morado) y sin restricción de enlaces disulfuro (azul).....	41

<b>Figura 14.</b> Región H $\beta$ -H $\beta$ del espectro 2D NOESY de la correlación del enlace disulfuro Cys42-Cys26 obtenida para el experimento de C-escorpina.....	42
<b>Figura 15.</b> Estructura N-terminal de la escorpina. A) Diagrama de cinta de la estructura menor energía de la N-escorpina. B) Superficie hidrofóbica de la N-escorpina. C) Amplificación de la zona con las lisinas expuestas.....	44
<b>Figura 16.</b> Espectro de masas MALDI-TOF de la toxina TcoKIK.....	47
<b>Figura 17.</b> Espectros de RMN de TcoKIK. ....	49
<b>Figura 18.</b> A) Estructura de menor energía obtenida para la TcoKIK B) Sobreposición de las 20 estructuras de menor energía obtenidas para la TcoKIK. ....	50
<b>Figura 19.</b> NOEs utilizados en los cálculos de la estructura tridimensional.....	54
<b>Figura 20.</b> Estructura de menor energía obtenida para SCNTX en solución. ....	55
<b>Figura 21.</b> Sobreposición de las 20 estructuras de menor energía obtenidas para SCNTX. ....	56
<b>Figura 22.</b> Región H $\beta$ -H $\beta$ de la correlación de enlaces disulfuro para SCNTX para A) Cys19-Cys38, B) Cys69-Cys74, C) Cys55-Cys33 y D) Cys57-Cys68.....	57
<b>Figura 23.</b> Estructura tridimensional de la SCNTX .....	58
<b>Figura 24.</b> Espectro de masas MALDI-TOF del dominio KIX.....	63
<b>Figura 25.</b> Espectros de dicroísmo circular obtenidos para; el dominio R3.....	64
<b>Figura 26.</b> Espectro de dicroísmo circular obtenido para el dominio KIX de la proteína CBP .....	65
<b>Figura 27.</b> Curva de desplegamiento de KIX monitoreada a 208 nm empleando DC.....	65
<b>Figura 28.</b> Ensayos de movilidad electroforética de COM, R2 y R3 con ADN .....	66
<b>Figura 29.</b> A. Curva de ITC obtenida mediante la titulación de ADN utilizando el dominio R2. Se obtuvo una KD=92.5 nM. B. Curva de ITC obtenida mediante la titulación de KIX utilizando el dominio TAD.....	67
<b>Figura 30.</b> Curva de termoforesis obtenida para la interacción de R3 marcada con un compuesto fluorescente enlazado al His-tag del dominio (NT-647), junto con el gen Tom-1A. Se determinó una KD de 430.4 nM. ....	68
<b>Figura 31.</b> Espectro de 1H de RMN del dominio R3.....	68
<b>Figura 32.</b> Espectro de 1H del dominio R2.....	69
<b>Figura 33.</b> Espectro de 1H del dominio KIX. ....	69

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Condiciones de expresión y purificación optimizadas para la obtención de N-escorpina, C-escorpina y TcoKIK.....	13
<b>Tabla 2.</b> Códigos PDB y BMRB correspondientes al depósito de las estructuras obtenidas mediante RMN.....	16
<b>Tabla 3.</b> Condiciones de expresión optimizadas para cada uno de los dominios.....	17
<b>Tabla 4.</b> Condiciones de purificación optimizadas para cada uno de los dominios.....	18
<b>Tabla 5.</b> Porcentaje de estructura secundaria calculado con el servidor BESTSEL <sup>106</sup> .....	63

# CAPITULO 1

## 1. 1 INTRODUCCIÓN

Se encuentra bien establecido que la resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica muy útil para realizar estudios estructurales y dinámicos de sistemas biomoleculares en un ambiente cercano al fisiológico. Los avances en la instrumentación y el diseño de nuevas aplicaciones empleando RMN han permitido a su vez realizar estudios a nivel molecular con una mejor resolución(Norton 2018). Con el fin de poder comprender cada vez mejor, el mecanismo mediante el cual, las proteínas y péptidos cumplen su función biológica en cada sistema, decidimos seleccionar la RMN como herramienta primordial en este proyecto. Esto con el fin de estudiar varios péptidos provenientes del veneno de diferentes especies, así como también los dominios presentes en el factor de transcripción de humano A-MYB.

Los primeros 4 capítulos se centran en el estudio de los péptidos Cl13, escorpina, TcoKIK y SCNTX, los cuales provienen de diferentes especies venenosas. Generalmente, estas especies utilizan su veneno como mecanismo de defensa, y para cazar sus presas. La composición del veneno varía de animal a animal; sin embargo, la mayoría de los venenos están compuestos por una mezcla heterogénea de sales inorgánicas, moléculas orgánicas de bajo peso molecular, péptidos (2 -10 kDa) y enzimas (>10 kDa)(King 2011). Esta mezcla le permite al animal inmovilizar y/o matar la presa o predador(Pennington, Czerwinski, and Norton 2018). Desde la antigüedad, los seres humanos han sabido que las criaturas venenosas pueden ser extremadamente peligrosas y potencialmente fatales. Gracias a la creatividad humana, los pueblos antiguos no tardaron mucho en utilizar proyectiles con veneno de diferentes animales como tácticas de guerra o caza(Keaveney and Mayor 2004).

Durante muchos años el veneno de culebras, sapos, arañas y escorpiones ha sido usado como tratamiento terapéutico para tratar algunas dolencias como la artritis, el cáncer y enfermedades gastrointestinales, entre otras, empleando pequeñas dosis del veneno completo(Pennington, Czerwinski, and Norton 2018). Fue solo hasta finales del siglo XX que la medicina moderna comenzó a utilizar el veneno de manera más sistemática y rigurosa(Gopalakrishnakone, Cruz, and Luo, n.d.). Se determinó que los péptidos aislados y utilizados en apropiadas concentraciones pueden convertirse en medicamentos útiles; a pesar de esto, existen muy pocos estudios clínicos de péptidos derivados de venenos(Pennington, Czerwinski, and Norton 2018; Gan ZR, Gould RJ, Jacobs JW, Friedman PA 1988; Rocha ESM, Beraldo WT 1949; Scarborough RM, Rose JW, Hsu MA 1991; Markwardt F. 1970; Maraganore JM, Bourdon P, Jablonski J, Ramachandran KL 1990; Miljanich GP. 2004).

Los ensayos de actividad también han progresado, debido a que; los primeros ensayos involucraban la inyección intra-cerebro-ventricular de ratones para luego

observar su actividad(Olivera et al. 1990), lo cual aún sigue siendo ampliamente utilizado(Drane et al. 2017). Recientemente, los sistemas de expresión heterólogos como ovocitos o células de mamífero; inyectados con ADNc codificante para diferentes canales iónicos; se ha convertido en una herramienta estándar para determinar el bloqueo de canales iónicos por diferentes moléculas(Tammara, Shimomura, and Proks 2008). Adicional a esto, la identificación y el desarrollo de nuevas moléculas ha progresado rápidamente, también, gracias al desarrollo de otros ensayos como; los fluorimétricos o colorimétricos basados en sustrato(Markossian S, Sittampalam GS 2017), el lector de placas de imágenes de fluorescencia (FLIPR)(Vetter 2012) y la resonancia de plasmón de superficie(Leonard, Hearty, and O’Kennedy 2011).

Por otro lado, el sexto capítulo se centra en el estudio de A-MYB perteneciente a la familia de factores de transcripción MYB. Los cuales son proteínas de enlace a ADN que actúan como transactivadores de diversos genes, y fueron llamados así debido a que v-Myb, un componente oncogénico del virus de mieloblastosis aviar, presenta un sitio de enlace ADN similar al de los factores de transcripción MYB. En general, estas se enlazan y estimulan la transactivación de genes objetivo que regulan la progresión del ciclo celular, diferenciación y apoptosis(Sala 2005).

En mamífero existen tres parálogos de R1R2R3-MYB: A-Myb, B-Myb y C-Myb. A-Myb, a diferencia de los otros factores de transcripción de esta clase B-Myb y C-Myb, muestra una distribución celular restringida y su ciclo celular está regulado(V. Facchinetti et al. 2000). Posee diferentes dominios funcionales principales los cuales son: un dominio de enlace a ADN (DBD) conformado por 3 repeticiones en tándem, un dominio de activación transcripcional (TAD) y un dominio de regulación negativa (NRD)(Takahashi et al. 1995).

Se encuentra bien estudiado que C-Myb se enlaza de manera específica a ((T/C)AAC(G/T)G(A/C/T)(A/C/T)), el cual fue nombrado como sitio I de enlace a MYB (MBSI), siendo más específicos ((T/C)AAC)) tiene contactos específicos con R3 y ((G/T)G(A/C/T)(A/C/T)) tiene contactos específicos con R2. Adicionalmente, B-Myb la cual es expresada en células hematopoyéticas, células epiteliales y fibroblastos, al igual que C-Myb y A-Myb reconocen el sitio I de enlace a MYB (MBSI)(Prouse and Campbell 2012).

En particular, A-Myb presenta gran relevancia biológica puesto que, se encuentra involucrada en la regulación de la proliferación y/o diferenciación de células normales B, células de linfoma de Burkitt(Valeria Facchinetti et al. 1997), infertilidad masculina, desarrollo anormal de la glándula mamaria y decrecimiento del estado físico. Además, se han realizado estudios sobre anomalías médicas específicas en las cuales se encuentra involucrada.

## **1.2 Diseño experimental capítulos 2, 3, 4, 5**

En esta sección se realiza una descripción general de la metodología empleada para los capítulos 2, 3, 4 y 5.



### 1.2.1 Clonación de los péptidos

1. El péptido Cl13 fue aislado directamente del veneno del alacrán *Centruroides limpidus* por el Dr. Olamendi Timoteo (Olamendi-Portugal et al. 2017).
2. Para los extremos C y N-terminal de la escorpina (nombrados como C-escorpina y N-escorpina), los genes sintéticos optimizados para la expresión en *Escherichia coli* fueron producidos por GenScript utilizando la secuencia de aminoácidos reportada con el código de UniProt P56972 (Conde, R., Zamudio, F. Z., Rodríguez, M. H., and Possani 2000) N-escorpina (aminoácidos 1-28) y C-escorpina (aminoácidos 29-85). Estas secuencias fueron clonadas en el vector de expresión pET32a para producir la proteína de fusión con un dominio de tiorredoxina, un 6-HisTag y un sitio de corte con TEV, este proceso fue desarrollado por el M.C Alland Colorado, egresado del posgrado en Ciencias Químicas de la UNAM.
3. Para el péptido TcoKIK, el gen sintético optimizado para la expresión en *E. coli* fue producido por Epoch Life Science (Missouri City, TX, USA) basado en la secuencia de aminoácidos reportada con el código de UniProt Q0GY42 y clonado dentro del vector de expresión pET32a para producir la proteína de fusión con un dominio de tiorredoxina, un 6-HisTag y un sitio de corte con enteroquinasa.

### 1.2.2 Obtención y purificación de los péptidos

1. Para la obtención de Cl13 pura, se recolectaron escorpiones de la especie *C. limpidus* en Iguala (latitud 17.850, longitud 100.367) con permiso oficial de la SEMARNAT (número 004474/18), se llevaron al laboratorio y se les extrajo el veneno soluble, el cual fue fraccionado, como se describió previamente (Olamendi-Portugal et al. 2017).
2. El protocolo de expresión y purificación para los péptidos recombinantes N-escorpina y C-escorpina se encuentran descritos en la tesis de maestría del M.C Alland Colorado. Las condiciones de expresión y purificación se resumen en la tabla 1.
3. El protocolo de expresión y purificación para la toxina TcoKIK se encuentran descritos en mi tesis de maestría. Las condiciones de expresión y purificación se resumen en la tabla 1.
4. SCNTX fue expresada con marcaje isotópico  $^{15}\text{N}$  y  $^{13}\text{C}$ , y fue purificada por el Dr. Guillermo de la Rosa de la universidad de Toronto.

**Tabla 1.** Condiciones de expresión y purificación optimizadas para la obtención de N-escorpina, C-escorpina y TcoKIK.

Péptidos	Amortiguador de lisis	Condiciones de digestión enzimática			Programa de sonicación	Gradiente cromatográfico	
		Amortiguador	Cantidad de enzima	Tiempo y temperatura		Tiempo (min)	% ACN

N-escorpina y C-escorpina	Tris-HCl 50 mM NaCl 300 mM pH 8.0	Tris-HCl 50 mM NaCl 300 mM MgCl <sub>2</sub> 5 mM DTT 0.25 mM glicerol 5% pH 8.0	1.0 mg de TEV por cada 100 mg de proteína de fusión	16 h 4°C	20 pulsos de 15 s ON con 60 W y 35 s OFF	45	15- 90
TcoKIK	Tris-HCl 50 mM  NaCl 300 mM imidazol 20 mM  pH 8.0	Tris-HCl 50 mM  NaCl 300 mM  CaCl <sub>2</sub> 1 mM  Triton 0.05%  pH 8.0	0,1 unidades de Enteroci- nasa por cada 1 mg de proteína de fusión	12 h  37 °C	10 min pulsos de 20 s ON con 50 W; 40 s OFF	0-3	12
						3.01-11	11
						11.01-27	27
						27.01-30	30

### 1.2.3 Espectrometría de masas

El peso molecular de Cl13 se obtuvo mediante espectrometría de masas usando un instrumento LCQFleet, de Thermo Fisher Inc, (San Diego, CA, EE. UU.).

El peso molecular de los péptidos C-escorpina, N-escorpina y TcoKIK se obtuvieron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF usando una matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico disuelta en agua desionizada con 0.05% TFA y 15% de acetonitrilo en un instrumento Bruker Daltonics Microflex LT. Se utilizó el modo lineal.

### 1.2.4 Resonancia magnética nuclear

Los experimentos de RMN para la Cl13 se adquirieron en un espectrómetro Avance NEO de 800 MHz (Bruker Biospin, Billerica, MA, EE. UU.) con un campo magnético de 18.1 T y en un espectrómetro Avance III HD de 600 MHz con un campo magnético de 14.1 T. Mientras que, para N-terminal, C-terminal, TcoKIK y SCNTX fueron adquiridos en un espectrómetro Daltonics de 700 MHz (Bruker Biospin, Billerica, MA, EE. UU.) Con un campo magnético de 16.4 Tesla a 298 K.

La muestra liofilizada de Cl13 se disolvió en un amortiguador de acetato 20 mM, D<sub>2</sub>O al 10% pH 5 (Euriso-Top, Saclay, Francia) hasta una concentración final de 2.8 mM, mientras que, las muestras liofilizadas de N-escorpina y C-escorpina se disolvieron en D<sub>2</sub>O al 3.0% v/v (Cambridge Isotopes Laboratories, Tewksbury, MA, EE.UU.) en agua desionizada, mientras que TcoKIK fue disuelta en PBS pH 7.5, hasta una concentración de proteína final de 5.0 mM para N- y C-escorpina y 1.2 mM para TcoKIK. Se añadió 50% de TFE deuterado a la muestra N-terminal. Para la identificación de los sistemas de espín y la asignación secuencial, se registraron los siguientes experimentos

homonucleares de RMN 2D: (a) TOCSY(Griesinger et al. 1988) usando un esquema de pulso MLEV-17 con un período de mezcla isotrópico de 80 ms o 20 ms(Levitt, Freeman, and Frenkiel 1982; Bax and Davis 1985), (b) COSY filtrado cuántico doble (DQFCOSY)(Piantini, Sørensen, and Ernst 1982; Rance et al. 1983) y (c) NOESY(States, Haberkorn, and Ruben 1982) espectros de efecto nuclear Overhauser. Los espectros NOESY se adquirieron con tiempos de mezclado para Cl13 de 100,150 y 250 ms; para N-escorpina, C-escorpina, TcoKIK y SCNTX de 150 y 250 ms. Por otro lado, la supresión de agua se logró mediante ecos de espín de gradiente de campo pulsado doble (DPFGSE)(Hwang and Shaka 1995; Dalvit et al. 1991). La asignación de las señales correspondientes a los protones de los péptidos se logró mediante el método estándar desarrollado por Wüthrich(Kurt Wüthrich 1986).

Para Cl13, N-escorpina, C-escorpina y SCNTX, las constantes de acoplamiento de HN-H $\alpha$  se midieron utilizando el método de duplicación J modificado en el dominio de la frecuencia(Delrioportilla, Blechta, and Freeman 1994; Garza-García, Ponzanelli-Velázquez, and del Río-Portilla F 2001) del espectro 2D-TOCSY. Para satisfacer el requisito del método de duplicación J, el experimento TOCSY se volvió a transformar utilizando 1024 X 65.536 puntos complejos para tener una resolución de 0.20 Hz / punto para cada traza utilizada.

Adicionalmente, para Cl13, se llevaron a cabo experimentos heteronucleares bidimensionales a 800 MHz y 308 K, concretamente  $^{15}\text{N}$  HSQC,  $^{13}\text{C}$  HSQC editado por Multiplicidad,  $^{13}\text{C}$  HSQC-TOCSY y  $^{13}\text{C}$  HMBC, para respaldar las asignaciones de protones(Medvedeva et al. 1993). Mientras que, para SCNTX se emplearon también los experimentos heteronucleares tridimensionales HNCA, HNCACB, HNCO, CC(CO)NH y H(CCO)NH. Se utilizaron asignaciones de desplazamiento químico  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$  para obtener ángulos Phi y Psi utilizando el servidor web TalosN(Shen and Bax 2013).

### 1.2.5 Cálculo estructural

Las restricciones de distancia empleadas para los cálculos estructurales fueron obtenidas a partir de los espectros homonucleares  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY adquiridos a 308 K para Cl13 y a 298 K para C-escorpina, N-escorpina, TcoKIK y SCNTX con 150 ms de tiempo de mezclado. Los resultados experimentales obtenidos mediante resonancia magnética nuclear fueron procesados con el software NMRPipe(Delaglio et al. 1995). La identificación de los sistemas de espín, el “peak picking” y las asignaciones de restricciones de distancia derivadas de NOE se realizaron en CARA 1.5(Keller 2004). Los cálculos estructurales fueron llevados a cabo utilizando CYANA 2.1(Downing and Güntert 2004) con una tolerancia en el desplazamiento químico entre 0.02 y 0.015 ppm. A continuación, se seleccionaron los 20 modelos de menor energía sin violaciones de restricción de 500 estructuras, los cuales fueron minimizados y afinados mediante

cálculos de dinámica molecular con AMBER 9 utilizando el protocolo descrito por Gurrola et al., 2012(Gurrola et al. 2012). Los modelos estructurales afinados de los péptidos Cl13, N-escorpina, C-escorpina, TcoKIK y SCNTX fueron validados y depositados en el Protein Data Bank y en el Biological Magnetic Resonance Bank (Tabla 2). Las estructuras fueron analizadas y graficadas con UCSF Chimera(Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC 2004) y Pymol(“The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.,” n.d.).

**Tabla 2.** Códigos PDB y BMRB correspondientes al depósito de las estructuras obtenidas mediante RMN.

Péptido	PDB	BMRB
Cl13	6VXW	30727
N-escorpina	7M1E	30879
C-escorpina	7M1D	30878
TcoKIK	7LGL	30846
SCNTX	7LUW	30867

### 1.3 Diseño experimental capítulo 6

La secuencia de aminoácidos para cada uno de los 5 dominios requeridos en este proyecto se enlista a continuación:

- Dominio R2 de A-Myb (90-141): 52 aminoácidos  
[LIKGPWTKEEDQRVIELVQKYGPKRWSLIAKHLKGRIGKQCRERWHNHLNPE](#)
- Dominio R3 de A-Myb (142-193): 51 aminoácidos  
[VKKSSWTEEDRIIYEAHKRLGNRWAEIAKLLPGRTDNSIKNHWNSTMRRK](#)
- Dominio de transactivación (TAD) de A-Myb (218-319): 101 aminoácidos  
[MQTQNQFYIPVQIPGYQYVSPEGNCIEHVQPTSAFIQPPFIDEDPDKEKKIKELEMLL  
MSAENEVRRKRIPSQPGSFSSWSGSFLMDDNMSNTLNLSLDEHTS](#)
- Dominio KIX de CBP (587-673): 87 aminoácidos  
[GVRKGWHEHVTQDLRSHLVHKLVAIFPTDPAALKDRRMENLVAYAKKVEGDM  
YESANSRDEYYHLLAEKIYKIQKELEEKRRSRL](#)
- Dominio COM (DOMINIO R2+DOMINIO R3+DOMINIO DE TRANSACTIVACIÓN):  
 235 aminoácidos

LIKGPWTKEEDQRVIELVQKYGPKRWSLIAKHLKGRIGKQCRERWHNHLNPEVKKS  
 SWTEEDRIIYEAHKRLGNRWAEIAKLLPGRTDNSIKNHWNSTMRRKVEQEGYLQ  
 DGIKSERSSSKLQHKPCAAMDHMQTQNQFYIPVQIPGYQYVSPEGNCIEHVQPTSAFI  
 QQPFIDEDPDKEKKIKELEMLLSAENEVRRKRIPSQPGSFSSWSGSFLMDDNMSN  
 TLNSLDEHTS

### 1.3.1 Clonación de los péptidos

Los genes sintéticos de cada uno de los dominios fueron optimizados para la expresión en *E. coli* y producidos por GenScript® basado en la secuencia de aminoácidos reportada para A-Myb de humano con el código UniProt P10243 (con base en la secuencia de aminoácidos para cada dominio) y clonados dentro del vector de expresión pET28a para producir la proteína de fusión con un 6-HisTag en el N-terminal y un sitio de corte con trombina, adicional a esto se adicionó un sitio de corte con TEV previo a la secuencia de cada dominio.



*Ilustración 1. Esquema de la proteína de fusión obtenida para cada uno de los dominios en estudio.*

### 1.3.2 Expresión y purificación de los péptidos

Inicialmente se optimizaron las condiciones de expresión en medio LB para cada uno de los dominios (Tabla 3). El proceso para la expresión de cada dominio fue el siguiente. Inicialmente, se realizó una nueva transformación en la línea celular optimizada para cada dominio, las células transformadas se sembraron en una caja de LB con los antibióticos apropiados y se incubaron a 37 °C por 16 h. A continuación, a partir de una colonia, se dejó un preinóculo toda la noche a 37 °C con agitación constante de 200 rpm. Luego de 14 h se agregó 50 mL del preinóculo en 1 L de medio LB (con los antibióticos correspondientes), este se dejó en agitación constante a 37 °C hasta llegar a una densidad óptica de 0.7. Consecuentemente se agregó IPTG a 0,5 mM con el fin de inducir la expresión de proteína, la cual se realizó durante el tiempo optimizado para cada dominio. Adicional a esto, también se optimizaron las condiciones de expresión en medio M9 con el fin de poder realizar marcaje isotópico (Tabla 3).

**Tabla 3.** *Condiciones de expresión optimizadas para cada uno de los dominios.*

DOMINIO	CEPA ÓPTIMA DE EXPRESIÓN EN MEDIO LB	CEPA ÓPTIMA DE EXPRESIÓN EN MEDIO M9	TIEMPO ÓPTIMO DE EXPRESIÓN A 37 °C
R2	BL21 DE3	BL21 DE3	6 h
R3	Rosetta	Rosetta	5 h
TAD	Rosetta	Rosetta	4 h
COM	Rosetta	BL21 DE3	5 h
KIX	Rosetta	Rosetta	5 h

Las células fueron recolectadas por centrifugación a 6000 rpm por 5 minutos, el paquete celular fue resuspendido en amortiguador de lisis correspondiente (Tabla 4), continuando con la lisis celular mediante sonicación. El extracto celular fue purificado inicialmente mediante cromatografía de afinidad metal quelato empleando una columna HiTrap® HP 5 mL. Los dominios que fueron extraídos con urea, fueron replegados por dilución, diluyendo la concentración de urea en el medio muy lentamente. Para el siguiente paso de purificación, se optimizaron las condiciones para cada uno de los dominios, las cuales se presentan resumidas en la tabla 4. Para la purificación de KIX mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC), se realizó en el equipo ProStar Varían, el cual está equipado con un sistema de disolventes con gradiente binario. Se empleó una columna Jupiter® 4 $\mu$  Proteo 90A C12 de 250 mm de largo y 4.6 mm de diámetro interno. Para este paso, se optimizó el gradiente de H<sub>2</sub>O/ ACN (0,05% TFA), iniciando a una concentración de 15% de ACN, con un incremento lineal hasta 75% de ACN en 20 minutos. Para la purificación mediante intercambio catiónico y aniónico se empleó una columna HiTrap® Q FF 1 mL y una HiTrap® SP FF 1 mL. En ambos casos se empleó un gradiente lineal incrementando la concentración de 100 mM- 1M de NaCl en 20 volúmenes de columna.

**Tabla 4.** Condiciones de purificación optimizadas para cada uno de los dominios.

DOMINIO	LISIS	PURIFICACIÓN	REPLEGAMIENTO	INTERCAMBIO IÓNICO	RP- HPLC
R2	PBS pH:6.5	PBS+1mM DTT	No aplica	Intercambio catiónico	
R3	PBS pH:6.5	PBS	No aplica	Intercambio catiónico	
TAD	PBS+3M UREA pH:8	PBS+1 mM DTT	POR DILUCIÓN	No se retiene	C4
COM	PBS+3M UREA pH:6.5	PBS+1 mM DTT	POR DILUCIÓN	Intercambio catiónico pH 7.5 se retiene poco	No se retiene
KIX	PBS+1,5M UREA pH:6.5	PBS	POR DILUCIÓN	Intercambio catiónico	C12

### 1.3.3 Determinación estructural por dicroísmo circular (DC)

Los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de los dominios R2, R3, TAD, KIX y COM se determinaron en el Laboratorio de Espectroscopia y polarimetría (LEP) del Instituto de Química de la UNAM. Se empleó un espectropolarímetro Jasco J-1500 con una celda de paso óptico de 0.1 cm, las muestras se encontraban en PBS 1X a una concentración de 0.2 mg/mL. Adicional a esto, se realizaron barridos de temperatura para los dominios R2, R3, TAD y KIX calentando desde 25-95 °C y detectando a la longitud de onda en la cual se observó un mínimo característico.

### 1.3.4 EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

Los experimentos EMSA se llevaron a cabo en colaboración con la Dra. Elisa Azuara en la UACM con el fin de observar la interacción de los dominios R2, R3 y COM con el gen TOM-1A (5' CAATCCTTAACGGACTGAGG 3') obtenido por la empresa GenScript®, el cual fue marcado con 32P para facilitar su detección empleando el kit QIAquick Cat. N. 28304 y T4 Polynucleotide Kinase EK00131. Para cada uno de los dominios se prepararon 4 reacciones diferentes. Cada reacción contenía 20 µL del amortiguador de enlace 2X, 0,5 ng de TOM-1A, y se varió la concentración para COM (0.60; 1.2; 3 y 6 µg), R2 (0.5; 0.75; 1 y 1.5 µg) y R3 (0.60; 1.2; 3 y 6 µg). Por último, se llevó cada reacción a un volumen final de 40µ con agua. A continuación, se incubaron en hielo cada una de las reacciones por 30 minutos y se corrieron en un gel de poliacrilamida al 6%.

### 1.3.5 Caracterización preliminar mediante ITC (Isothermal titration calorimetry) y termoforesis

Los experimentos de ITC fueron realizados en colaboración con el Dr. Homero Gómez Velasco en el Instituto de Química de la UNAM. Mediante ITC se estudió la interacción de TOM-1A con R2 y de KIX con TAD de la siguiente manera. inicialmente los dominios en estudio junto con su respectivo ligando fueron dializados exhaustivamente, utilizando PBS 1X. Todas las muestras se desgasificaron por 10 min

previos a los experimentos. Las mediciones por ITC se hicieron a 298 K utilizando un instrumento MicroCal™ ITC200 (GE Healthcare, Northampton, MA, USA). Los dominios TOM-1A (10.043  $\mu\text{M}$ ) y KIX (11.4  $\mu\text{M}$ ) se colocaron en la celda de reacción y los ligandos R2 (200,44  $\mu\text{M}$ ) y TAD (86.9  $\mu\text{M}$ ) en la jeringa. El programa de titulación consistió en 18 inyecciones (2  $\mu\text{l}$  cada una) consecutivas del ligando con un intervalo de 250 s entre inyecciones, usando una velocidad de agitación de 750 rpm. El cambio de entalpía ( $\Delta H$ ), la constante de unión (KU) y la estequiometría de reacción (n) fueron estimados de la isoterma de titulación usando el programa MicroCal Origin v7.

Para estudiar la interacción del dominio R3 con el gen TOM-1A, el dominio R3 fue marcado con el Kit proporcionado por NanoTemper Technologies. El tinte rojo fluorescente NT-647 se acopló mediante especificidad de la etiqueta de histidinas (His-tag).

En este experimento de MST, se mantuvo constante la concentración de R3 marcado con NT-647 a 50 nM, mientras que la concentración de Tom1A no marcado se varió entre 7.5  $\mu\text{M}$  y 0.2 nM. El ensayo se realizó en PBS 1X. Después de una breve incubación, las muestras se cargaron en capilares premium Monolith™ NT.115 y se realizó el análisis MST utilizando un Monolith NT.115.

### **1.3.6 Caracterización estructural por resonancia magnética nuclear 1D**

Para la caracterización estructural por RMN, la muestra se preparó disolviendo 0.6 mg de los dominios recombinantes R2, R3 y KIX en 275  $\mu\text{L}$  de 95/5 % de  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ . Se adquirieron los experimentos de 1H en un equipo Bruker de 700 MHz a 25°C, empleando la supresión del agua DPFGE.

### **1.3.7 Caracterización por espectrometría de masas**

La caracterización inicial del dominio KIX se llevó a cabo mediante espectrometría de masas MALDI-TOF en un equipo Bruker Daltonics en el laboratorio de servicios analíticos del Instituto de Química UNAM. Las muestras se prepararon tomando 1  $\mu\text{L}$  de lo colectado tras la purificación por RP-HPLC y haciendo diluciones 1:10 con la matriz, ácido 4-hidroxi- $\alpha$ -ciano-cinámico, en una mezcla  $\text{H}_2\text{O}$ -ACN 2:1 con 0.05% de ácido trifluoroacético.



## **CAPITULO 2. Estructura tridimensional del péptido tóxico Cl13 del alacrán *Centruroides limpidus*.**

### **2.1 INTRODUCCIÓN**

En México actualmente, se presentan un gran número de picaduras de alacrán en humanos(Chippaux and Goyffon 2008), con alrededor de 300000 personas picadas por año(Secretaria de Salud 2015). Adicionalmente, México también alberga la mayor biodiversidad de especies de alacranes en el mundo, con 289 especies reportadas hasta ahora(Santibáñez-López et al. 2015) de las que 21 de estas son consideradas peligrosas para los seres humanos(González-Santillán and Possani 2018).

*Centruroides limpidus*, es probablemente una de las especies más importantes en México, se encuentra ampliamente distribuida en los estados de Morelos, Guerrero, México y Michoacán, así como también, se han realizado varios estudios de su veneno(Alagón et al. 1988; Lebreton et al. 1994; Dehesa-Dávila et al. 1996; Riaño-Umbarila et al. 2013; Cid-Uribe et al. 2019). Inicialmente, se reportaron dos péptidos tóxicos capaces de afectar el funcionamiento de canales de sodio(Possani et al. 1999), los cuales fueron Cl1 (Ramírez et al., 1994) y Cl2 (Dehesa-Dávila et al. 1996). También, en estudios recientes, se han desarrollado fragmentos de anticuerpos humanos capaces de proteger contra toxinas de esta especie y de otros géneros de *Centruroides* presentes en México(Riaño-Umbarila et al. 2016; 2019). En uno de ellos se demostró que un anticuerpo monocatenario (LR) dirigido contra la toxina Cn2 del alacrán (*C. noxius*), era capaz de neutralizar el veneno completo de esta especie(Riaño-Umbarila et al. 2011). Lo cual también fue observado para el anticuerpo monocatenario de origen humano (10FG2), el cual mostró ser capaz de neutralizar completamente las toxinas Cl1 y Cl2(Riaño-Umbarila et al. 2019). Sin embargo, se observó que una mezcla de estos anticuerpos no fue capaz de proteger completamente contra el veneno de *C. limpidus*, contrario a lo que se observó para la toxina Cn2(López-Giraldo et al. 2020). Por tanto, se continuaron haciendo estudios de caracterización de los componentes del veneno de *C. limpidus*, para lo cual se encontró un componente menor, denominado Cl13, el cual demostró ser muy tóxico sobre ratón.

Este péptido fue aislado, secuenciado, caracterizado fisiológicamente y publicado(Olamendi-Portugal et al. 2017). Para los dos anticuerpos monocatenarios que reconocen Cl1 y Cl2, se identificaron los epítomos de la toxina reconocidos por los fragmentos de anticuerpo. Dado que la similitud de la secuencia de aminoácidos de Cl13 en comparación con la de Cl1 y Cl2 es más del 70%, encontramos la necesidad de un mayor conocimiento de sus estructuras 3D. Por esta razón se llevó a cabo la determinación de la estructura tridimensional de Cl13.

## 2.2 HIPÓTESIS

*La estructura tridimensional de la toxina Cl13 nos permitirá obtener información estructural relacionada con la interacción con anticuerpos monocatenarios para la neutralización del veneno de la especie *Centruroides limpidus*.*

## 2.3 OBJETIVOS

### 2.3.1 OBJETIVO GENERAL

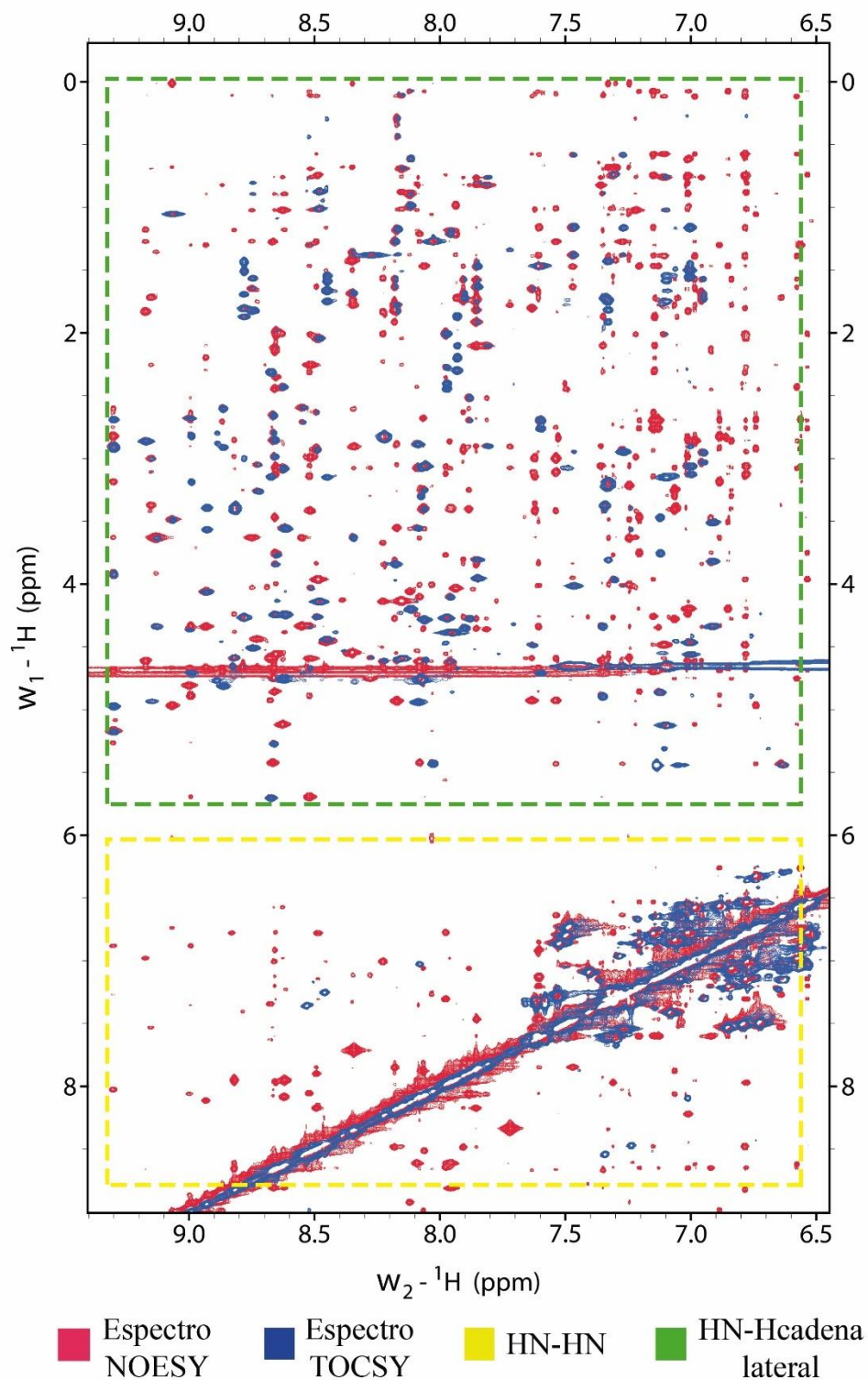
Obtener la estructura tridimensional de menor energía de la toxina nativa Cl13 empleando RMN 2D y 3D en disolución.

### 2.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Procesar los espectros de RMN necesarios para la caracterización estructural.
- Interpretar los experimentos multidimensionales de RMN.
- Asignar todos los sistemas de espín en los espectros de RMN.
- Obtener la estructura tridimensional experimental de menor energía para la Cl13 nativa.
- Afinar mediante dinámica molecular las 20 estructuras de menor energía obtenidas.
- Realizar un análisis estructural y comparar con toxinas similares reportadas.
- Obtener información estructural del mecanismo empleado por la Cl13 para llevar a cabo su función biológica.

## 2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

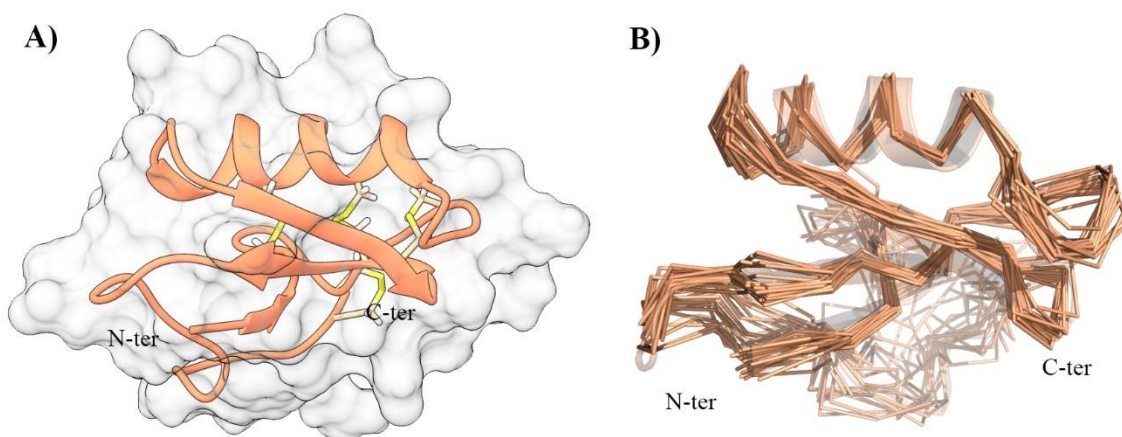
El veneno soluble de del escorpión *C. limpidus* fue fraccionado por el Dr. Olamendi para la obtención de CL13 pura, estos resultados se encuentran previamente reportados(Olamendi-Portugal et al. 2017). A partir de los espectros adquiridos por la Dra. Muriel Delepierre, se realizó la asignación secuencial de la toxina Cl13 de acuerdo al procedimiento estándar propuesto por Wüthrich(K. Wüthrich 2015). Los espectros NOESY de 150 ms de tiempo de mezclado y TOCSY de 80 ms (Fig. 1) permitieron la identificación de los 66 sistemas de espín de todos los residuos de aminoácidos debido a que presentaron una buena dispersión de señales. La estructura tridimensional de la toxina Cl13 (Fig. 2) se obtuvo a partir de 2,144 NOEs asignados fuera de la diagonal, de los cuales 280 son NOEs de larga distancia  $|i-j| \geq 5$ , 139 son NOEs de mediana distancia  $1 < |i-j| < 5$  y 1,725 son NOEs de corta distancia  $|i-j| \leq 1$  (Figura 3). Adicional a esto, se usaron 67 restricciones de ángulos obtenidas a partir de los desplazamientos químicos de  $^{15}\text{N}$  y  $^{13}\text{C}$  principalmente usando TalosN y 48 constantes de acoplamiento HN-H $\alpha$ .



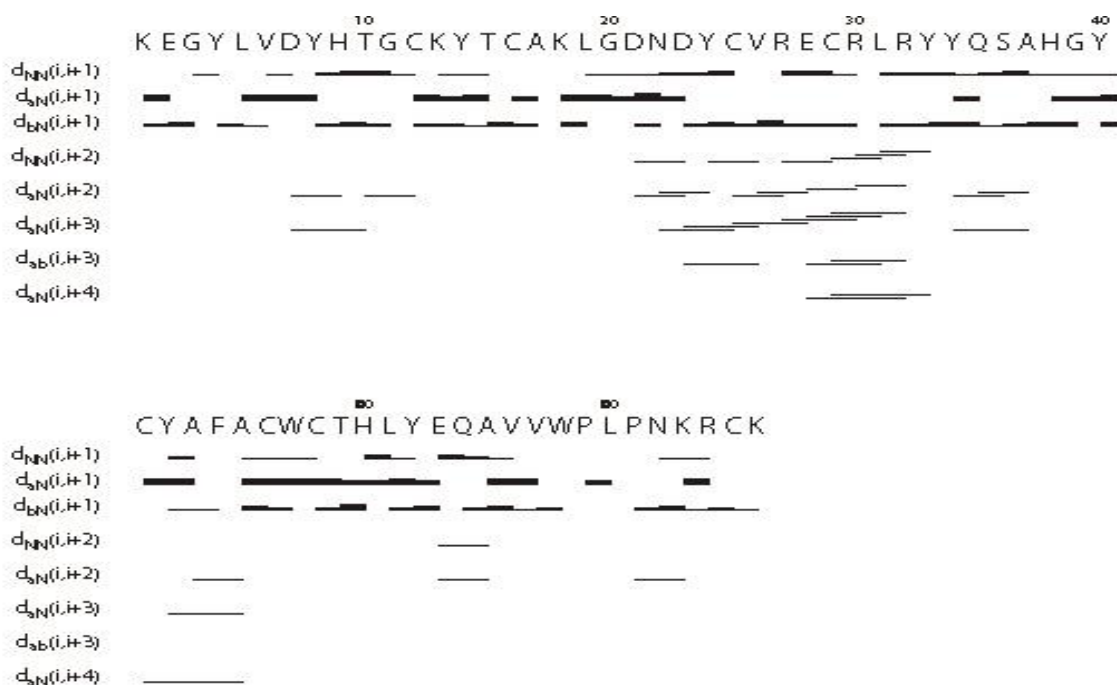
**Figura 1.** Espectros de RMN de Cl13. En color fucsia se muestra el espectro NOESY de 150 ms y en azul el TOCSY de 80 ms adquiridos en un espectrómetro Avance NEO de 800 MHz (Bruker Biospin, Billerica, MA, EE. UU.) con un campo magnético de 18,1 T. Las señales correspondientes a correlaciones HN-HN se encuentran dentro del recuadro amarillo. Las

señales correspondientes a las correlaciones HN con los protones de la cadena lateral se encuentran dentro del recuadro verde.

En la figura 2A se observa la estructura tridimensional de Cl13, la cual presenta una hélice- $\alpha$  (Asp23- Tyr33), una hoja-b antiparalela de 3 hebras (Glu2-Tyr4, Ala45-Leu49 y His38-Tyr42), tres giros ( $\beta$ 1- $\alpha$ 1,  $\alpha$ 1-  $\beta$ 2 and  $\beta$ 2- $\beta$ 3) y cuatro enlaces disulfuro. La figura 2B muestra la sobreposición de las 20 estructuras de menor energía. El RMSD de la cadena principal fue de 0.46 y considerando los átomos pesados, el RMSD fue de 0.90.

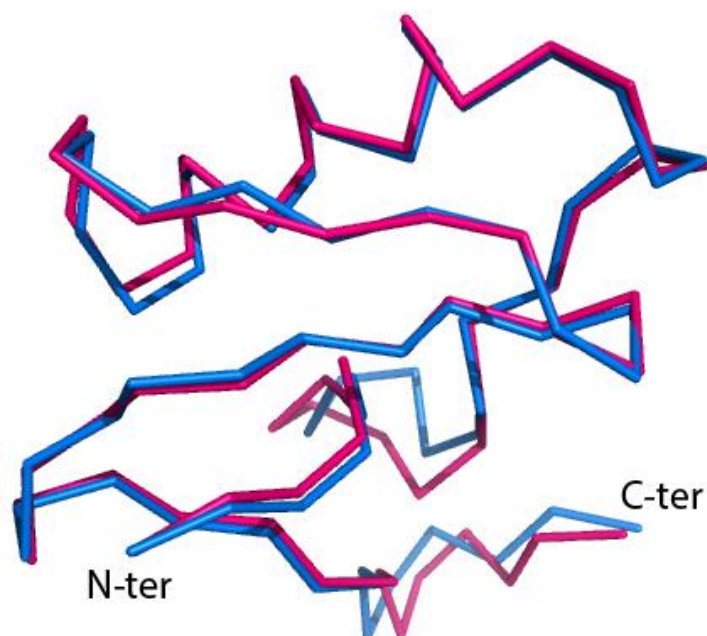


**Figura 2.** A) Estructura de menor energía obtenida para la Cl13 mediante RMN en solución, los enlaces disulfuro se muestran en color amarillo. B) Sobreposición de las 20 estructuras de menor energía obtenidas para la Cl13.



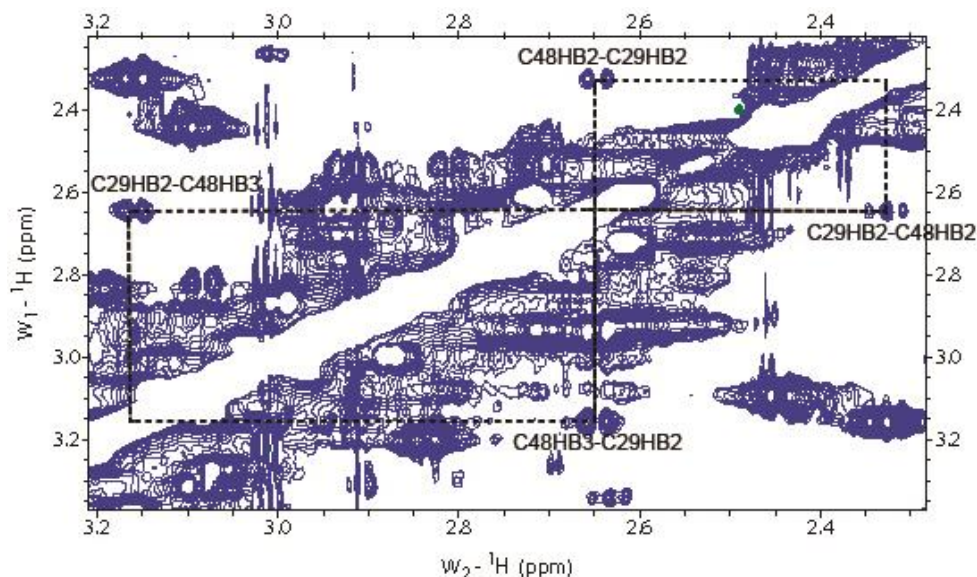
**Figura 3.** NOEs utilizados en el cálculo estructural de la toxina C113. Las líneas gruesas, medianas y delgadas corresponden a NOEs de corta, mediana y larga distancia. Es posible observar el elemento de estructura secundaria hélice- $\alpha$  entre los residuos Asp23-Tyr33 y una hoja- $\beta$  antiparalela de doble hebra (His38-Tyr42 y Ala45-Leu49).

Se realizaron dos cálculos estructurales diferentes para definir la conexión de los enlaces disulfuro: El primero, sin restricciones para la conexión de las cisteínas y el segundo, con las restricciones (C1-C8, C2-C5, C3-C6, y C4-C7) con base en la estructura primaria. Los dos cálculos convergen a estructuras terciarias similares (Figura 4). Las restricciones usadas para la conexión de enlaces disulfuro fueron observadas mediante RMN. Puesto que, se observaron NOEs entre  $H\beta_i-H\beta_j$  y  $H\alpha_i-H\beta_j$  de las cisteínas presentes en cada enlace disulfuro. En la figura 5 se muestra la correlación NOE entre la Cys29Hb y Cys48Hb, para lo cual se observó que no existe traslape de señales en esta región, lo cual permitió una clara interpretación.



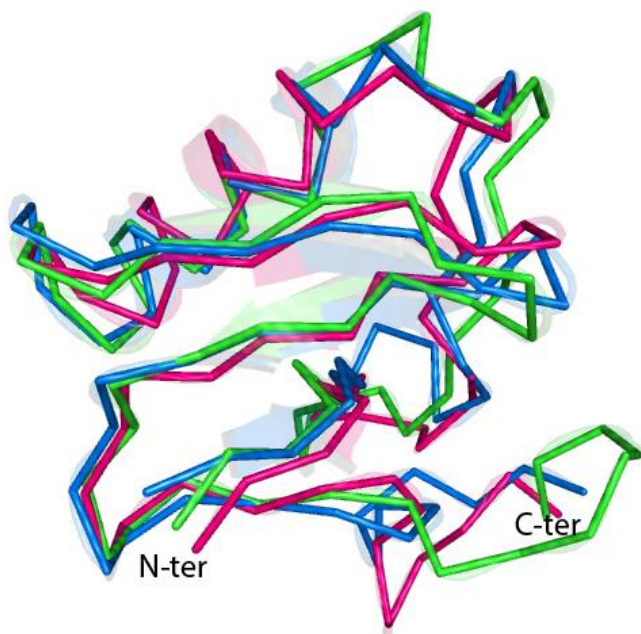
**Figura 4.** Sobreposición de la estructura tridimensional de la Cl13 con (azul) y sin (rosa) restricciones de enlace disulfuro.

Ambos cálculos estructurales (con y sin restricciones de enlace disulfuro) junto con los NOEs indican que las cisteínas involucradas se encuentran cercanas y probablemente se encuentren formando un enlace disulfuro. Adicional a esto, se observaron NOEs en las regiones (Cys16-Cys41, Cys25-Cys46 y Cys65-Cys12) (ver anexo 2). Teniendo en cuenta estos resultados y considerando que la conexión de enlaces disulfuro es similar a otras  $\beta$ -toxinas para las cuales la estructura ya se conoce, decidimos agregar estas restricciones al cálculo.



**Figura 5.** Región H $\beta$ -H $\beta$  de la correlación de enlace disulfuro entre Cys29-Cys48 en el espectro NOESY 2D de la C13 de 150 ms de tiempo de mezclado, 308 K. pH5, la concentración de la toxina fue 2.8 mM; las asignaciones se resaltan en color negro. NMRFAM-SPARKY software(Lee, Tonelli, and Markley 2015).

La figura 6 muestra la sobreposición de la estructura de la cadena principal para Cn2, Css2 y C13. Todas estas toxinas presentan un plegamiento con un motivo estructural CS  $\alpha/\beta$ .



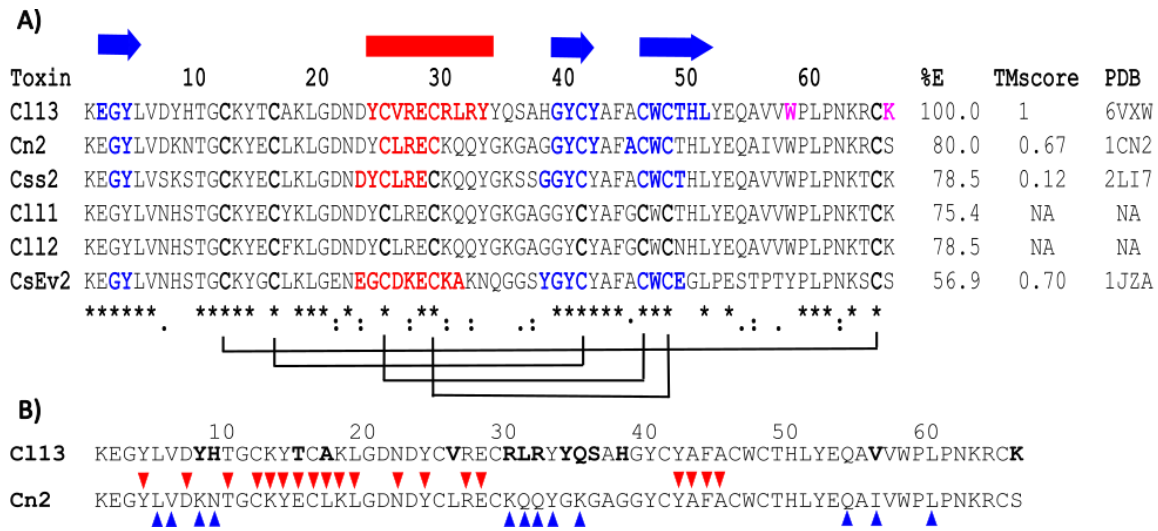
**Figura 6.** Comparación estructural entre Cn2 (rosa), Css2 (verde) y C13 (azul) en donde se puede observar que todas las toxinas tienen estructura similar. Para una mejor comparación visual nosotros eliminamos el His-tag para la Css2. El puntaje TM calculado

(TMscore) de Cn2 y Css2 (con His-tag) con respecto a Cl13 fue de 0.67 y 0.12 respectivamente, el valor bajo para la Css2 se da debido a que este posee un Histag adicional que no es comparable con las otras dos estructuras. Las diferencias en actividad podrían ser debido a la posición de diferentes aminoácidos específicos. El RMSD para Cl13, Cn2 y Css2 es de 0.46 Å, 1.38 Å y 1.52 Å respectivamente.

Debido a la alta homología en secuencia primaria de la Cl13 con Css2 (78.5 %) de *Centruroides suffusus suffusus* (Saucedo et al. 2012) y Cn2 (80%) de *Centruroides noxius Hoffmann* (Pintar, Possani, and Delepierre 1999) (Fig. 6) Las cuales también son toxinas de alacrán del grupo beta, se realizó una comparación de sus estructuras tridimensionales obtenidas mediante RMN con la estructura de menor energía obtenida para la Cl13 (Figura 6). Cabe resaltar que, todas estas toxinas son tóxicas sobre mamífero, sin embargo, mientras Cl13 y Css2 presentan actividad alta sobre el canal hNav1.5 (Olamendi-Portugal et al. 2017; Schiavon et al. 2006), Cn2 presenta actividad alta sobre canales hNav1.6.

El alineamiento mostrado en la figura 7B resalta en rojo los aminoácidos reconocidos en la Cn2 por scFv LR y resalta en azul los reconocidos por scFv 10FG2, los cuales son fragmentos de anticuerpos de cadena sencilla capaces de neutralizar varias toxinas de venenos mexicanos llamados LR y 10FG2. En la toxina Cl13, los aminoácidos que difieren entre Cn2 y Cl13 son resaltados en negrita con respecto a la secuencia de la toxina Cn2, Fig. 7B. Estas diferencias coinciden con sitios importantes de anclaje del LR scFv en la toxina Cn2, debido a los contactos formados con Glu15 (Canul-Tec et al. 2011). De la misma manera, scFv 10FG2 tiene un anclaje importante con los residuos Gln31 y Glu32 de Cn2 (Riaño-Umbarila et al. 2019), los cuales son aminoácidos diferentes en la Cl13 (Leu31 y Arg31) por lo tanto, estas interacciones podrían no ser establecidas.

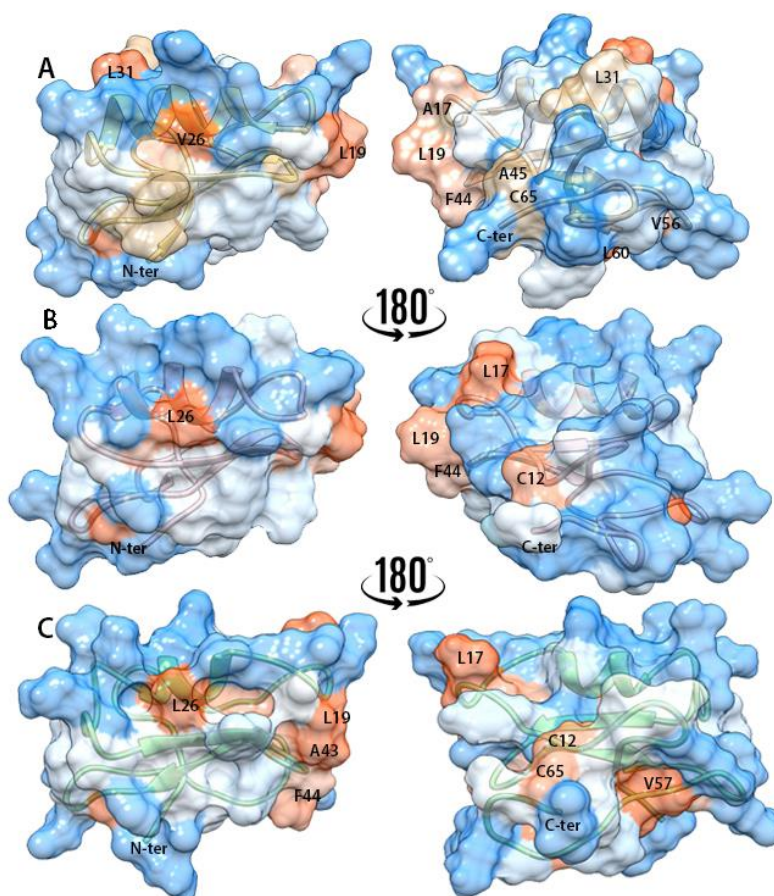




**Figura 7.** A) Alineación de secuencia de las toxinas beta Cl13, Cn2, Css2, Cl11, Cl12 y CsEv2. La región de la hoja  $\beta$  está coloreada en azul y la hélice  $\alpha$  en rojo. Los enlaces disulfuro están marcados como C1-C8, C2-C5, C3-C6 y C4-C7. Las estructuras secundarias se determinaron mediante el software Chimera. Cl11 y Cl12 aún no tienen sus estructuras 3D informadas. El asterisco (\*), los dos puntos (:), y el punto (.) indican residuos de aminoácidos idénticos, sustitución conservada y sustituciones semi conservadas en todas las secuencias utilizadas en el alineamiento, respectivamente. A continuación, se muestra la conectividad de los enlaces disulfuro. Esta alineación se realizó con el servidor T-coffee y el TM score. B) Alineamiento secuencial de la Cn2 y Cl13 se resaltan los aminoácidos reconocidos en la Cn2 por scFv LR en triángulos rojos y los reconocidos por scFv 10FG2 en triángulos azules. Los aminoácidos diferentes encontrados en la toxina Cl13 con respecto a Cn2 están resaltados en negra.

La identidad en secuencia primaria para las toxinas mostradas en la Figura 7 es mayor que el 56% (78% con Cn2 y 56.9% con Css2). Las estructuras tridimensionales difieren en regiones limitadas (Figura 6). De acuerdo con el alineamiento secuencial de las toxinas Cl13, Cn2, Css2 y CsEv2 se observa un alto porcentaje de identidad, el cual correlaciona con las estructuras tridimensionales conservadas reportadas en el PDB, las cuales comparten el plegamiento típico CS  $\alpha/\beta$ . El TM score, el cual es un parámetro métrico que nos permite comparar estructuras tridimensionales, siendo 1 el máximo valor para cuando dos estructuras son idénticas, este parámetro calculado para Cl13 y Cn2 fue de 0.67, indicando que existe una alta similitud entre estas dos estructuras y que comparten el mismo plegamiento (Figura 7). Las principales diferencias encontradas entre estas toxinas se encuentran en la longitud de los segmentos de aminoácidos, los cuales forman los elementos de estructura secundaria. Sin embargo, el alineamiento entre Cl13 y Css2 produce resultados muy diferentes, debido a la presencia de algunos aminoácidos adicionales en la Css2; lo cual da como resultado un valor bajo para el TM score, a pesar de que estas estructuras se ven muy similares (Figura 6).

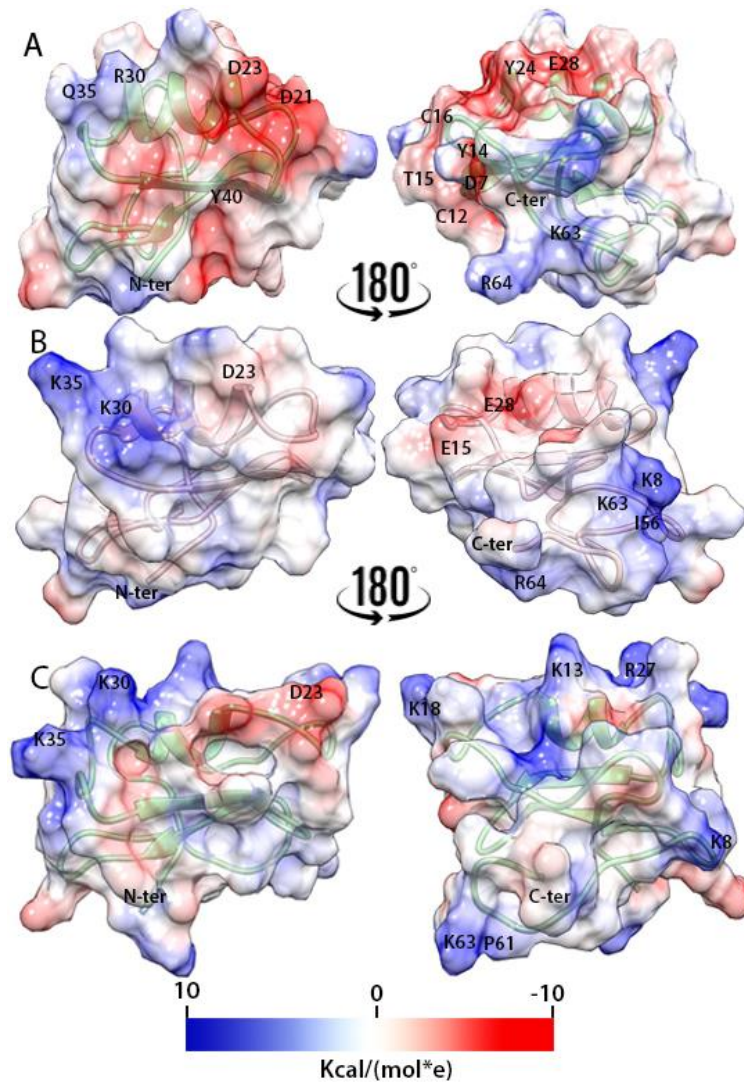
Previamente, fue descrito por Lior Cohen *et al*(Cohen et al. 2005) Las características comunes en la superficie funcional de las toxinas beta de alacrán, en donde se resalta el papel de algunos aminoácidos hidrofóbicos para la toxina C<sub>ss4</sub>, en su interacción con el receptor del sitio 4 del canal de sodio. Algunos de estos residuos se encuentran conservados en la superficie hidrofóbica de C<sub>l13</sub>, C<sub>n2</sub> y C<sub>ss2</sub> como se muestra en la figura 8. El parche hidrofóbico más grande se encuentra formado por los aminoácidos Ala17, Leu19 y Phe44, los cuales se encuentran conservados en las 3 toxinas. Este parche hidrofóbico se encuentra situado en el giro precediendo la hélice. Los dos aminoácidos Ala17 y Leu19 se encuentran también conservados en uno de los parches hidrofóbicos presentes en la C<sub>ss4</sub>, el cual es un segmento importante para la función de la C<sub>ss4</sub>. Esto fue demostrado previamente introduciendo algunas mutaciones puntuales en C<sub>ss4</sub>(Cohen et al. 2005).



**Figura 8.** Las superficies de hidrofobicidad para A) C<sub>l13</sub>, B) C<sub>ss2</sub> and C) C<sub>n2</sub> fueron calculadas usando UCSF Chimera(Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC 2004). Las superficies fueron coloreadas de acuerdo con la

*escala de tres colores, donde la región polar se encuentra en azul, la región neutra en blanco y la región hidrofóbica en color naranja.*

Previamente, se realizaron estudios de mutagénesis y neutralización monoclonal de anticuerpos, que mostraron la relevancia de His64 de la AaH2 en la modulación del canal Nav; la cual ayuda a guiar la toxina dentro de una posición de enlace estable (Clairfeuille et al. 2019). Para las toxinas Cl13 y Cn2, en esta posición, se encuentra la Arg 64, la cual forma un parche positivo en el extremo C-terminal junto con la Lys63. Para Cn2, este parche se encuentra menos conservado y se encuentra formado por la Lys63 y la Pro61 (Fig.9). Adicional a esto, el residuo Glu15 en Cn2, reemplazado en Cl13 por Thr15, se conoce que juega un papel importante en la actividad de toxinas  $\beta$  en términos de toxicidad (IZHAR et al. 2004; Schiavon et al. 2012). En la figura 9 se puede observar que tanto en Cn2 como en Cl13 estos aminoácidos se encuentran expuestos, sin embargo, la superficie cargada negativamente en esta zona es diferente, puesto que Cl13 muestra una gran región cargada negativamente en comparación con Cn2 y Cn2. Estas diferencias clave entre Cn2 y Cl13 podrían explicar la falta de interacción entre scFv y la toxina Cl13



**Figura 9.** Comparación entre las superficies culómbicas de A) Cl13, B) Cn2 y C) Ccs2. Las regions cargadas positivamente se muestran en azul, y las cargadas negativamente en rojo.

Cabe recordar que, los anticuerpos de cadena simple de humano tienen la capacidad de neutralizar a Cl11 y Cl12; dos toxinas beta (Riaño-Umbarila et al. 2005) y una mezcla de estos dos fragmentos de anticuerpos no son capaces de proteger completamente del veneno completo soluble de *C. limpidus*, contrario a lo que ocurre con la toxina Cn2 de *C. noxius*. Por esta razón el componente menor fue aislado, secuenciado y caracterizado fisiológicamente (Olamendi-Portugal et al. 2017). El cual es muy tóxico sobre ratón. Cl13 es uno de los componentes más tóxicos que han sido estudiados junto con Cn2; lo cual sugiere que hay otros residuos en la toxina que contribuyen en la interacción y alteración del funcionamiento de los canales de sodio previamente mencionados.

Este estudio muestra que, la estructura tridimensional de la Cl13 es muy similar a las estructuras de la Cn2 y Css2. También sugiere que las estructuras de la Cl11 y Cl12, para las cuales no se conoce aún su estructura tridimensional, son similares a la de Cl13 teniendo en cuenta la alta similitud en estructura primaria que existe entre estas toxinas, (Figura 7). Como se reportó previamente (Olamendi-Portugal et al. 2017), las tres posiciones llamadas 7-9, 30-38 y 62-66, para las que se ha reportado que son diferentes en la Cl13 comparado con las dos toxinas Cl11 y Cl12, podrían ser responsables de la falta de eficiencia de los anticuerpos de cadena sencilla para neutralizar estas regiones: 7-9, 30-38 y 62-66.

## 2.5 CONCLUSIÓN

Se realizó la asignación de los desplazamientos químicos de todos los protones y se obtuvo la estructura tridimensional de la toxina Cl13 nativa, la cual mostró un motivo estructural  $\alpha/\beta$  estabilizado por cisteínas (CS  $\alpha/\beta$ ) comúnmente encontrado en las toxinas-beta bloqueadoras de canales de sodio. La comparación estructural entre Cl13, Cn2 y Css2 muestra que, las tres toxinas beta bloqueadoras de canales de sodio; activas sobre mamíferos comparten una estructura y superficie hidrofóbica similar, así como también, algunas regiones positivas conservadas junto con una gran región negativa para la Cl13, lo cual sugiere que la actividad de estas proteínas estabilizadas por enlaces disulfuro se encuentra regulada por diferentes interfaces de interacción. De hecho, los tres tramos ya señalados, así como la naturaleza del residuo en la posición 15, que para la Cl13 es Thr, mientras que en las otras toxinas es Glu, podrían ser responsables de la falta de eficiencia de los anticuerpos protectores de cadena sencilla para la neutralización total de toxinas del veneno *Centruroides limpidus*.

Los resultados correspondientes a este proyecto se encuentran publicados en: López-Giraldo, A. E. *et al.* (2020) 'The three-dimensional structure of the toxic peptide Cl13 from the scorpion *Centruroides limpidus*', *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 184(June), pp. 158–166. doi: 10.1016/j.toxicon.2020.06.011.

## **CAPITULO 3. Caracterización estructural mediante resonancia magnética nuclear del extremo N-terminal y C-terminal de la escorpina proveniente del alacrán *Pandinus imperator*.**

### 3.1 INTRODUCCIÓN

Los péptidos activos provenientes de alacrán juegan un papel importante en la defensa innata del huésped y han mostrado actividad contra un amplio espectro de organismos, incluyendo bacterias gram negativas, hongos filamentosos, parásitos y virus (S Zhu and Tytgat 2004). Adicional a esto, estos péptidos han sido clasificados en

diferentes grupos de acuerdo a su composición y estructura, resaltando los péptidos lineales  $\alpha$ -helicoidales como las cecropinas y los péptidos ricos en cisteínas que forman enlaces disulfuro como las defensinas(S Zhu and Tytgat 2004; Vizioli and Salzet 2002).

Teniendo en cuenta estos dos grupos, se determinó un péptido con características híbridas, llamado escorpina, el cual en su estructura primaria reveló una secuencia extendida similar a la de las cecropinas en el amino terminal, una zona rica en cisteínas y un posible motivo estructural  $\alpha/\beta$ (Conde, R., Zamudio, F. Z., Rodríguez, M. H., and Possani 2000).

La escorpina es un péptido de 75 aminoácidos aislado en el 2000, del veneno del alacrán africano *Pandinus imperator* por Conde y colaboradores (Conde, R., Zamudio, F. Z., Rodríguez, M. H., and Possani 2000). La escorpina representó un nuevo grupo de péptidos antimicrobiales de cadena larga llamado “péptidos tipo escorpina”, así como también una importante molécula de estudio en contra la malaria; debido a que es 100 veces más activa que otras moléculas reportadas a la fecha(Possani, Corona, and Rodríguez 2002; Conde, R., Zamudio, F. Z., Rodríguez, M. H., and Possani 2000).

Subsecuentemente, se identificaron péptidos homólogos a la escorpina, entre ellos la Opiscorpina 1-4 del escorpión *Opisthophthalmus carinatus*(S Zhu and Tytgat 2004), la Heteroscorpina-1 del escorpión *Heterometrus laoticus*(Uawonggul, Thammassirirak, and Chaveerach 2007) y la HgeScplp del escorpión *American Hadrurus gertschi*(Schwartz et al. 2007; Elia Diego-García et al. 2007). Cabe resaltar que, esta familia ha sido muy poco estudiada a nivel estructural y funcional. Puesto que, a nivel estructural hasta el momento solo se conoce la estructura tridimensional del extremo C-terminal del péptido tipo escorpina Hge36 (Flores-Solis et al. 2016) y a nivel funcional; se ha resaltado la funcionalidad híbrida de estos péptidos tipo escorpina, debido a que, se han desarrollado estudios donde la posible actividad neurotóxica está enmascarada por la función antimicrobiana o citolítica. Como ejemplo, se ha observado que al eliminar una secuencia del N-terminal, la actividad de bloqueo del canal de potasio es adquirida por el péptido tipo escorpina HgeScplp1 y la actividad de bloqueo es disminuida por Ev37. Este tipo de comportamiento también se ha observado para la actividad antimicrobiana(Feng et al. 2013; E. Diego-García et al. 2008).

### **3.2 HIPÓTESIS**

*Las estructuras tridimensionales de los extremos N y C-terminal de la escorpina permitirán determinar posibles bases moleculares relacionadas con la función biológica asociada a cada dominio.*

### **3.3 OBJETIVOS**

#### **3.3.1 OBJETIVO GENERAL**

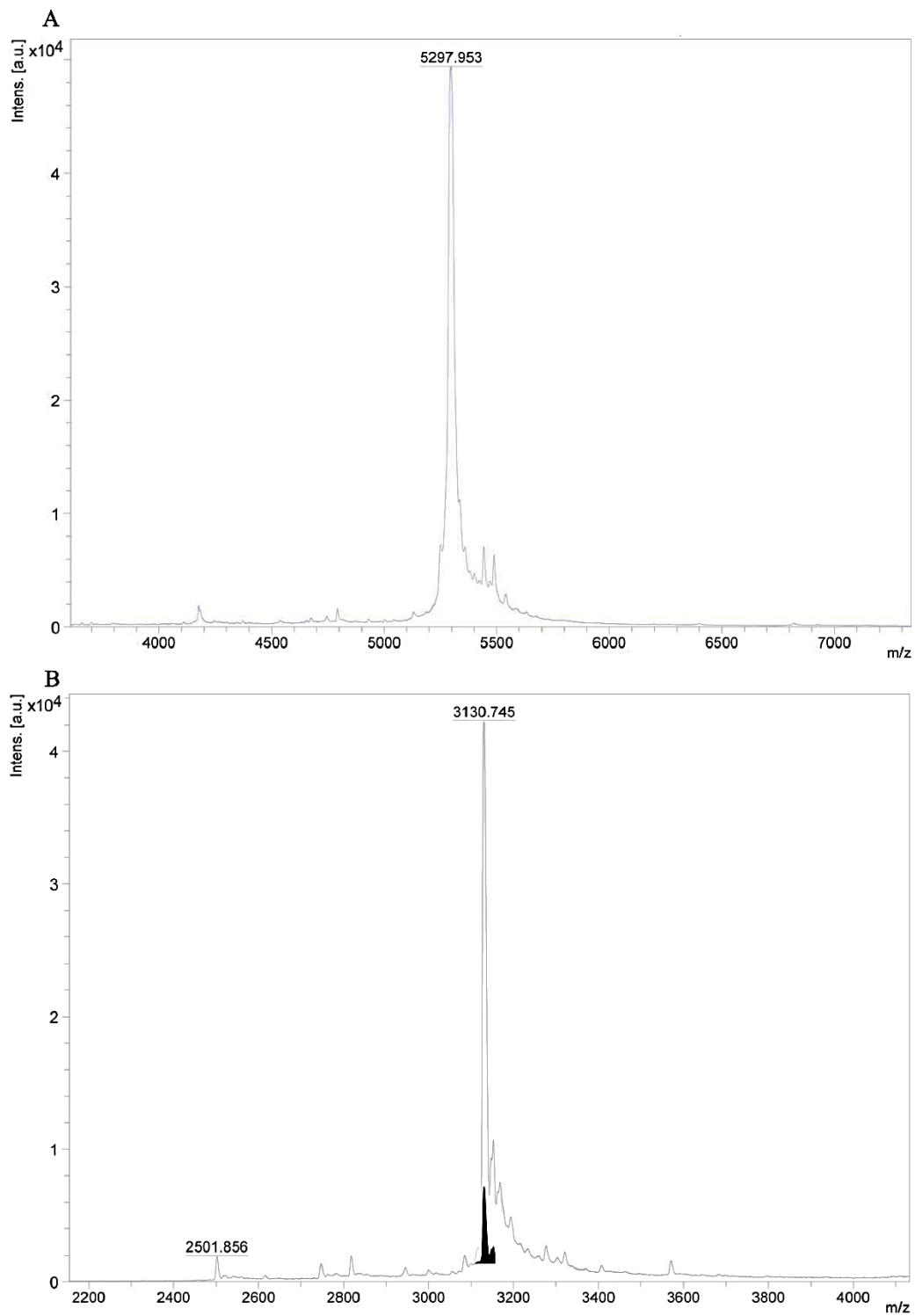
Obtener la estructura tridimensional de menor energía de los extremos N-terminal y C-terminal de la escorpina empleando RMN 2D en disolución.

#### **3.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Procesar los espectros de RMN necesarios para la caracterización estructural de los extremos N-terminal y C-terminal de la escorpina.
- Interpretar los experimentos multidimensionales de RMN.
- Asignar todos los sistemas de espín en los espectros de RMN para los extremos N-terminal y C-terminal de la escorpina.
- Obtener la estructura tridimensional experimental de menor energía para cada extremo de la escorpina.
- Afinar mediante dinámica molecular las estructuras obtenidas.
- Realizar un análisis estructural para las estructuras tridimensionales obtenidas.

### **3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los dominios individuales C-terminal (nombrado C-escorpina) (posición 29-75) y N-terminal (nombrado N-escorpina) (posición 1-28) fueron expresados individualmente en *E. coli*, las dos secuencias continuas comprenden la secuencia completa de la proteína. Sin embargo, se obtuvo a C-escorpina con una glicina extra al comienzo de la secuencia, como resultado de la digestión con TEV. En la figura 10 se presentan los espectros de masas obtenidos para C-escorpina y N-escorpina luego de ser purificadas mediante RP-HPLC por el M. en C Alland Colorado, egresado del posgrado en Ciencias Químicas.

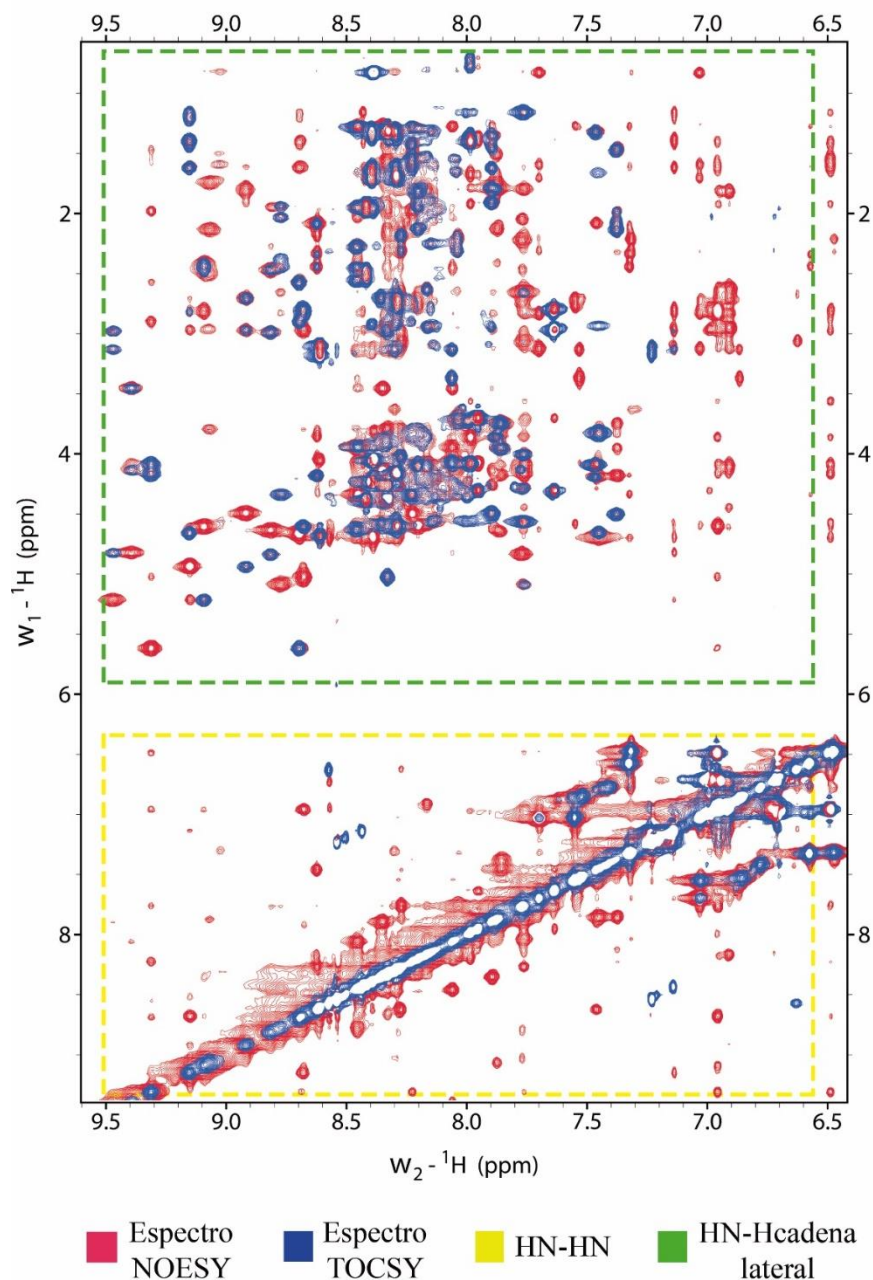


**Figura 10.** Espectros de masas MALDI-TOF obtenidos para A. *C*-escorpina y B. *N*-escorpina disueltas en agua desionizada con 15% acetonitrilo, empleando un instrumento LCQFleet, de Thermo Fisher Inc, modo lineal.



Las condiciones de la muestra de RMN de N-escorpina se seleccionaron considerando que, este dominio presenta una conformación desordenada en agua y su contenido de hélice- $\alpha$  aumenta en gran medida en presencia de trifluoroetanol al 50%, el cual simula el ambiente químico de la membrana (Gao et al. 2009; Kozlov et al. 2006).

Los espectros NOESY con tiempo de mezclado de 150 ms y TOCSY de 80 ms mostraron una buena dispersión de las señales (Fig. 11), lo que permitió identificar 47 de 48 sistemas de espín de los residuos de aminoácidos para el dominio C-escorpina y 27 de 28 sistemas de espín para el dominio N-escorpina. El porcentaje de asignación de  $^1\text{H}$  para C-escorpina y N-escorpina fue de 91% y 93% respectivamente, utilizando las muestras con abundancia natural.



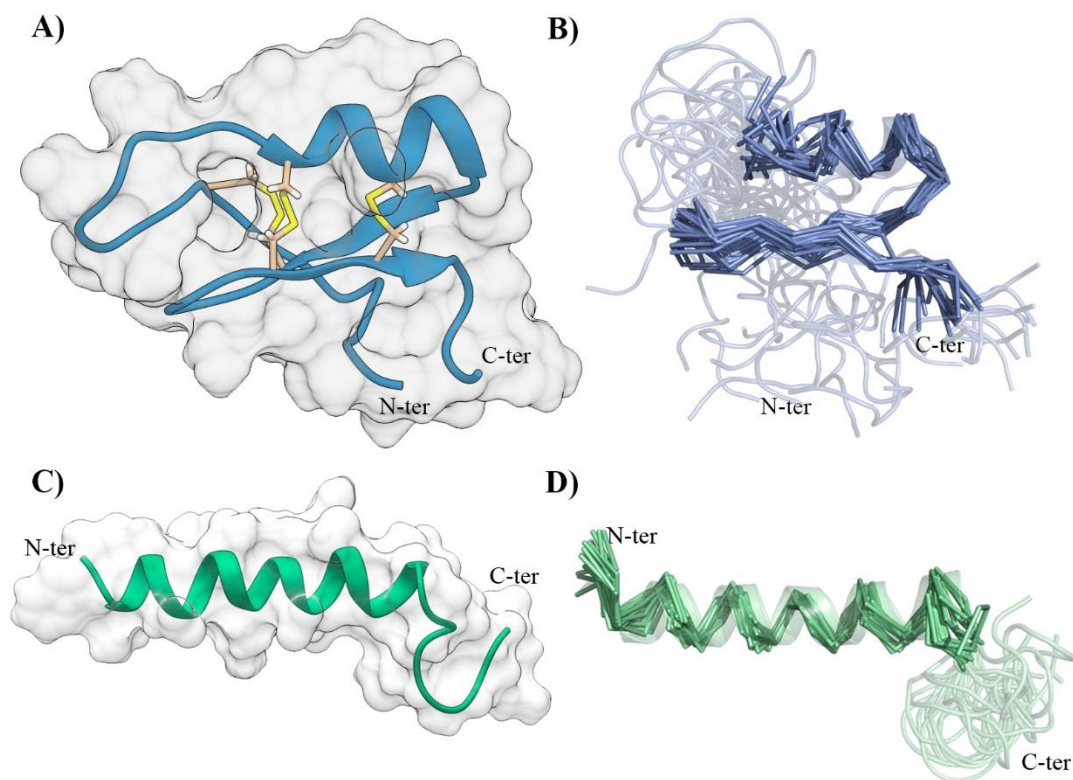
**Figura 11.** Espectros de RMN de C-escorpina. En color fucsia se muestra el espectro NOESY de 150 ms y en azul el TOCSY de 80 ms adquiridos en un espectrómetro Daltonics de 700 MHz (Bruker Biospin, Billerica, MA, EE. UU.) Con un campo magnético de 16,4 Tesla a 298 K. Las señales correspondientes a correlaciones HN-HN se encuentran dentro del recuadro amarillo. Las señales correspondientes a las correlaciones HN con los protones de la cadena lateral se encuentran dentro del recuadro verde.

La estructura tridimensional de C-escorpina (Figura 12A-B) se obtuvo a partir de 1328 NOEs asignados fuera de la diagonal; 93 de ellos son NOEs de larga distancia  $|i-j| \geq 5$ , 102 son NOEs de mediana distancia  $1 < |i-j| < 5$  y 1133 son NOEs de corta

distancia  $|i-j| \leq 1$  (Figura 13). Adicional a esto, 21 constantes de acoplamiento HN-H $\alpha$ . La estructura tridimensional de N-escorpina (Fig. 12C-D) se obtuvo a partir de 1.249 NOEs asignados fuera de la diagonal; 2 de ellos son NOEs de larga distancia  $|i-j| \geq 5$ , 243 son NOEs de mediana distancia  $1 < |i-j| < 5$  y 1004 son NOEs de corta distancia  $|i-j| \leq 1$ , así como 8 constantes de acoplamiento HN-H $\alpha$ .

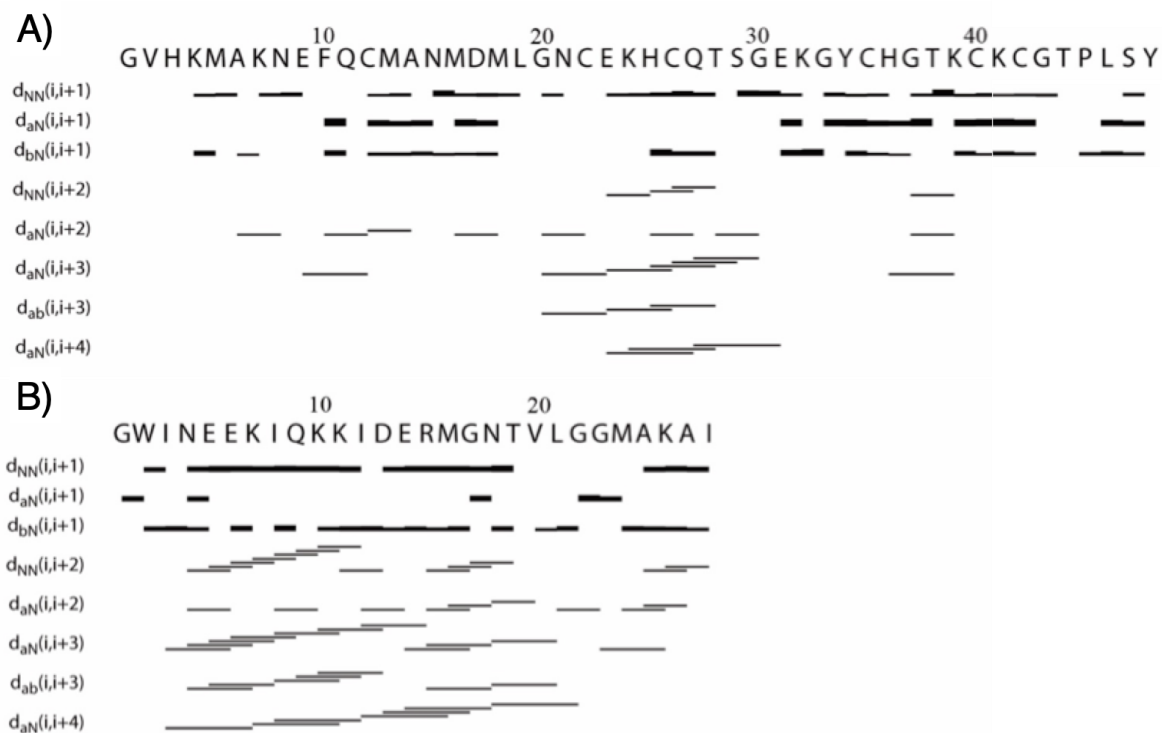
La Figura 12A muestra la estructura tridimensional de C-escorpina, la cual presenta un motivo estructural  $\alpha/\beta$  estabilizado por cisteínas (CS  $\alpha/\beta$ ), una hélice- $\alpha$  (Asn21-Thr28), una hoja- $\beta$  antiparalela de doble hebra (Lys32-Cys35 y Cys40-Gly43), dos giros ( $\alpha 1$ -  $\beta 1$  y  $\beta 1$ - $\beta 2$ ), tres enlaces disulfuro (Cys12-Cys35, Cys22-Cys40 y Cys26-Cys42) y una región "random coil" (Gly1-Gly20). La figura 12B muestra la sobreposición de las 20 estructuras de menor energía. La Figura 12C muestra la estructura tridimensional de N-escorpina, la cual presenta una hélice alfa típica en su estructura secundaria (Ile3-Thr19). La figura 12D muestra la sobreposición de las 20 estructuras de menor energía para N-escorpina.

El RMSD de la cadena principal fue de 0.46 y 0.52 para C-escorpina (calculada de 22 aa a 45 aa) y para N-escorpina (calculada de 3 aa a 26 aa) respectivamente. De la misma manera, considerando los átomos pesados el RMSD fue de 0.83 y 0.95 para C-escorpina y para N-escorpina respectivamente.

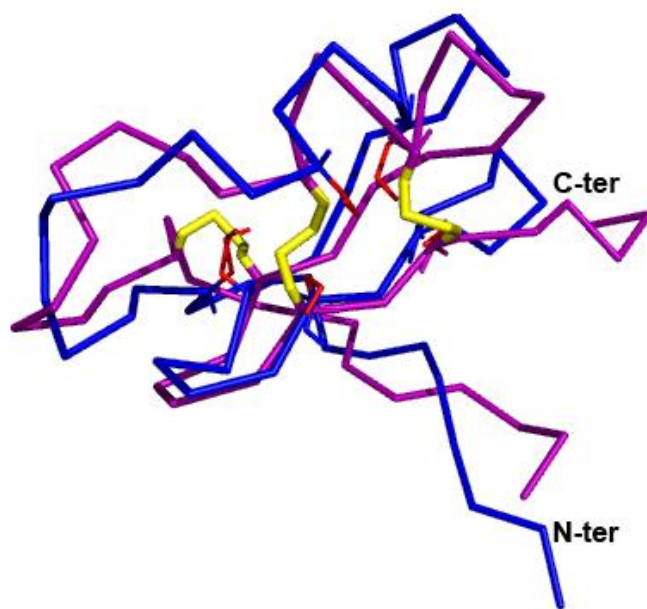


**Figura 12.** Estructura de menor energía obtenida para la A) C-escorpina y C) N-escorpina, los enlaces disulfuro se muestran en color amarillo. Sobreposición de las 20 estructuras de menor energía obtenidas para la B) C-escorpina y D) N-escorpina.

Para confirmar la conectividad de los enlaces disulfuro de la C-escorpina, se corrieron dos cálculos estructurales diferentes, el primero con las restricciones de la conectividad de las cisteínas y el segundo cálculo sin estas restricciones (Cys12-Cys35, Cys22-Cys40 y Cys26-Cys42) relativo a la estructura primaria. Los dos cálculos convergieron en estructuras altamente similares, Fig. 14. Las restricciones de la conexión de las cisteínas usadas fueron observadas por RMN. Debido a que, se observaron claramente NOE's entre  $H_{\beta i}$ - $H_{\beta j}$  y  $H_{\alpha i}$ - $H_{\beta j}$  de las cisteínas presentes en los enlaces disulfuro entre Cys12-Cys35 y Cys26-Cys642, mientras que solo fueron observados NOE's  $H_{\alpha i}$ - $H_{\beta j}$  entre (Cys22-Cys40) debido al traslape de señales en las regiones  $H_{\beta i}$ - $H_{\beta j}$  cerca de la diagonal. En la figura 15 se presenta la correlación NOE Cys26  $H_{\beta}$  y-Cys42  $H_{\beta}$ , en la cual es posible observar que no existe traslape de señales que pueda dificultar la interpretación.

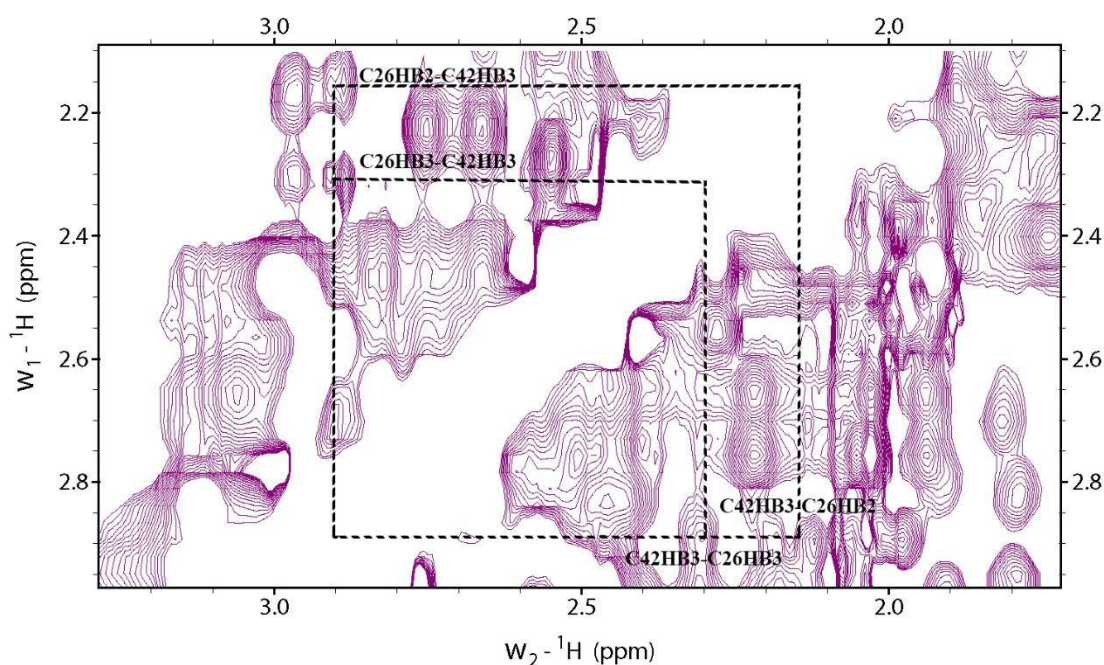


**Figura 13.** NOE's utilizados para el cálculo estructural. A) C-escorpina y B) N-escorpina. Las líneas gruesas, medianas y delgadas corresponden a NOE's de corta, mediana y larga distancia.



**Figura 14.** Sobreposición de las estructuras de C-escorpina obtenidas de cálculos con (morado) y sin restricción de enlaces disulfuro (azul). En Amarillo se presentan las cisteínas oxidadas y en rojo las cisteínas reducidas. Ambas estructuras convergen a una conformación similar.

Estas señales NOE's junto con los cálculos estructurales indican que las cisteínas se encuentran cercanas y probablemente se encuentran formando un enlace entre ellas. Considerando estos resultados y teniendo en cuenta que esta conectividad de enlaces disulfuro es similar a la de otras  $\beta$ -toxinas con estructura conocida, nosotros agregamos las restricciones de enlace disulfuro a el cálculo final.



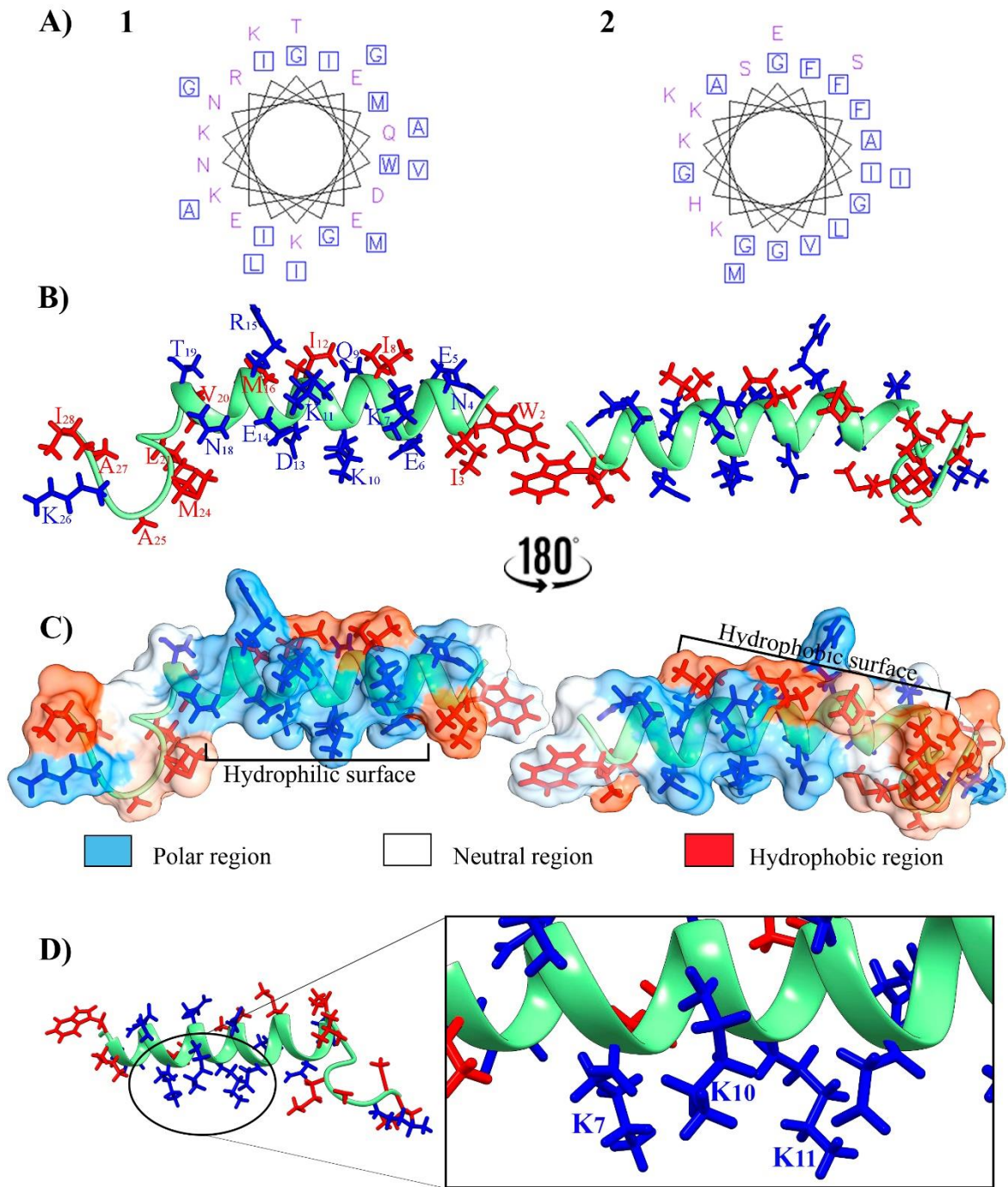
**Figura 15.** Región  $H\beta$ - $H\beta$  del espectro 2D NOESY de la correlación del enlace disulfuro Cys42-Cys26 obtenida para el experimento de C-escorpina con 150 ms tiempo de mezclado, 298 K y 5mM; las asignaciones se encuentran resaltadas en negro.

Una de las características más importantes del  $\beta$ -KTx, y especialmente de los péptidos tipo escorpina, es la presencia de dos dominios estructurales, un dominio N-terminal no estructurado, el cual es capaz de formar una hélice- $\alpha$  al interactuar con la membrana y un dominio C-terminal con el plegamiento característico  $\alpha/\beta$  estabilizado por cisteínas; aparentemente responsable del bloqueo de los canales de potasio (Feng et al. 2013; E. Diego-García et al. 2008). Adicional a esto, se ha reportado que la actividad citolítica observada en los péptidos tipo escorpina, es generada por el dominio N-terminal (E. Diego-García et al. 2008). Por lo tanto, mediante los experimentos electrofisiológicos desarrollados en colaboración con la doctora Elisa Carrillo, los cuales serán publicados junto con los resultados aquí mostrados; se determinó que la actividad citolítica de la escorpina es clara y se observa una reducción de la actividad al remover el extremo N-terminal, de esta manera reafirmando el efecto que el dominio presenta en la escorpina.

Teniendo en cuenta estos resultados, se estudió la anfipaticidad de la N-escorpina, debido a que es una característica reportada como requisito estructural, que confiere actividad citolítica a péptidos similares(Gao et al. 2009) y se han reportado algunos péptidos lineales catiónicos contra la malaria, entre ellos meucin-24, meucin-25(Gao et al. 2010), meucin-3, meucin-18(Gao et al. 2009) *Mesobuthus eupeus*, magainin 2(Gao et al. 2010), entre otros. Por lo tanto, se determinó que N-escorpina no muestra un claro diseño anfipático helicoidal (Fig. 16), el cual es un arreglo estructural en el cual los residuos positivos e hidrofílicos se encuentran separados de los residuos hidrofóbicos en dos dominios discretos(Zaslhoff 2019), adicional a esto Meucin-3 y meucin-18 también presentan actividad citolítica como la N-escorpina. Sin embargo, estos resultados sugieren que el balance de aminoácidos hidrofóbicos/hidrofílicos encontrado en la N-escorpina podría ser suficiente para proporcionarle esta actividad (Fig. 16A-B).

Por otro lado, se ha reportado que cierta región hidrofóbica presente en algunos péptidos, es una característica correlacionada con la pérdida de la actividad citolítica(Dathe and Wieprecht 1999). En la figura 16B se puede observar que N-escorpina presenta la característica opuesta, puesto que existe un exceso de superficie hidrofílica, lo cual podría incrementar el potencial de interactuar con membranas negativas.

También se observó que la N-escorpina presenta tres residuos catiónicos (Lys7) (Lys10) (Lys11), los cuales se encuentran estructuralmente adyacentes, hecho similar observado para la meucina 18(Gao et al. 2009). Por lo que consideramos que, las bases estructurales de la interacción con las membranas de las células cargadas negativamente; podrían estar relacionados con estos residuos expuestos en la superficie molecular (Fig. 16C).



**Figura 16.** A.1) Proyección helicoidal de N-escorpina. A.2) Proyección helicoidal de magainin 2, la cual presenta arreglo helicoidal, ambas proyecciones se realizaron con emboss-bug © emboss.open-bio.org. B) Diagrama de cinta de la estructura de menor energía de la N-escorpina. Residuos hidrófobos rojos; residuos hidrofílicos azules. C) Superficie hidrofóbica de la N-escorpina. Las superficies se colorearon de acuerdo con una escala de tres colores donde el azul indica una región polar, el blanco una región neutra y



*el naranja una región hidrófoba. D) Amplificación de la zona con las lisinas expuestas. Esto sugiere que, la organización de los residuos hidrófilos cargados positivamente y los residuos hidrófobos en la construcción helicoidal, podría ser una característica importante en la actividad citolítica de los péptidos catiónicos*

### **3.4 CONCLUSIÓN**

C-escorpina mostró un dominio C-terminal con un motivo estructural  $\alpha/\beta$  estabilizado por cisteínas (CS- $\alpha/\beta$ ). Además, N-escorpina presentó una conformación “random coil” en agua, sin embargo, en presencia de 50% de TFE el contenido de hélice- $\alpha$  incrementó en gran medida. En consecuencia, la estructura tridimensional de N-escorpina mostró una estructura  $\alpha$ -helicoidal, así como tres residuos catiónicos expuestos estructuralmente que podrían interactuar con los residuos cargados negativamente de las membranas celulares.

El artículo correspondiente a los resultados obtenidos para este proyecto, que involucra también ensayos de actividad no mencionadas aquí se encuentra en preparación como:

*Structural and Functional Studies Reveal the Presence of Two Different Activities for Scorpine: One Blocking Channel Activity and One Cytolytic Activity*

Estefanía López-Giraldo, Elisa Carrillo, Gustavo Titaux Delgado, Patricia Cano-Sánchez, Alland Colorado, Lourival Possani-Postay and Federico del Río-Portilla

## **CAPITULO 4. Expresión, purificación y caracterización estructural de la toxina TcoKIK.**

### **4.1 INTRODUCCIÓN**

Los alacranes han venido evolucionando por un largo tiempo, esto a su vez, les ha permitido optimizar la producción de péptidos tóxicos; los cuales son efectivos sobre una gran variedad de organismos. Uno de sus blancos principales son los canales iónicos de células excitables; sobre los cuales causan despolarización anormal de las células, interfiriendo con las vías de conductancia iónica de las membranas excitables (Possani, Corona, and Rodríguez 2002; Possani et al. 2001).

Para las toxinas de veneno de alacrán, se han discutido diferentes clasificaciones (Zeng, Corzo, and Hahin 2005; Luo et al. 2005; Elia Diego-García et al. 2007). Para interés de este proyecto, nos centraremos en la clasificación sistemática propuesta para las toxinas activas sobre canales de K<sup>+</sup>, donde inicialmente se clasificaron las toxinas TsTX-Kb (Rogowski et al. 1994), AaTX-Kb (Legros et al. 1998) y similares en la subfamilia 1 de una nueva familia llamada  $\beta$ -KTx y péptidos tipo escorpina (Tytgat et al. 1999; E. Diego-García et al. 2008). A continuación, se clasificaron en la subfamilia 2 de las  $\beta$ -KTx a la BmTXKb del alacrán Asiático *Mesobuthus martensi* (Shunyi Zhu et al. 1999) y similares. Por último, se clasificaron en la subfamilia 3 a los péptidos tipo escorpina (Ortiz and Possani 2018; Rogowski et al. 1994).

La toxina TcoKIK del escorpión Sur Americano *Tityus costatus* (Elia Diego-García et al. 2005; 2007), fue clasificada en la subfamilia 2 de las  $\beta$ -KTx; debido a que presenta una alta similitud en estructura primaria con la BmTXKb, sugiriendo que son genes ortólogos (Elia Diego-García et al. 2007). A la fecha la única información reportada para la TcoKIK es que presenta una masa de 5278,5 Da y una secuencia de aminoácidos muy similar a la de la toxina BmTXKb (Elia Diego-García et al. 2007).

### **4.2 HIPÓTESIS**

*La estructura tridimensional de la TcoKIK presentará el motivo estructural CS  $\alpha/\beta$  convencional para las toxinas  $\beta$ -ktx.*

### **4.3 OBJETIVOS**

#### **4.3.1 OBJETIVO GENERAL**

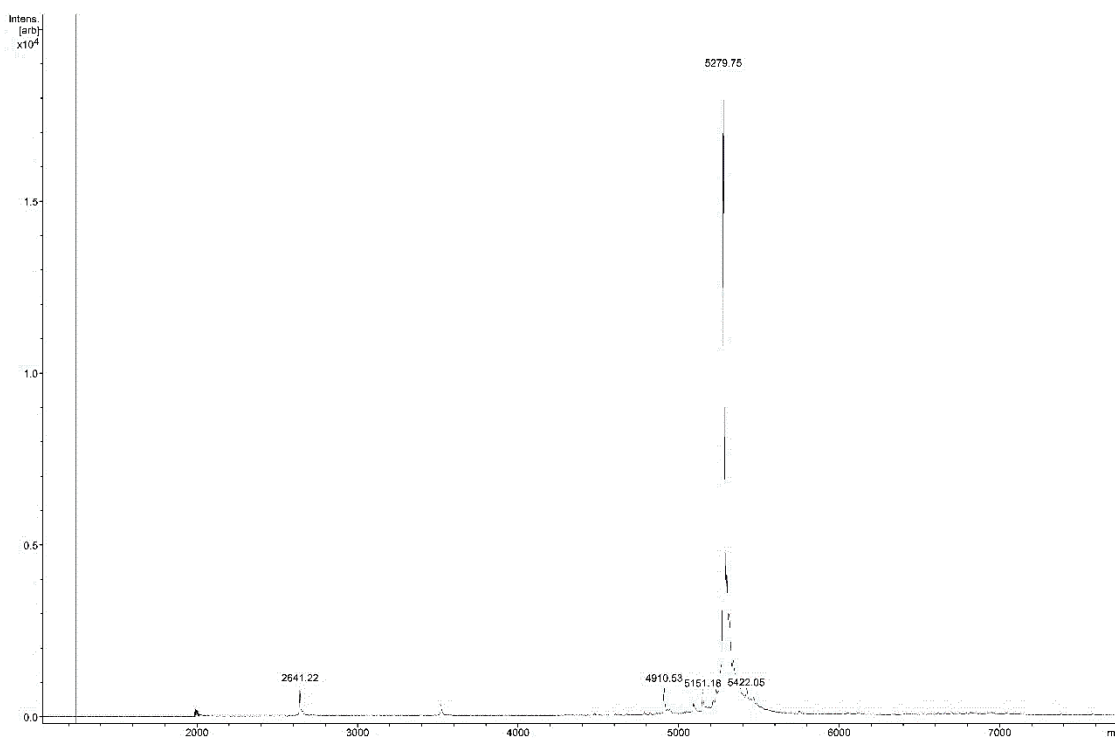
Obtener la estructura tridimensional de menor energía de la toxina TcoKIK empleando RMN 2D y 3D en disolución.

### 4.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Procesar los espectros de RMN necesarios para la caracterización estructural de la TcoKIK.
- Interpretar los experimentos multidimensionales de RMN.
- Asignar todos los sistemas de espín en los espectros de RMN.
- Obtener la estructura tridimensional experimental de menor energía para la TcoKIK.
- Afinar mediante dinámica molecular las 20 estructuras obtenidas.
- Realizar un análisis estructural para la toxina TcoKIK.

### 4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

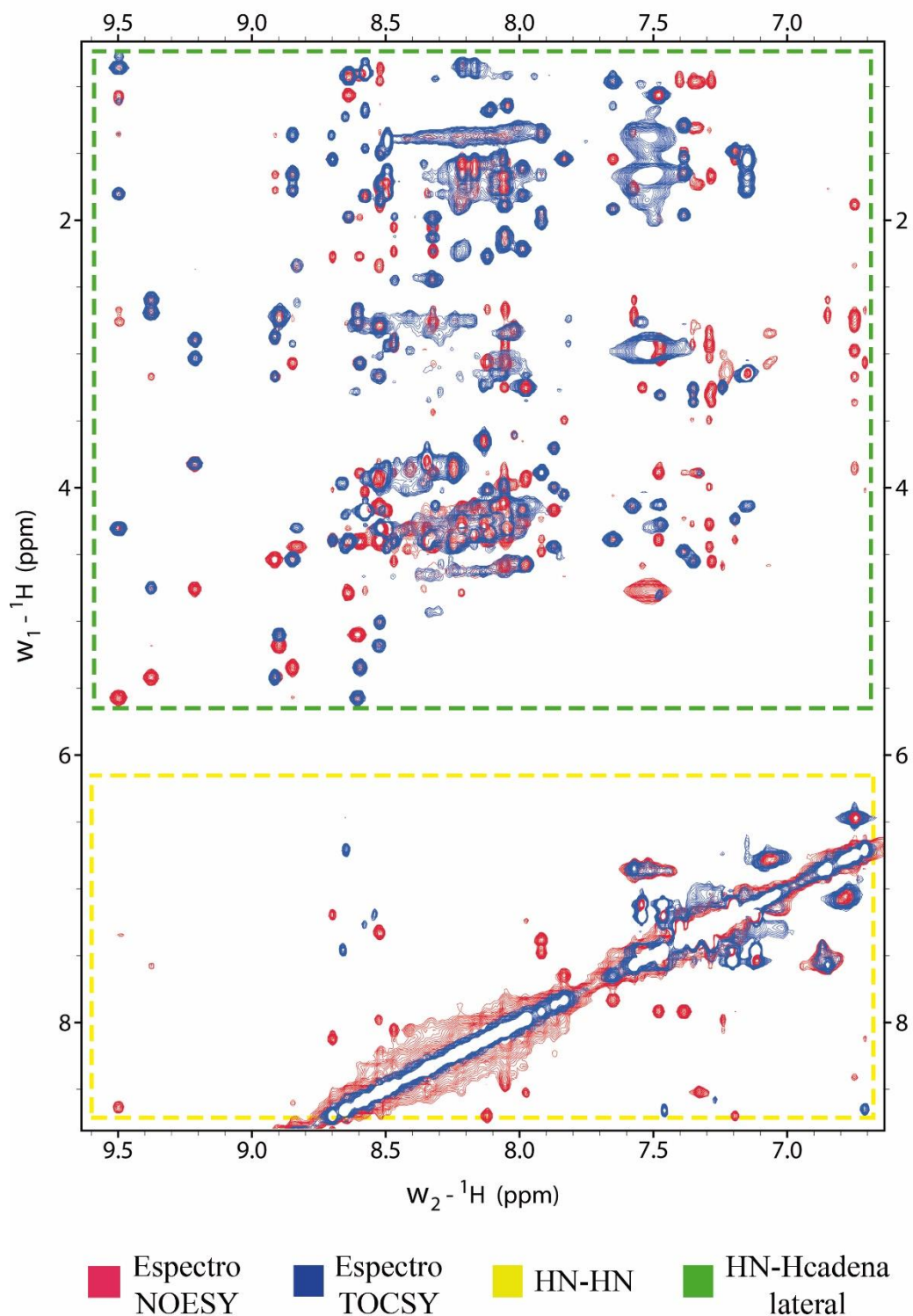
La toxina TcoKIK fue expresada en *E. coli* y purificada mediante diferentes técnicas cromatográficas, confirmándose su masa mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Fig. 17).



**Figura 17.** Espectro de masas MALDI-TOF de la toxina TcoKIK disuelta en agua desionizada con 15% acetonitrilo, empleando un instrumento LCQFleet, de Thermo Fisher Inc, modo lineal.

Los experimentos TOCSY de 80 ms y NOESY de 150 ms de tiempo de mezclado (Fig. 18) mostraron una dispersión de las señales aceptable, por lo cual fue posible asignar 46 de 47 residuos de aminoácidos. La estructura tridimensional de la TcoKIK

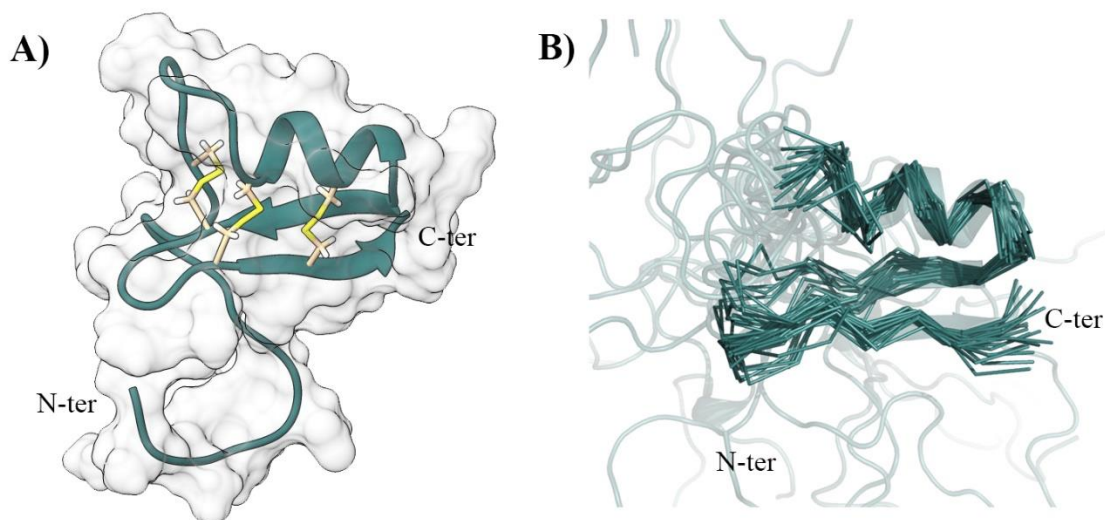
(Figura 19) se obtuvo a partir de 454 NOEs asignados fuera de la diagonal; 53 de ellos son NOEs de larga distancia  $|i-j| \geq 5$ , 71 son NOEs de mediana distancia  $1 < |i-j| < 5$  y 330 son NOEs de corta distancia  $|i-j| \leq 1$ .



**Figura 18.** Espectros de RMN de TcoKIK. En color fucsia se muestra el espectro NOESY de 150 ms y en azul el TOCSY de 80 ms adquiridos en espectrómetro Daltonics de 700 MHz (Bruker Biospin, Billerica, MA, EE. UU.) Con un campo magnético de 16,4 Tesla a 298 K.

Las señales correspondientes a correlaciones HN-HN se encuentran dentro del recuadro amarillo. Las señales correspondientes a las correlaciones HN con los protones de la cadena lateral se encuentran dentro del recuadro verde.

La estructura tridimensional de la TcoKIK (Fig. 19A) presenta una hélice- $\alpha$  (Lys22-Lys31) junto con una hoja- $\beta$  antiparalela formada por dos hebras (Ala33-Gly35 y Cys44-Lys46), así como también una región desestructurada en el extremo N-terminal. La figura 19B muestra la sobreposición de las 20 estructuras de menor energía obtenidas para TcoKIK. El RMSD de la cadena principal fue de 0.84 y considerando los átomos pesados el RMSD fue de 1.55.



**Figura 19.** A) Estructura de menor energía obtenida para la TcoKIK, los enlaces disulfuro se muestran en color amarillo. B) Sobreposición de las 20 estructuras de menor energía obtenidas para la TcoKIK.

Actualmente, se considera que las toxinas del grupo 2 de la familia de las  $\beta$ -KTx's, al cual pertenece la TcoKIK, presentan un extremo N-terminal, el cual a su vez forma 2 hélices alfa que interactúan con membranas celulares, lo cual le confiere actividad citolítica o antimicrobial (S Zhu and Tytgat 2004). Adicional a esto, se ha reportado que poseen un extremo C-terminal, el cual presenta un motivo estructural CS  $\alpha/\beta$  responsable de la actividad bloqueadora de canales iónicos de potasio, sin embargo, no es claro aún si estos dominios presentan un efecto sinérgico o independiente (Gao et al. 2010; Chen et al. 2013). En comparación con esta información, se determinó que la TcoKIK presenta el motivo estructural CS  $\alpha/\beta$  en el extremo C-terminal, similar a lo reportado; mientras que el extremo N-terminal se encuentra desestructurado (Fig.19). A pesar de que fueron probadas diferentes condiciones, variando el amortiguador, la temperatura y agregando TFA se determinó que la mayor dispersión de señales se observó con el amortiguador PBS pH: 7.5.

Por otro lado, fue posible determinar en colaboración con la doctora Elisa Carrillo que a pesar de que para TcoKIK no se pudo medir actividad bloqueadora sobre los canales KCNQ1 y Shaker, se observó un incremento en la corriente de fuga, el cual es un fenómeno también observado en células no transfectadas. Este efecto es explicado por la posible interacción de la toxina con la membrana, lo que promueve la formación de poro y a su vez incrementa la corriente de fuga. Cabe mencionar que este tipo de actividad no ha sido observado aún para otras toxinas  $\beta$ -KTx. Sin embargo, ha sido observado en algunas escorpinas del grupo 3, y le atribuyen este efecto al extremo N-terminal. Hasta antes de este estudio, no existía información reportada para TcoKIK acerca de su actividad o de su estructura tridimensional, así como tampoco se ha reportado la estructura tridimensional de alguna de las toxinas pertenecientes a este grupo.

#### **4.5 CONCLUSIÓN**

La estructura tridimensional de TcoKIK mostró en la región C-terminal el motivo estructural CS  $\alpha/\beta$  convencional para las toxinas  $\beta$ , mientras que la región del N-terminal se encuentra desestructurada. La toxina TcoKIK se espera forma parte del primer reporte de estructuras tridimensionales obtenidas para el segundo grupo de  $\beta$ -KTx. Adicional a esto, se determinó que TcoKIK produce daño sobre las membranas de células transfectadas, el cual es un comportamiento encontrado en péptidos tipo escorpina, tal como se discute en el capítulo 2 de esta tesis.

Los resultados correspondientes a este proyecto están en proceso de publicación como:

*Beta-KTx14.3, a large scorpion toxin, blocks the human potassium channel KCNQ1*

Gustavo Titaux-Delgado\*, Andrea Estefanía Lopez-Giraldo\*, Elisa Carrillo, Luis Fernando Cofas-Vargas, Luis Enrique Carranza, Estuardo López-Vera, Enrique García-Hernández and Federico del Rio-Portilla.

*\*Ambos como primer autor*





## **CAPITULO 5. Colaboración: Estructura tridimensional de la neurotoxina SCNTX**

### **5.1 INTRODUCCIÓN**

SCNTX es una neurotoxina- $\alpha$  de cadena corta propuesta con base en un alineamiento de secuencia múltiple, en el cual fueron consideradas las 12 neurotoxinas- $\alpha$  presentes en los venenos de serpientes de los géneros *elapid Acanthophis*, *Oxyuranus*, *Walterinnesia*, *Naja*, *Dendroaspis* y *Micrurus*. SCNTX contiene 60 aminoácidos, incluidos 8 residuos de cisteínas. Se conoce que SCNTX puede antagonizar los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) musculares, pero no los neuronales. Adicional a esto, para un estudio realizado para la SCNTX con dieciséis aminoácidos adicionales en su extremo N-terminal, se determinó que posee un LD50 de 3.8  $\mu\text{g}$  / ratón, similar al de las neurotoxinas- $\alpha$  más tóxicas de cadena corta reportadas para los venenos del género *elapid*(de la Rosa et al. 2018; Gulsevin and Meiler 2020a). Por otro lado, en un estudio teórico realizado previamente se determinó mediante docking que la arginina 31 de la SCNTX (ubicada en la posición 47 de la secuencia de la SCNTX con 16 aminoácidos de más) se extiende dentro de un agujero aromático presente en los receptores  $\alpha 7$  nAChR, permitiendo la interacción con los residuos Y188, Y195 y W149(Gulsevin and Meiler 2020a). Por tal motivo se espera que este residuo cargado positivamente se encuentre expuesto al disolvente en la estructura tridimensional obtenida de manera experimental.

Este proyecto fue desarrollado en colaboración con el Dr. Gerardo Corzo Burguete del Instituto de Biotecnología de la UNAM y el Dr. Guillermo de la Rosa de la Universidad de Toronto. Por lo cual fue posible determinar mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear la estructura en disolución de la neurotoxina SCNTX de 76 residuos.

### **5.2 HIPÓTESIS**

*La arginina 47 se encontrará expuesta al disolvente en la estructura tridimensional de la SCNTX.*

### **5.3 OBJETIVOS**

#### **5.3.1 OBJETIVO GENERAL**

Obtener la estructura tridimensional de menor energía de la neurotoxina SCNTX empleando RMN 2D y 3D en disolución.

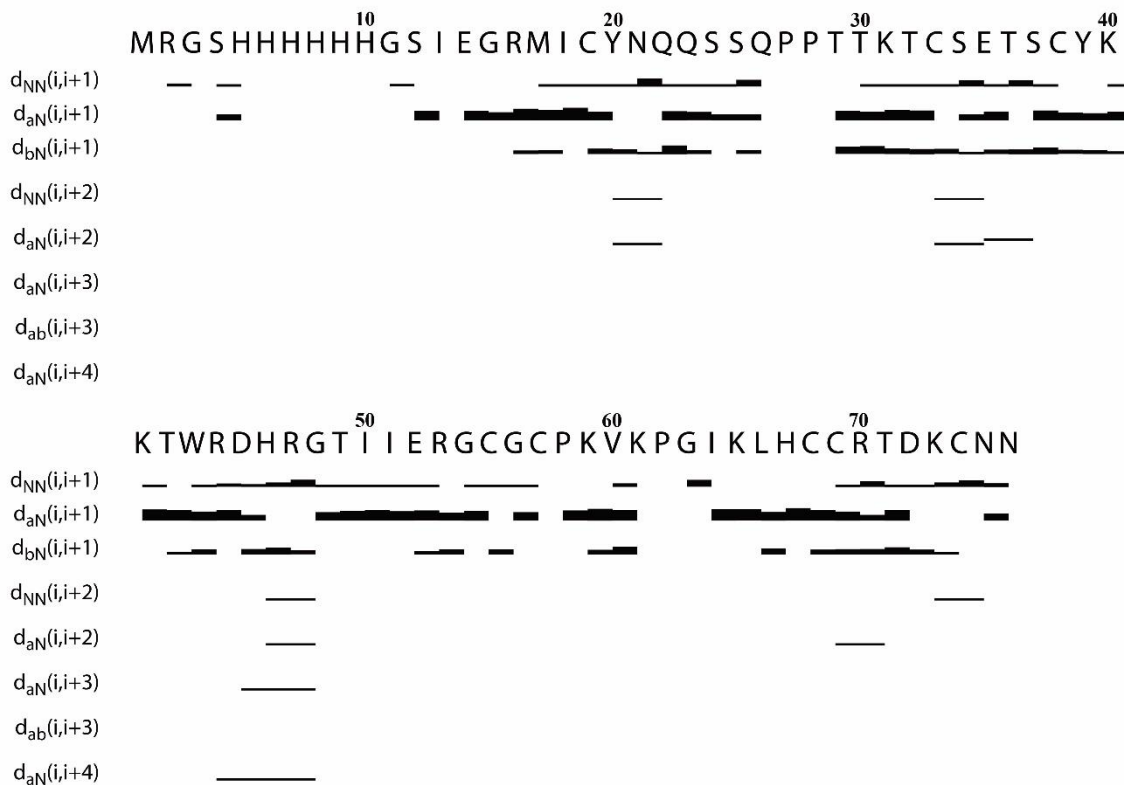
#### **5.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Procesar los espectros de RMN necesarios para la caracterización estructural de la SCNTX.

- Interpretar los experimentos multidimensionales de RMN.
- Asignar todos los sistemas de espín en los espectros de RMN.
- Obtener la estructura tridimensional experimental de menor energía para la SCNTX.
- Afinar mediante dinámica molecular las 20 estructuras obtenidas.

## 5.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

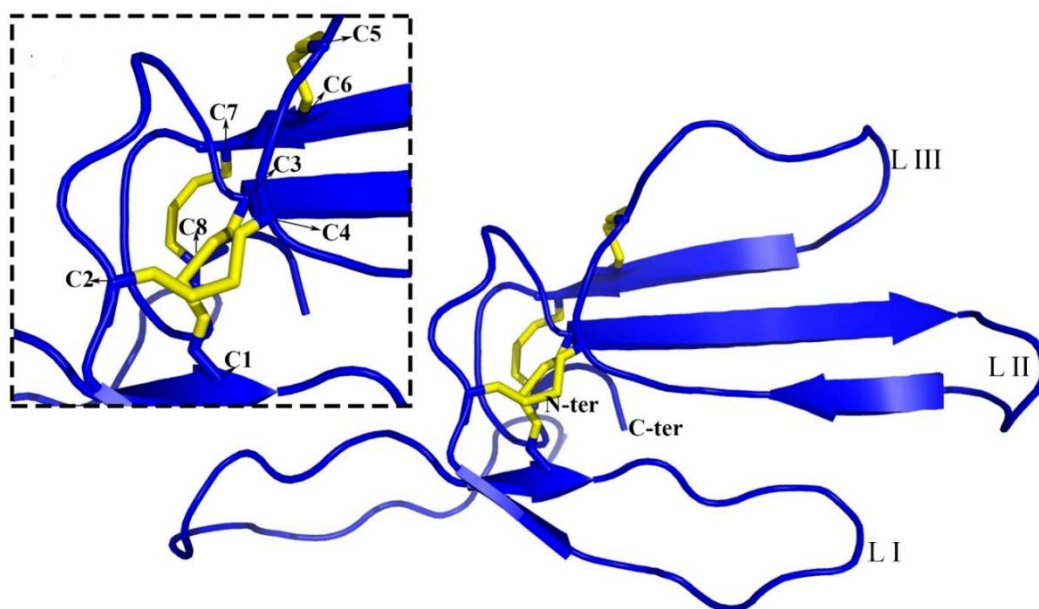
La asignación de los espectros de RMN 2D y 3D  $^{15}\text{N}$ -HSQC, HNCA, HNCACB, HNCO, CC(CO)NH y H(CCO)NH permitió la identificación de 71 de 76 sistemas de espín en los espectros 2D NOESY con un tiempo de mezclado de 150 ms y 2D TOCSY de 80 ms, los cuales mostraron una dispersión de señales razonable. Sin embargo, no fue posible encontrar los residuos Met1, His6, His7, His8 y His9 debido a que esta región del espectro presentó gran traslape de señales. El porcentaje de asignación para  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$  fue de 85, 63 y 61% respectivamente. La estructura en disolución para SCNTX se obtuvo a partir de 1973 NOEs asignados fuera de la diagonal; 275 de ellos son NOEs de larga distancia  $|i-j| \geq 5$ , 71 NOEs de media distancia  $1 < |i-j| < 5$  y 1627 NOEs de corta distancia  $|i-j| \leq 1$  (Figura 20), 90 restricciones de ángulo obtenidas en el servidor TalosN y 47 constantes de acoplamiento HN- $\text{H}\alpha$ .



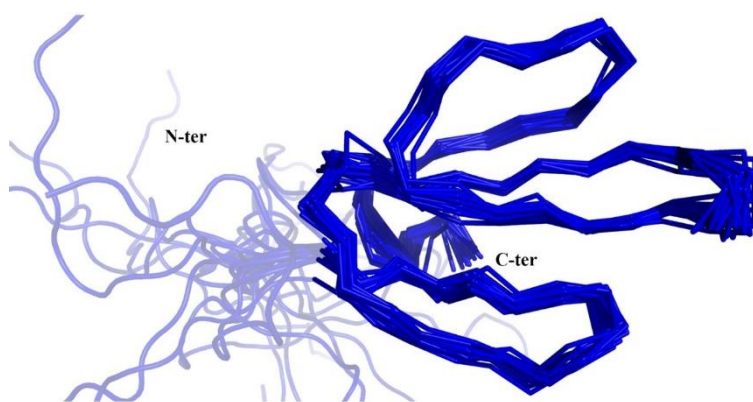
**Figura 20.** NOEs utilizados en los cálculos de la estructura tridimensional. Las líneas gruesas, medias y delgadas corresponden a NOEs de corto, medio y largo alcance. Es

posible observar una hoja  $\beta$  antiparalela doble (residuos Ile18-Tyr20 y Thr30-Thr32) y triple (residuos Cys38-Arg44, Thr49-Glu52 y Lys65-Cys69), que son confirmadas por el visor gráfico pymol.

La estructura tridimensional de la SCNTX (Fig. 21) presenta una hoja  $\beta$  antiparalela formada por dos hebras (residuos Ile18-Tyr20 y Thr30-Thr32) y tres hebras (residuos Cys38-Arg44, Thr49-Glu52 y Lys65-Cys69), tres giros (residuos Asn21-Thr29, Cys33-Ser37 y Asp45-Gly48) que se extienden hacia afuera desde el núcleo de la proteína y cuatro enlaces disulfuro. La Figura 22 muestra las 20 estructuras de menor energía obtenidas mediante RMN para SCNTX en disolución. El RMSD de la cadena principal fue de 0.37 y considerando los átomos pesados fue de 0.80. Las 20 estructuras de menor energía fueron validadas y reportadas en las bases de datos PDB: 7LUW y BMRB: 30867.

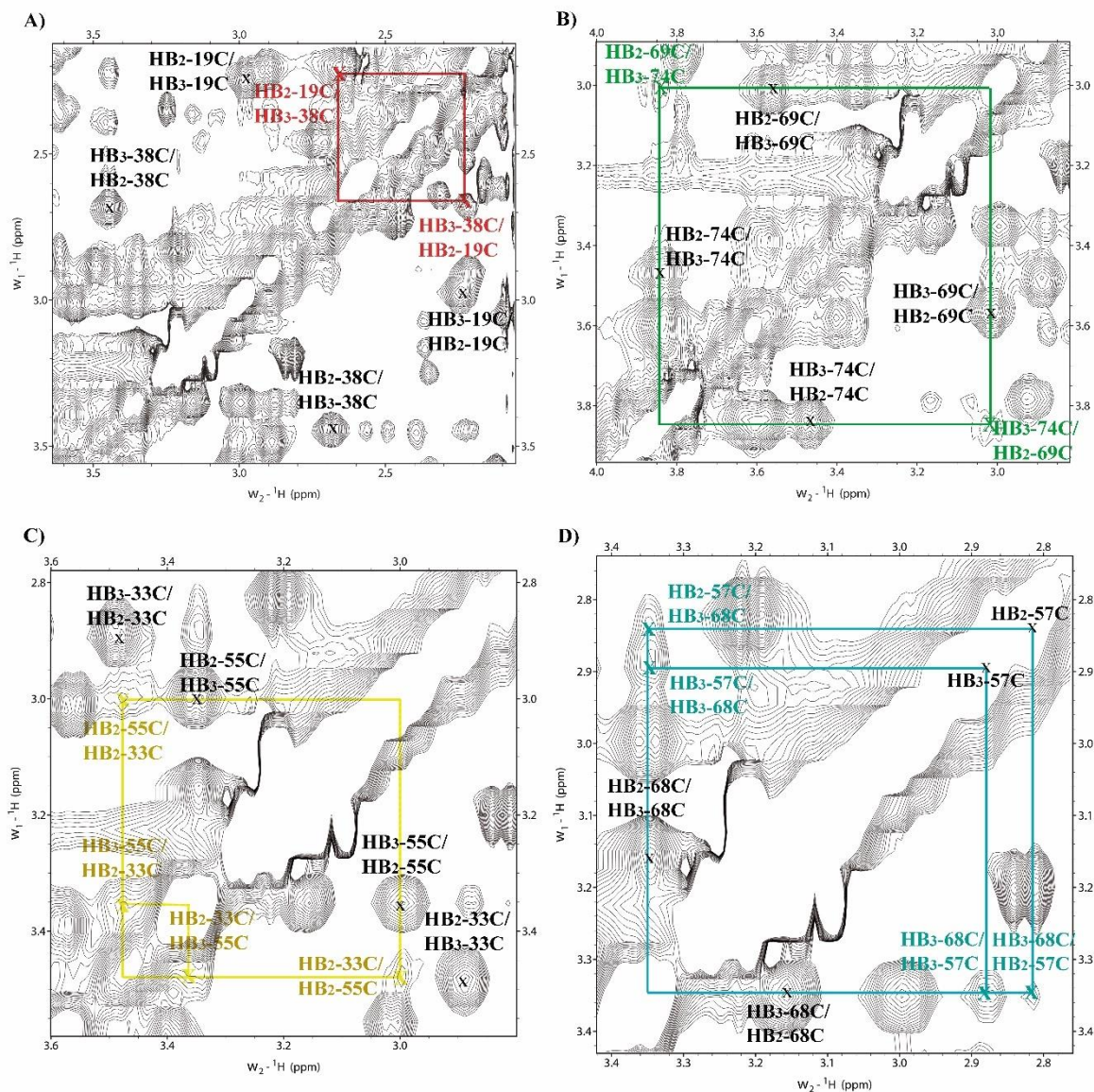


**Figura 21.** Estructura de menor energía obtenida para SCNTX en solución. Los enlaces disulfuro están pintados en color amarillo. La estructura de SCNTX 3D contiene hojas  $\beta$  antiparalelas de doble y triple hebra y tres bucles que se extienden hacia afuera desde el núcleo de la proteína.



**Figura 22.** *Sobreposición de las 20 estructuras de menor energía obtenidas para SCNTX.*

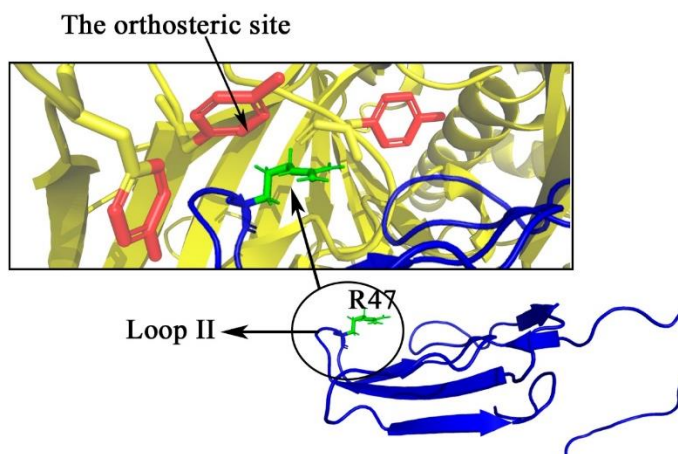
Para obtener la estructura 3D de la SCNTX fueron usadas las restricciones de enlaces disulfuro (C119 – C338, C233 – C455, C557 – C668 y C769 – C874). El patrón de enlaces disulfuro fue determinado mediante RMN. Los NOEs específicos se observaron claramente entre  $H_{\beta i}$ - $H_{\beta j}$  y  $H_{\alpha i}$ - $H_{\beta j}$  de las cisteínas presentes en cada enlace disulfuro. Presentamos la correlación NOE C19H $\beta$ 2-C38H $\beta$ 3, C69H $\beta$ 2-C74H $\beta$ 3, C55H $\beta$ 2-C33H $\beta$ 2, C57H $\beta$ 3-C68H $\beta$ 3 y C57H $\beta$ 2-C68H $\beta$ 3 en la Figura 23. Para validar el patrón de enlaces realizamos dos cálculos de estructura diferentes: el primero, sin restricción de enlace disulfuro; y el segundo con restricciones enlaces (C19 – C38, C33 – C55, C57 – C68 y C69 – C74) en relación con la estructura primaria. Los dos cálculos convergieron en estructuras notablemente similares. Los NOEs y los cálculos confirman que las cisteínas específicas están cerca y, por lo tanto, deberían estar formando un enlace entre ellas.



**Figura 23.** Región H $\beta$ -H $\beta$  de la correlación de enlaces disulfuro para SCNTX, obtenida a partir del experimento 2D NOESY a 150 ms de tiempo de mezclado, 308 K, pH7 y a una concentración de 0,8 mM. Para A) Cys19-Cys38, B) Cys69-Cys74, C) Cys55-Cys33 y D) Cys57-Cys68. Las asignaciones de las Cisteínas están etiquetadas en negro y las correlaciones NOESY de los enlaces disulfuro están etiquetadas en rojo, verde, amarillo y azul, respectivamente. Esas correlaciones están bien definidas.

Los resultados demuestran que la estructura 3D de la SCNTX es similar a otras neurotoxinas de cadena corta ya reportadas, las cuales contienen tres giros que se extienden a partir de un núcleo y presentan enlaces disulfuro. Adicional a esto, también se observó que la arginina 47 de la SCNTX, presente en el giro 2 de la estructura, se

encuentra expuesto al disolvente (Figura 24), lo cual infiere que podría ser crucial para la interacción con el receptor  $\alpha 7$ -nAChR, permitiendo a su vez la interacción con el sitio ortostérico presente en el receptor. Este resultado concuerda con estudios teóricos realizados previamente (Gulsev and Meiler 2020b). La comprensión de la relación estructura-función y el papel de los aminoácidos clave en proteínas como SCNTX, es un paso esencial para crear antivenenos rentables con un importante valor terapéutico.



**Figura 24.** Estructura tridimensional de la SCNTX (azul), la arginina 47 se encuentra coloreada en verde. Dentro del recuadro se observa el sitio de enlace a ligando del receptor nAChR, llamado sitio ortostérico (amarillo) donde se resaltan en rojo los residuos que forman la caja aromática. Dentro del recuadro también se presenta sobrepuesta la arginina 47 de la SCNTX de manera ilustrativa.

## 5.5 CONCLUSIÓN

La estructura tridimensional de la SCNTX mostró una hoja  $\beta$  antiparalela doble y una triple, tres giros que se extienden hacia afuera desde el núcleo de la proteína y cuatro enlaces disulfuro, los cuales fueron identificados mediante RMN. Se observó que la arginina 47 se encuentra expuesta al disolvente y podría ser un residuo clave en la interacción con el receptor nAChR.

## CAPITULO 6. Caracterización molecular de las interacciones del factor transcripcional A-MYB de humano con sus blancos CBP Y ADN

### 6.1 INTRODUCCIÓN

La transcripción genética es un proceso llevado a cabo dentro de la célula, en el cual la información genética contenida en el ADN es transferida a ARN mensajero; este proceso a su vez es regulado principalmente por los factores de transcripción; los cuales son proteínas que se unen a secuencias específicas de ADN. MYB hace referencia a una de estas familias de factores de transcripción, la cual se encuentra presente en células

eucariotas. Estas proteínas regulan procesos fundamentales durante el metabolismo y diferenciación celular mediante el control de la transcripción génica(Prouse and Campbell 2012).

Basados en similitud del domino de enlace a ADN, la familia MYB fue clasificada en R1R2R3-MYB, R2R3-MYB y así sucesivamente dependiendo, el número de dominios repetidos presentes. En todos los genomas secuenciados de vertebrados se han encontrado 3 factores de transcripción pertenecientes a la subfamilia R1R2R3-MYB los cuales son A-Myb, B-Myb y C-Myb(Prouse and Campbell 2012).

Por una parte, C-Myb es la contraparte celular de v-Myb, un componente del virus de mieloblastosis aviar que se encuentra involucrada con el control y diferenciación de células hematopoyéticas, razón por la cual ha sido ampliamente estudiada. Por otro lado, B-Myb ha sido medianamente estudiada y está involucrada con la regulación positiva y el control de crecimiento celular, la diferenciación y el cáncer(Prouse and Campbell 2012). Por último, nuestro centro de estudio A-Myb se encuentra involucrado con diferentes anomalías clínicas como infertilidad masculina, desarrollo de glándulas mamarias anormales(Tang and Goldberg 2012), astrocitomas difusos de grado II(Bolcun-Filas et al. 2011), células de linfoma uterino(Swartz et al. 2005), linfoma de Burkitt(Golay et al. 1996), astrogliosis o pérdida neuronal(Jeon et al. 2006), entre otros.

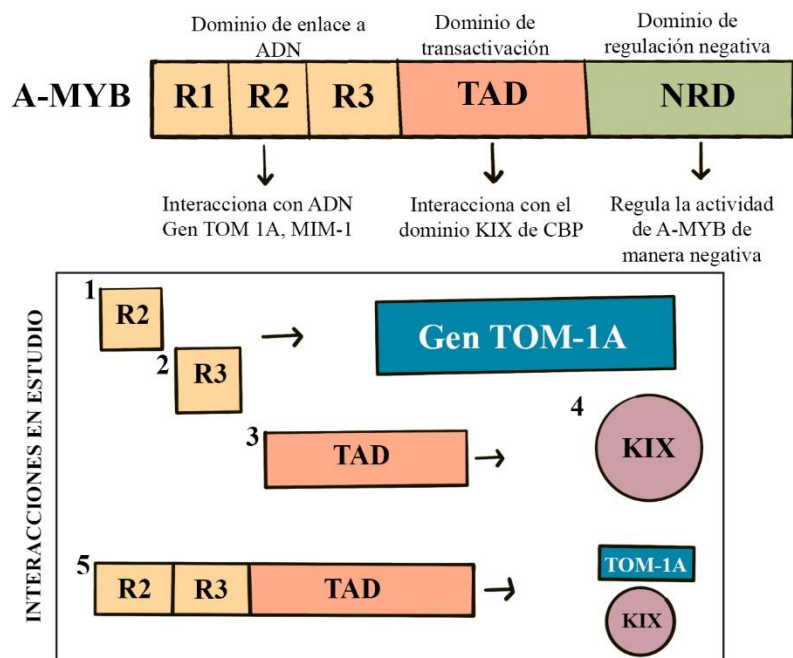
Se cree que A-Myb juega un papel importante en la diferenciación de células B, también llamados linfocitos B, así como en la transformación de células B en algunas neoplasias, debido a que la expresión de A-Myb, a diferencia de B-Myb y C-Myb está restringida a un subconjunto de neoplasias de células B. Entre estas, leucemia linfocítica crónica y líneas celulares de linfoma de Burkitt(Golay et al. 1996). De igual manera se encontró sobre regulada en células de linfoma uterino tratadas con estrógeno(Swartz et al. 2005). Un patrón similar se observa en linfomas de la enfermedad de Marek (MD), la cual es una enfermedad neoplásica linfoproliferativa de pollos, causada por el virus de la enfermedad de Marek (MDV), puesto que A-Myb se ha encontrado expresada en grandes cantidades(Lian et al. 2015). Adicional a esto, en células de cáncer de colon en humano se observó que la sobreexpresión de A-Myb inducida conduce a la reducción de estas células y el crecimiento del tumor(Guo et al. 2017).

También se ha resaltado el papel potencial de la familia de las MYB en la biología de los gliomas pediátricos de bajo grado, los cuales son los tumores sólidos más comunes en niños. Para este caso se determinó una parcial duplicación de A-Myb con su dominio de regulación negativa (NRD) truncado en astrocitoma difuso de grado IIs. Además, se observó que A-Myb truncada induce el crecimiento independiente en células 3T3 y la formación de tumor en ratón desnudo(Ramkissoon et al., n.d.).

Acerca del mecanismo de acción de esta proteína se conoce que, en el proceso de la activación de genes específicos en espermatoцитos, el dominio de transactivación (TAD) de A-Myb interactúa con el dominio KIX de CBP. Esta proteína de unión a CREB (CBP) es un coactivador que interactúa con la proteína de unión a CRE, CREB. La interacción es llevada a cabo de manera dependiente y es necesaria la presencia de una secuencia cargada de 23 aminoácidos ubicada en el dominio de transactivación de A-Myb lo cual envuelve una interacción física entre A-Myb y el dominio KIX de CBP (Valeria Facchinetti et al. 1997).

Por tal motivo se propone que el factor de transcripción A-Myb actúa como un coactivador directo de la expresión celular específica mediante la vía del elemento CRE cis, para lo cual se cree que este es un mecanismo común involucrado en la activación de múltiples genes.

Pese a la gran relevancia de A-Myb, no existe información molecular de las rutas en las que actúa y teniendo en cuenta que actualmente el conocimiento sobre el mecanismo de la regulación génica de la expresión está incompleto, se decidió estudiar el dominio de enlace a ADN junto con el dominio de transactivación (TAD) presente también en la A-Myb, el cual se espera interaccione directamente con el dominio KIX de CBP el cual funciona como coactivador de un gran número de factores de transcripción (Fung, Ramsay, and Katzen 2003) (Fig. 25).



**Figura 25.** Esquema de los dominios presentes en el factor de transcripción A-MYB y los blancos con los que interacciona cada uno de ellos. También se muestran individualmente



los dominios estudiados en el presente proyecto, los cuales son R2, R3, TAD y R2R3TAD (nombrada como COM). KIX es el dominio de la proteína CBP.

## 6.2 HIPÓTESIS

Los dominios de A-MYB expresados individualmente de manera recombinante interaccionarán con sus blancos de ADN y KIX respectivos.

## 6.3 OBJETIVOS

### 6.3.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar las bases moleculares de la interacción entre CBP, A-Myb y ADN involucrados en la regulación de la transcripción génica de células eucariontes por RMN.

### 6.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener las proteínas recombinantes R2-A-Myb, R3-A-Myb, TAD-A-Myb, R2R3TAD-A-Myb y el dominio KIX de CBP.
- Optimizar condiciones de purificación para todas las proteínas del punto anterior.
- Resolver la estructura tridimensional del conjunto de proteínas mediante RMN.
- Caracterizar la interacción entre A-Myb, KIX y ADN empleando RMN.

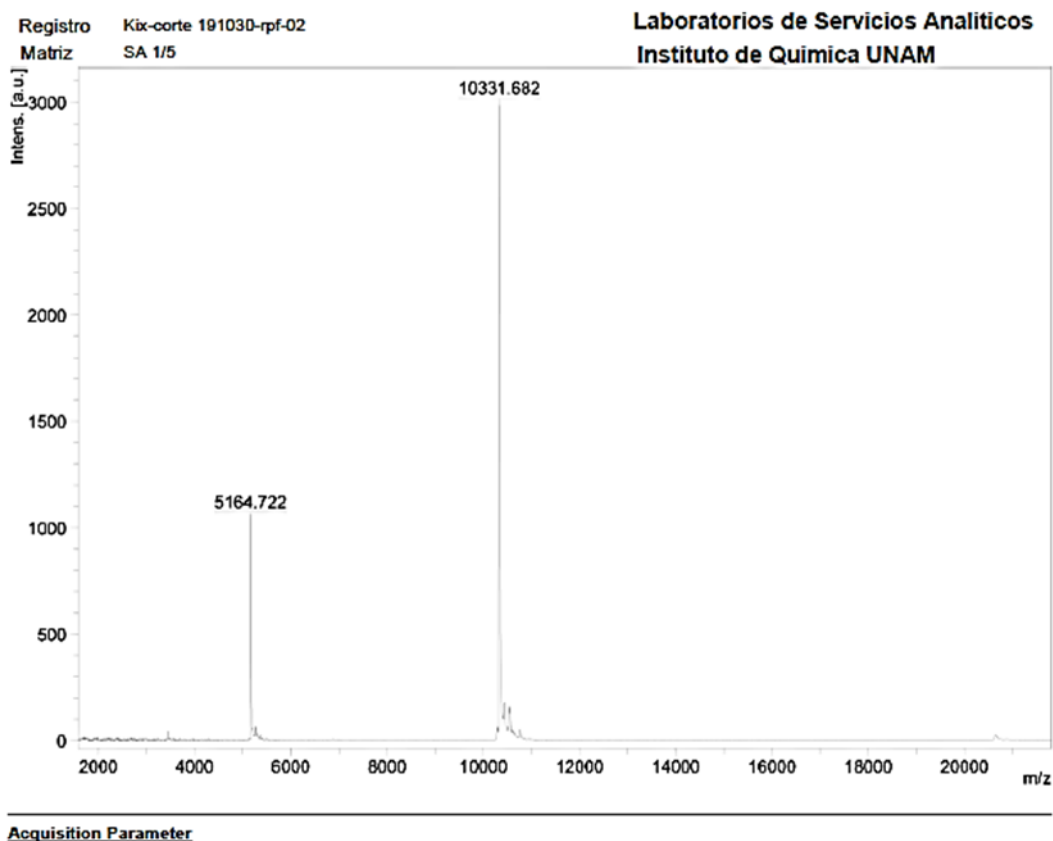
## 6.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 5.** Secuencia primaria de los dominios estudiados en el presente proyecto.

DOMINIOS	CANTIDAD DE AMINOÁCIDOS	SECUENCIA
R2 de A-Myb (90-141)	52	LIKGPWTKEEDQRVIELVQKYGPKRWSLIAKHLKGRIGKQCRE RWHNHLNPE
R3 de A-Myb (142-193)	51	VKKSSWTEEDRIIYEAHKRLGNRWAEIAKLLPGRTDNSIKNH WNSTMRRK
Dominio de transactivación (TAD) de A-Myb (218-319)	101	MQTQNQFYIPVQIPGYQYVSPEGNCIEHVQPTSAFIQQPFIDED PDKEKKIKELEMLLMSAENEVRRKRIPSQPGSFSSWSGSFLMD DNMSNTLNSLDEHTS
Dominio KIX de CBP (587-673)	87	GVRKGWHEHVTQDLRSHLVHKLQVQIFPTDPAALKDRRME NLVAYAKKVEGDMEYASANSRDEYYHLLAEKIYKIQKELEEK RSRL
COM de A-Myb (DOMINIO R2+DOMINIO R3+DOMINIO DE TRANSACTIVACIÓN)	235	LIKGPWTKEEDQRVIELVQKYGPKRWSLIAKHLKGRIGKQCRE RWHNHLNPEVKKSSWTEEDRIIYEAHKRLGNRWAEIAKLLP GRTDNSIKNHWNSTMRRKVEQEGYLQDGKISERSSSKLQHKP CAAMDHMQTQNQFYIPVQIPGYQYVSPEGNCIEHVQPTSAFIQ QPFIDEDPDKEKKIKELEMLLMSAENEVRRKRIPSQPGSFSSW SGSFLMDNMSNTLNSLDEHTS

Fue posible determinar las condiciones óptimas de expresión y purificación para cada uno de los dominios en estudio. Se observó que cada uno de ellos requiere condiciones particulares en cada etapa del proceso. Como un ejemplo de esto observamos que los dominios TAD; COM se expresan completamente insolubles, mientras que KIX se expresa parcialmente insoluble, adicional a esto los dominios R2 y R3 luego de ser purificados presentan una alta estabilidad en concentraciones de NaCl altas (400-500 mM), sin embargo, en una baja concentración de NaCl (100 mM) tienden a precipitar rápidamente. Por otro lado, el dominio KIX es inestable a altas concentraciones (>500  $\mu$ M), lo cual dificulta un poco su caracterización.

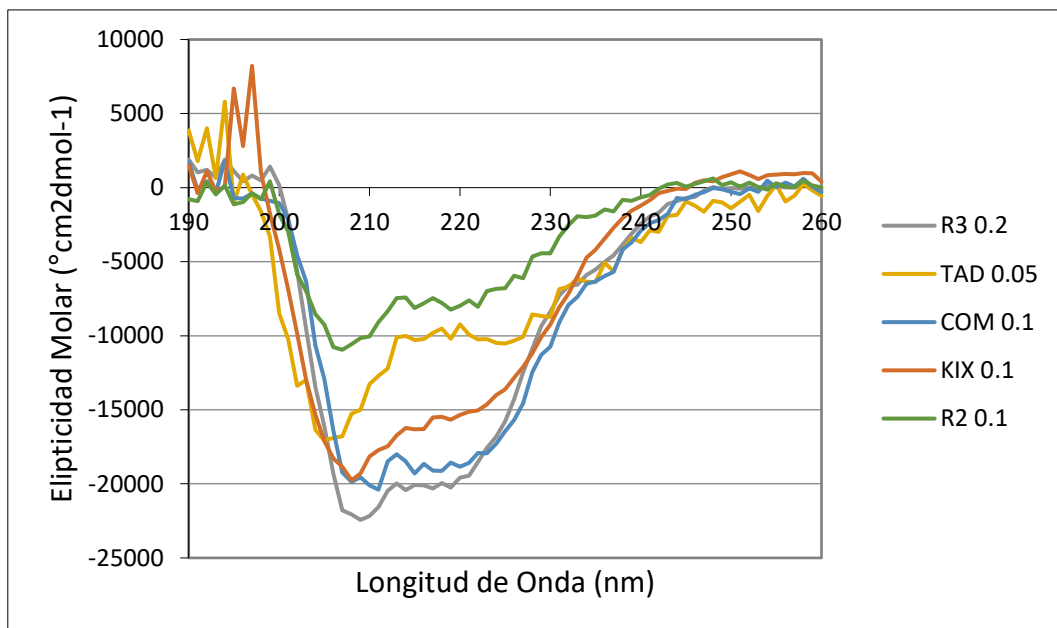
Se purificaron cada uno de los dominios mediante diferentes técnicas cromatográficas, lo cual fue corroborado mediante espectrometría de masas para el dominio KIX (Fig. 26) y mediante cromatografía de intercambio iónico (Fig. A1 material suplementario) junto con gel de poliacrilamida para los otros dominios. A continuación, fue posible realizar la caracterización de cada uno de ellos mediante experimentos de dicroísmo circular. En la figura 27 se presentan los espectros de dicroísmo circular (DC) de los 5 dominios trabajados en este proyecto. Se observa que todos los dominios presentan 2 mínimos en 210 nm y 220 nm, lo cual es el comportamiento esperado cuando se encuentra presente el elemento de estructura secundaria hélice- $\alpha$ . Sin embargo, empleando los datos obtenidos se calculó el porcentaje de estructura secundaria presente en cada dominio, los resultados se presentan en la tabla 6. Se observa que todos los dominios, excepto R3, presentan cierto contenido de hélice, mientras que todos los dominios presentan hoja antiparalela y otros plegamientos principalmente.



**Figura 26.** Espectro de masas MALDI-TOF del dominio KIX.

**Tabla 6.** Porcentaje de estructura secundaria calculado con el servidor BESTSEL (Micsonai et al. 2015).

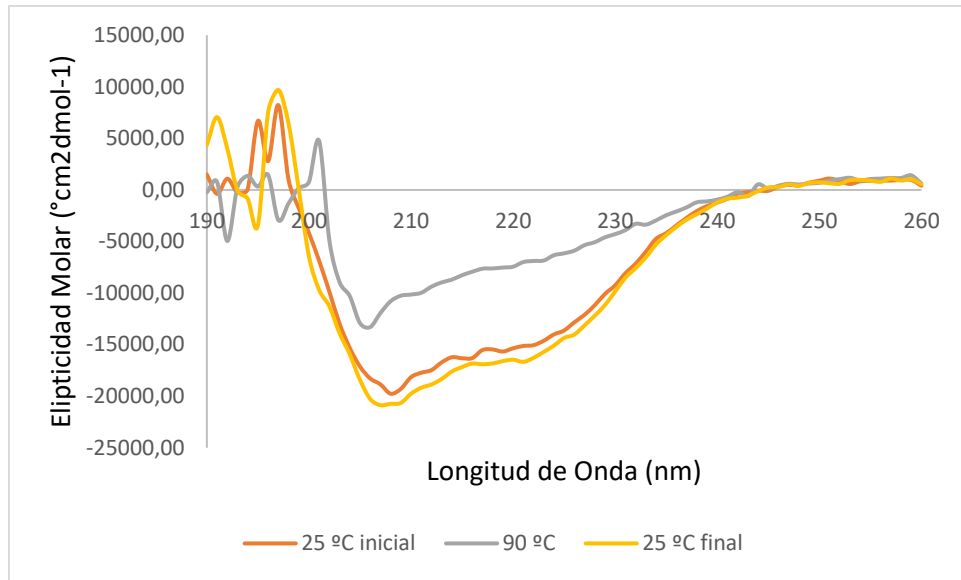
% Estructura Secundaria	R2	R3	TAD	COM	KIX
Hélice	36.1	0.0	30.7	46.7	33.0
Antiparalela	16.1	47.6	16.0	25.7	11.3
Paralela	17.6	10.5	0.0	13.5	17.0
Giro	0.0	0.0	7.6	0.0	0.0
Otros	30.2	41.8	45.7	14.1	38.6



**Figura 27.** Espectros de dicroísmo circular obtenidos para; el dominio R3 a una concentración de 0.2 mg/mL, el dominio TAD a una concentración de 0.05 mg/mL, el dominio COM (R2+R3+TAD) a una concentración de 0.1 mg/mL, el dominio KIX a una concentración de 0.1 mg/mL y el dominio R2 a una concentración de 0.1 mg/mL,

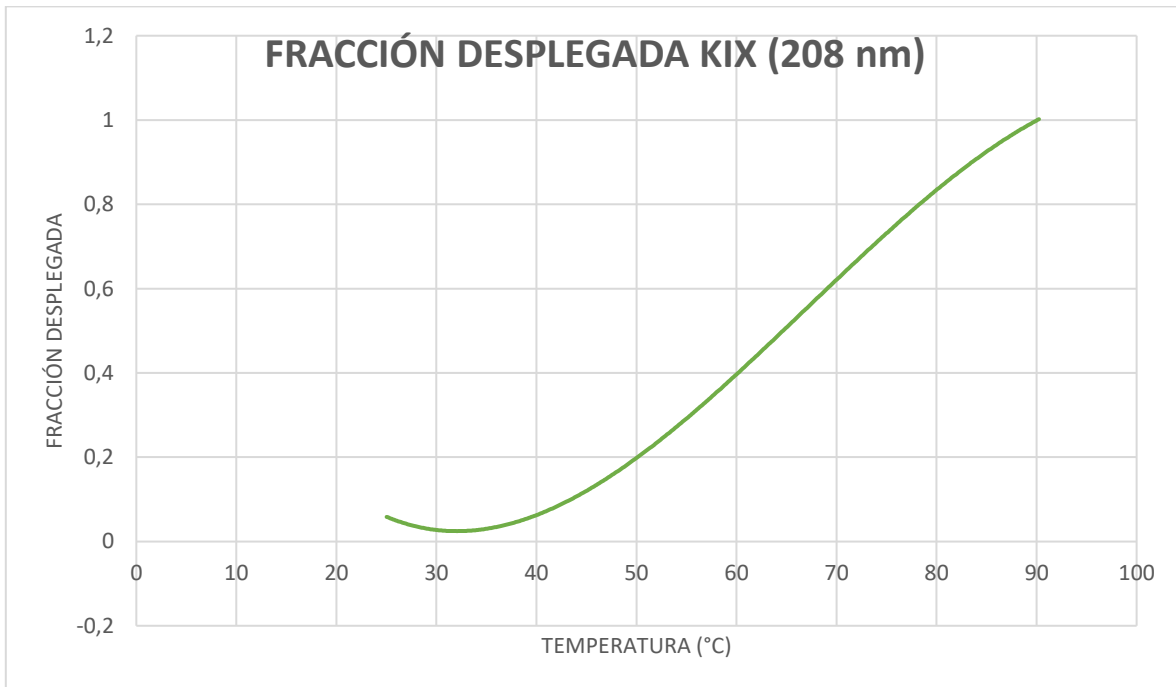
Adicional a esto se realizaron curvas de desplegamiento por temperatura para los dominios R2, R3 y KIX con el fin de estudiar su termoestabilidad. Para lo cual se determinó que la desnaturalización de KIX y R2 es reversible, mientras que para R3 es irreversible.

En la figura 28 se muestran diferentes curvas de DC para el dominio KIX, a 25°C (anaranjado), a 90°C (gris) y luego de enfriar a 25°C (amarillo). Con lo cual es posible observar que la desnaturalización de KIX es reversible.



**Figura 28.** Espectro de dicroísmo circular obtenido para el dominio KIX de la proteína CBP a 25°C (color anaranjado). Espectro de DC de KIX a 90°C (color gris). Espectro de DC de KIX a 25°C luego de enfriar (color amarillo).

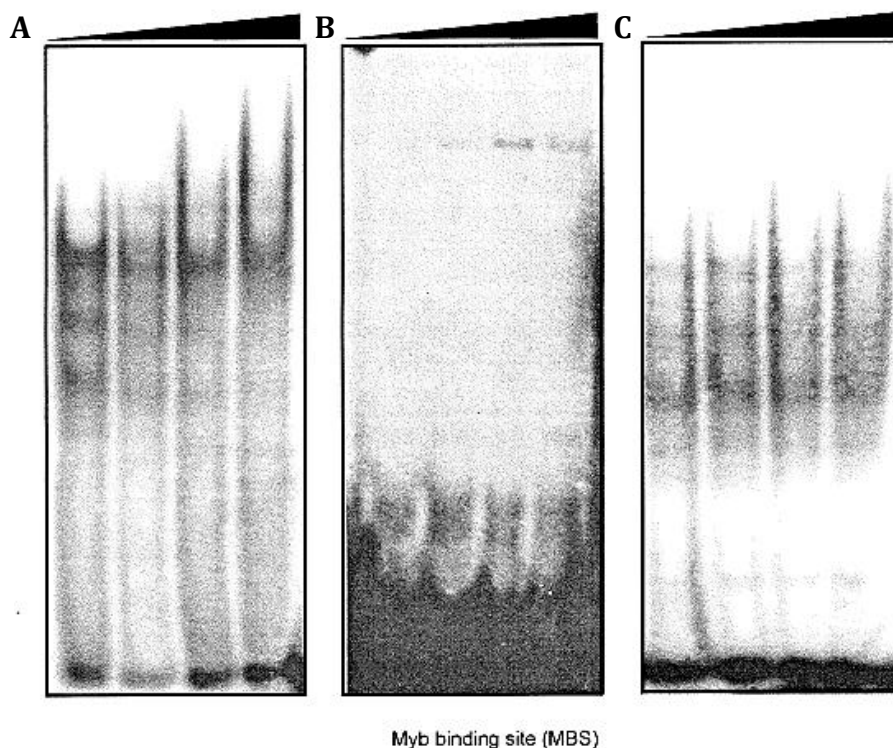
En la figura 29 se presenta la variación de la intensidad de DC monitoreada a 208 nm a medida que se incrementa la temperatura de la celda. El valor calculado para la TM de KIX fue de 64.27°C.



**Figura 29.** Curva de desplegamiento de KIX monitoreada a 208 nm empleando DC.

Se determinó la interacción de los dominios R2, R3 y COM (R2R3TAD) con ADN mediante experimentos EMSA, con lo cual se observó que todos los dominios presentan plegamientos activos, debido a que hubo interacción en todos los casos con el gen TOM-1A (Fig. 30).

En la figura 30 se presentan geles de poliacrilamida al 4% correspondientes a los experimentos EMSA realizados, donde el grupo fosfato del ADN se encuentra marcado con  $-32P$ , por tanto, es posible hacer seguimiento de la interacción ADN-Proteína empleando radioactividad. En la figura 30 A, B y C se observan los complejos ADN+COM, ADN+R3 y ADN+R2 respectivamente.

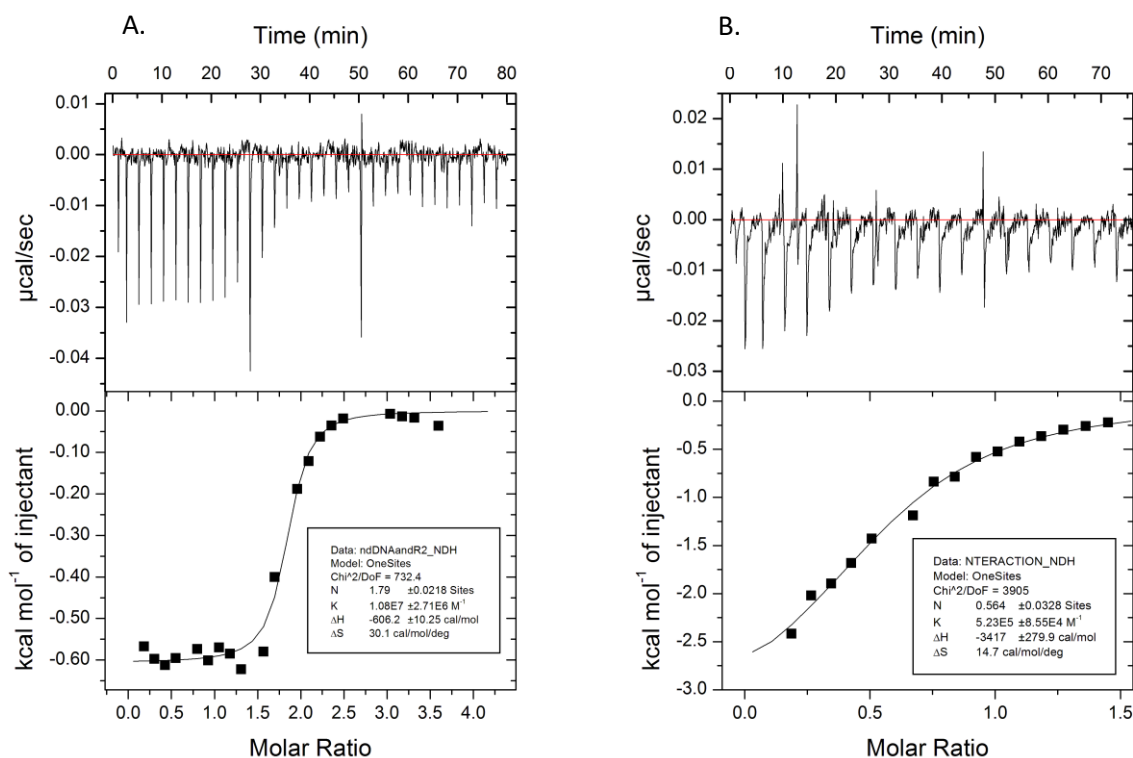


**Figura 30.** Ensayos de movilidad electroforética de A. COM, B. R3 y C. R2 con ADN. Para cada uno de los dominios se incrementa la concentración de proteína de izquierda a derecha y se mantiene constante la concentración del gen TOM-1A (0.5 ng). Las concentraciones utilizadas para cada dominio fueron; para COM (0.60; 1.2; 3 y 6  $\mu g$ ), para R3 (0.60; 1.2; 3 y 6  $\mu g$ ) y para R2 (0.5; 0.75; 1 y 1.5  $\mu g$ ).

En los geles de la figura 30 se observan bandas tanto del ADN libre (bandas al final del gel). Como de la formación del complejo de ADN con los diferentes dominios (bandas en la parte superior de los geles), los cuales migran de manera más lenta que el ADN libre, al ser de un mayor tamaño. Por tanto, es posible concluir que los dominios recombinantes presentan la actividad que se requiere, puesto que interaccionan con su

respectivo blanco. Sin embargo, este experimento fue utilizado para obtener un resultado cualitativo y confirmar la interacción.

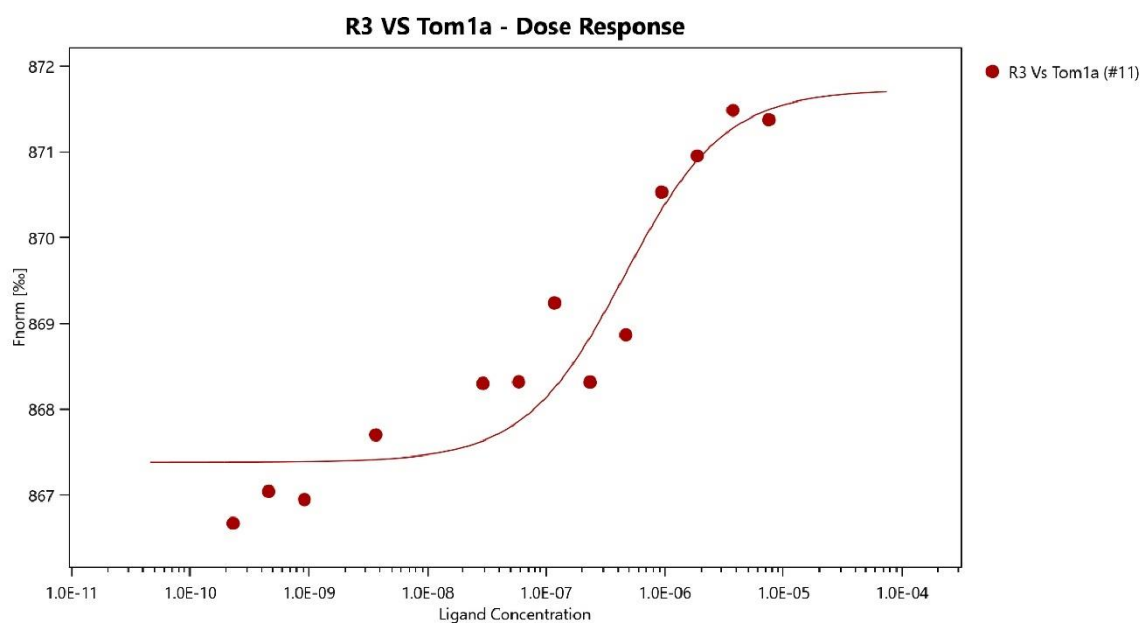
Se realizó una caracterización preliminar mediante Isothermal titration calorimetry (ITC) y termoforesis de la interacción de los dominios R2 y R3 con el ADN, así como también de la interacción del dominio TAD con el domino KIX. Se observó interacción en todos los casos. Estos experimentos se realizaron en colaboración con el Dr. Enrique García. En la figura 31 se muestran los resultados correspondientes al experimento de ITC realizado para el domino R2 con TOM-1A y KIX con TAD, lo cual evidencia la interacción en ambos casos. En ambos casos se esperaba una estequiometría 1:1 ( $N=1$ ), sin embargo, para R2 se obtuvo un valor de  $N= 1.79$  y para KIX un valor  $N= 0.564$ , posiblemente debido a la alta inestabilidad de estos dominios en disolución, lo cual pudo ocasionar estos resultados. Por tal motivo, considero necesario repetir estos experimentos al siguiente día de finalizar la purificación de los dominios (máximo en los siguientes 2 días).



**Figura 31.** A. Curva de ITC obtenida mediante la titulación de ADN utilizando el dominio R2. Se obtuvo una  $KD=92.5$  nM. B. Curva de ITC obtenida mediante la titulación de KIX utilizando el dominio TAD. Se obtuvo una  $KD=1.9$   $\mu$ M.

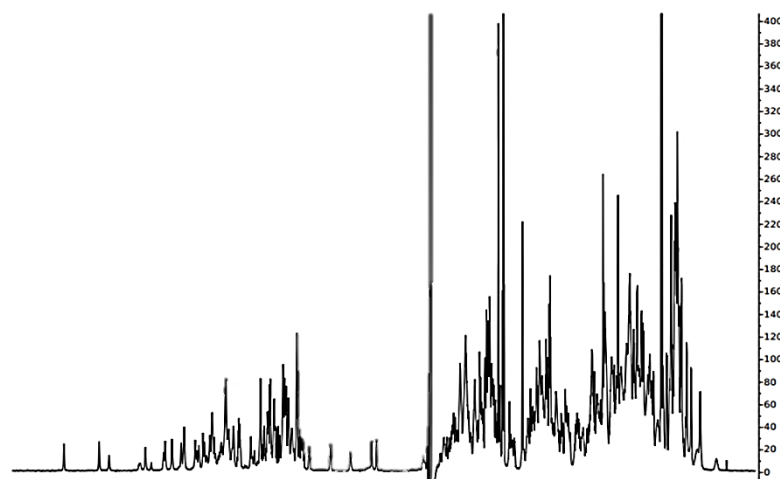
En la figura 32 se presentan los resultados de la interacción de R3 con el gen TOM-1A, la cual fue observada empleando termoforesis, mediante la cual se determinó

una  $K_d$  430.4 nM. Con base en estos resultados es posible observar que probablemente R3 presenta una menor afinidad por el ADN en comparación con R2.



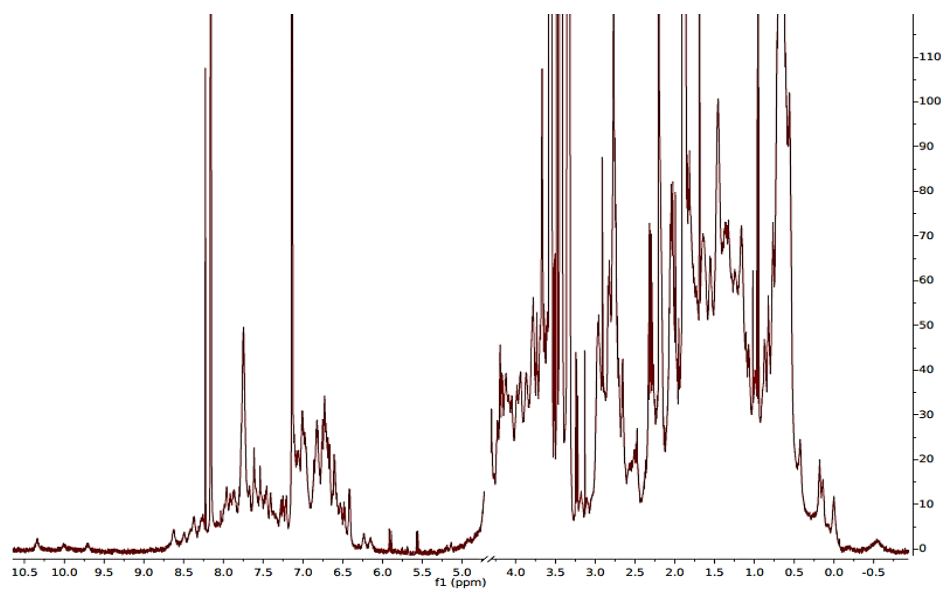
**Figura 32.** Curva de termoforesis obtenida para la interacción de R3 marcada con un compuesto fluorescente enlazado al His-tag del dominio (NT-647), junto con el gen Tom-1A. Se determinó una  $KD$  de 430.4 nM.

Se obtuvieron los espectros de  $^1H$  de RMN para los dominios R2, R3 y KIX. La dispersión observada en las señales infiere que estos dominios presentan una estructura tridimensional estable. En las figuras 33, 34 y 35 se muestran los espectros de  $^1H$  obtenidos para los dominios R3, R2 y KIX respectivamente.

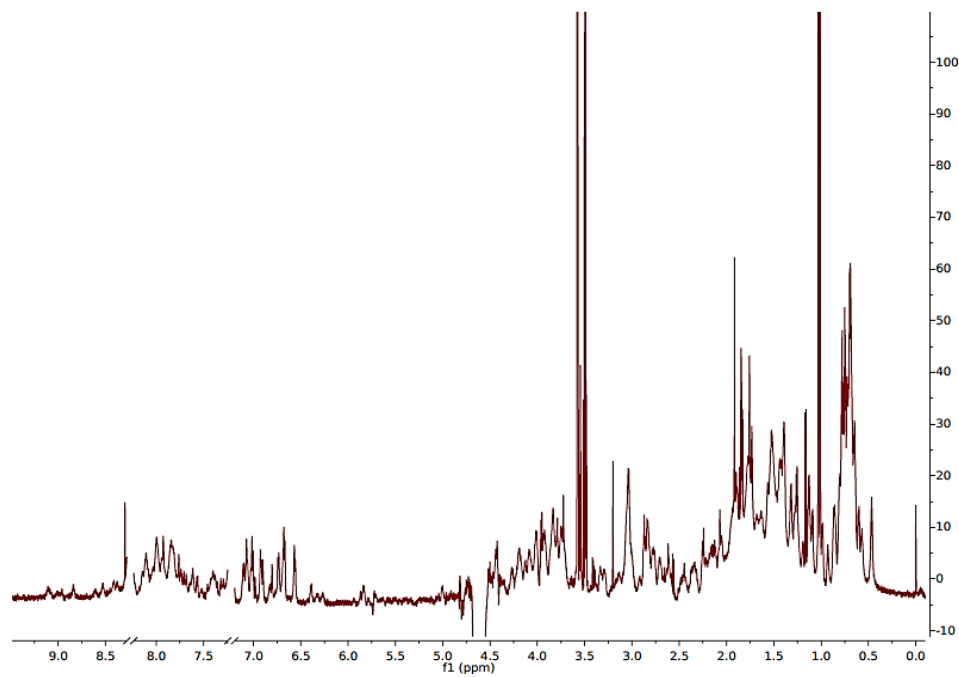


**Figura 33.** Espectro de  $^1H$  de RMN del dominio R3. Adquirido en un equipo Bruker 700MHz.





**Figura 34.** Espectro de  $^1\text{H}$  del dominio R2. Equipo Bruker 700MHz.



**Figura 35.** Espectro de  $^1\text{H}$  del dominio KIX. Equipo Bruker 700MHz.

## 6.5 CONCLUSIONES

Se optimizaron las condiciones de expresión y purificación para cada uno de los dominios en estudio. Se determinó que todos los dominios se encuentran plegados y a su vez presentan un plegamiento activo puesto que todos los dominios obtenidos de manera recombinante interactúan con su blanco correspondiente. Con base en los resultados obtenidos de la interacción de los diferentes dominios, es posible concluir que R2 interactúa más fuertemente con el gen TOM-1A que R3 y que KIX con TAD.

## 7. CONCLUSIÓN GENERAL

Se estudiaron diversas proteínas de interés biológico empleando una gran variedad de técnicas, entre ellas la resonancia magnética nuclear, la cual nos permitió la caracterización estructural de 4 de las 5 proteínas mencionadas en esta tesis. Adicional a esto fue posible obtener información de la correlación estructura-función que abre paso a futuros estudios. También fue posible optimizar las condiciones de expresión y purificación de los dominios presentes en el factor de transcripción A-MYB de humano, para cada dominio recombinante obtenido fue posible demostrar que presentan un plegamiento activo, puesto que interactúan con su blanco respectivo.

## 8 BIBLIOGRAFÍA

- Alagón, A C, H S Guzmán, B M Martin, A N Ramírez, E Carbone, and L D Possani. 1988. "Isolation and Characterization of Two Toxins from the Mexican Scorpion *Centruroides Limpidus Limpidus* Karsch." *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry* 89 (1): 153–61. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(88\)90277-5](https://doi.org/10.1016/0305-0491(88)90277-5).
- Andreotti, N., Di Luccio, E., Sampieri, F., De Waard, M. S., and Sabatier, J. M. 2005. "Molecular Modeling and Docking Simulations of Scorpion Toxins and Related Analogs on Human SKCa2 and SKCa3 Channels." *Peptides* 26: 1095–1108. [10.1016/j.peptides.2005.01.022](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.01.022).
- Batista, C. V. F., Román-González, S. A., Salas-Castillo, S. P., Zamudio, F. Z., Gómez-Lagunas, F., and Possani, L. D. 2007. "Proteomic Analysis of the Venom from the Scorpion *Tityus Stigmurus* : Biochemical and Physiological Comparison with Other *Tityus* Species." *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 146: 147–57. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.12.004>.
- Bax, Ad, and Donald G. Davis. 1985. "MLEV-17-Based Two-Dimensional Homonuclear Magnetization Transfer Spectroscopy." *J. Magn. Reson.* 65 (2): 355–60. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(85\)90018-6](https://doi.org/10.1016/0022-2364(85)90018-6).
- Bitar, Alaa M H El, Moustafa Sarhan, Mohamed A Abdel, Rahman Veronica, Quintero Hernandez, Chie Aoki, Utsubo Mohsen, A Moustafa Lourival, and D Possani Hak. 2020. "Smp76 , a Scorpine - Like Peptide Isolated from the Venom of the Scorpion *Scorpio Maurus Palmatus* , with a Potent Antiviral Activity Against Hepatitis C Virus and Dengue Virus." *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 26 (2): 811–21. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09888-2>.
- Bolcun-Filas, E., L. A. Bannister, A. Barash, K. J. Schimenti, S. A. Hartford, J. J. Eppig, M. A. Handel, L. Shen, and J. C. Schimenti. 2011. "A-MYB (MYBL1) Transcription Factor Is a Master Regulator of Male Meiosis." *Journal of Cell Science* 124 (15): e1–e1. <https://doi.org/10.1242/jcs096685>.
- Brogden, Kim A. 2005. "Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria?" 3 (MARCH): 238–50. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>.

- Canul-Tec, Juan Carlos, Lidia Riaño-Umbarila, Enrique Rudiño-Piñera, Baltazar Becerril, Lourival D. Possani, and Alfredo Torres-Larios. 2011. "Structural Basis of Neutralization of the Major Toxic Component from the Scorpion *Centruroides Noxius Hoffmann* by a Human-Derived Single-Chain Antibody Fragment." *Journal of Biological Chemistry* 286 (23): 20892–900. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.238410>.
- Cao, Zhijian, Fan Xiao, Fang Peng, Dahe Jiang, Xin Mao, Hui Liu, Wenxin Li, Dan Hu, and Teng Wang. 2003. "Expression, Purification and Functional Characterization of a Recombinant Scorpion Venom Peptide BmTXK $\beta$ ." *Peptides* 24 (2): 187–92. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(03\)00025-1](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(03)00025-1).
- Chen, Zongyun, Fan Luo, Jing Feng, Weishan Yang, Danyun Zeng, Ruiming Zhao, Zhijian Cao, et al. 2013. "Genomic and Structural Characterization of Kunitz-Type Peptide LmKTT-1a Highlights Diversity and Evolution of Scorpion Potassium Channel Toxins." *PLoS ONE* 8 (4): 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060201>.
- Chippaux, J. P., and M. Goyffon. 2008. "Epidemiology of Scorpionism: A Global Appraisal." *Acta Tropica* 107 (2): 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.05.021>.
- Cid-Uribe, Jimena I., Erika P. Meneses, Cesar V.F. Batista, Ernesto Ortiz, and Lourival D. Possani. 2019. "Dissecting Toxicity: The Venom Gland Transcriptome and the Venom Proteome of the Highly Venomous Scorpion *Centruroides Limpidus* (Karsch, 1879)." *Toxins* 11 (5). <https://doi.org/10.3390/toxins11050247>.
- Cid-Uribe, Jimena I, José Ignacio Veytia-Bucheli, Teresa Romero-Gutierrez, Ernesto Ortiz, and Lourival D Possani. 2020. "Scorpion Venomics: A 2019 Overview." *Expert Review of Proteomics* 17 (1): 67–83. <https://doi.org/10.1080/14789450.2020.1705158>.
- Clairfeuille, Thomas, Alexander Cloake, Daniel T. Infield, José P. Llongueras, Christopher P. Arthur, Zhong Rong Li, Yuwen Jian, et al. 2019. "Structural Basis of  $\alpha$ -Scorpion Toxin Action on Nav Channels." *Science* 363 (6433): 1–25. <https://doi.org/10.1126/science.aav8573>.
- Cohen, Lior, Izhar Karbat, Nicolas Gilles, Nitza Ilan, Morris Benveniste, Dalia Gordon, and Michael Gurevitz. 2005. "Common Features in the Functional Surface of Scorpion  $\beta$ -Toxins and Elements That Confer Specificity for Insect and Mammalian Voltage-Gated Sodium Channels." *Journal of Biological Chemistry* 280 (6): 5045–53. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408427200>.
- Conde, R., Zamudio, F. Z., Rodríguez, M. H., and Possani, L. D. 2000. "Scorpine, an Anti-Malaria and Anti-Bacterial Agent Purified from Scorpion Venom." *FEBS Letters* 471 (2000): 165–68. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01384-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01384-3).
- Conde, Renaud, Fernando Z Zamudio, Mario H Rodríguez, and Lourival D. Possani. 2001. "Scorpine , an Anti-Malaria and Anti-Bacterial Agent Purified from Scorpion Venom." *FEBS Letters* 471 (2000): 165–68.
- Dalvit, C, G Shapiro, JM Bohlen, and T Parella. 1991. "Technical Aspects of an Efficient Multiple Solvent Suppression Pulse Sequence." *MAGNETIC RESONANCE IN CHEMISTRY* 37 (1): 7–14.
- Dathe, Margitta, and Torsten Wieprecht. 1999. "Structural Features of Helical Antimicrobial Peptides: Their Potential to Modulate Activity on Model Membranes and Biological Cells." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1462 (1–2): 71–87. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00201-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00201-1).
- Dehesa-Dávila, Manuel, Angelina N. Ramírez, Fernando Z. Zamudio, Georgina Gurrola-Briones, Arturo Liévano, Alberto Darszon, and Lourival D. Possani. 1996. "Structural and Functional Comparison of Toxins from the Venom of the Scorpions *Centruroides Infamatus Infamatus*, *Centruroides Limpidus Limpidus* and *Centruroides Noxius*." *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* 113 (2): 331–39. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(95\)02031-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(95)02031-4).
- Delaglio, Frank, Stephan Grzesiek, Geerten W. Vuister, Guang Zhu, John Pfeifer, and Ad Bax. 1995. "NMRPipe: A Multidimensional Spectral Processing System Based on UNIX Pipes." *Journal of Biomolecular NMR* 6 (3): 277–93. <https://doi.org/10.1007/BF00197809>.
- Delrioportilla, F., V. Blechta, and R. Freeman. 1994. "Measurement of Poorly Resolved Splittings by J Doubling in the Frequency Domain." *Journal of Magnetic Resonance, Series A*. <https://doi.org/10.1006/jmra.1994.1238>.

- Diego-García, E., Y. Abdel-Mottaleb, E. F. Schwartz, R. C. Rodríguez De La Vega, J. Tytgat, and L. D. Possani. 2008. "Cytolytic and K<sup>+</sup> Channel Blocking Activities of  $\beta$ -KTx and Scorpine-like Peptides Purified from Scorpion Venoms." *Cellular and Molecular Life Sciences* 65 (1): 187–200. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7370-x>.
- Diego-García, Elia, Cesar V.F. Batista, Blanca I. García-Gómez, Sylvia Lucas, Denise M. Candido, Froylan Gómez-Lagunas, and Lourival D. Possani. 2005. "The Brazilian Scorpion *Tityus Costatus* Karsch: Genes, Peptides and Function." *Toxicon* 45 (3): 273–83. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.10.014>.
- Diego-García, Elia, Elisabeth F. Schwartz, Gina D'Suze, Sergio A. Román González, Cesar V.F. Batista, Blanca I. García, Ricardo C. Rodríguez de la Vega, and Lourival D. Possani. 2007. "Wide Phylogenetic Distribution of Scorpine and Long-Chain  $\beta$ -KTx-like Peptides in Scorpion Venoms: Identification of 'Orphan' Components." *Peptides* 28 (1): 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.06.012>.
- Downing, A. Kristina, and Peter Güntert. 2004. "Automated NMR Structure Calculation With CYANA." *Protein NMR Techniques* 278: 353–78. <https://doi.org/10.1385/1-59259-809-9:353>.
- Drane, Stephen B., Samuel D. Robinson, Christopher A. MacRaid, Sandeep Chhabra, Balasubramanyam Chittoor, Rodrigo A.V. Morales, Eleanor W.W. Leung, et al. 2017. "Structure and Activity of Contryphan-Vc2: Importance of the D-Amino Acid Residue." *Toxicon* 129: 113–22. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.02.012>.
- Epanand, Richard M, and Hans J Vogel. 1999. "Diversity of Antimicrobial Peptides and Their Mechanisms of Action" 1462.
- Estrada, Georgina, Rita Restano-Cassulini, Ernesto Ortiz, Lourival D. Possani, and Gerardo Corzo. 2011. "Addition of Positive Charges at the C-Terminal Peptide Region of CstII, a Mammalian Scorpion Peptide Toxin, Improves Its Affinity for Sodium Channels Nav1.6." *Peptides* 32 (1): 75–79. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.11.001>.
- Facchinetti, V., R. Lopa, F. Spreafico, F. Bolognese, R. Mantovani, F. Tavner, R. Watson, M. Intronà, and J. Golay. 2000. "Isolation and Characterization of the Human A-Myb Promoter: Regulation by NF- $\kappa$ B and Sp1." *Oncogene* 19 (34): 3931–40. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203730>.
- Facchinetti, Valeria, Livio Loffarelli, Sabine Schreck, Michael Oelgeschla, and Bernhard Lu. 1997. "With the CBP / P300 Adaptor Molecules" 736: 729–36.
- Feng, Jing, Congya Yu, Mingyu Wang, Zhi Li, Yingliang Wu, Zhijian Cao, Wenxin Li, Xiaohua He, and Song Han. 2013. "Expression and Characterization of a Novel Scorpine-like Peptide Ev37, from the Scorpion *Euscorpions Validus*." *Protein Expression and Purification* 88 (1): 127–33. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.12.004>.
- Flores-Solis, David, Yanis Toledano, Oscar Rodríguez-Lima, Patricia Cano-Sánchez, Belen Ernestina Ramírez-Cordero, Abraham Landa, Ricardo C. Rodríguez de la Vega, and Federico del Rio-Portilla. 2016. "Solution Structure and Antiparasitic Activity of Scorpine-like Peptides from *Hoffmanniadrurus Gertschi*." *FEBS Letters* 590: 2286–96. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12255>.
- Flores, David, Abraham Landa, Ricardo C. Rodríguez, and Federico del Rio-Portilla. 2016. "Solution Structure and Antiparasitic Activity of Scorpine-like Peptides from *Hoffmanniadrurus Gertschi*" 590: 2286–96. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12255>.
- Friedrich, Carol L, Dianne Moyles, and Terry J Beveridge. 2000. "Antibacterial Action of Structurally Diverse Cationic Peptides on Gram-Positive Bacteria" 44 (8): 2086–92.
- Fung, Siau Min, Gary Ramsay, and Alisa L. Katzen. 2003. "MYB and CBP: Physiological Relevance of a Biochemical Interaction." *Mechanisms of Development* 120 (6): 711–20. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(03\)00044-3](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(03)00044-3).
- Gan ZR, Gould RJ, Jacobs JW, Friedman PA, Polokoff MA. 1988. "A Potent Platelet Aggregation Inhibitor from the Venom of the Viper, *Echis Carinatus*." *Biol Chem.* 263: 19827–19832.

- Gao, Bin, Patrick Sherman, Lan Luo, John Bowie, and Shunyi Zhu. 2009. "Structural and Functional Characterization of Two Genetically Related Meucin Peptides Highlights Evolutionary Divergence and Convergence in Antimicrobial Peptides." *The FASEB Journal* 23 (4): 1230–45. <https://doi.org/10.1096/fj.08-122317>.
- Gao, Bin, Jia Xu, Carmen Rodriguez, Humberto Lanz-mendoza, Rosaura Hernández-rivas, Weihong Du, and Shunyi Zhu. 2010. "Biochimie Characterization of Two Linear Cationic Antimalarial Peptides in the Scorpion *Mesobuthus Eupeus*" 92: 350–59. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.01.011>.
- García-Hernández, Solimary, and Glauco Machado. 2020. "'Tail' Autotomy and Consequent Stinger Loss Decrease Predation Success in Scorpions." *Animal Behaviour* 169: 157–67. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2020.08.019>.
- Garza-García, a, G Ponzanelli-Velázquez, and del Río-Portilla F. 2001. "Deconvolution and Measurement of Spin-Spin Splittings by Modified J Doubling in the Frequency Domain." *Journal of Magnetic Resonance (San Diego, Calif. : 1997)* 148 (1): 214–19. <https://doi.org/10.1006/jmre.2000.2235>.
- Golay, J, M Luppi, S Songia, C Palvarini, L Lombardi, A Aiello, D Delia, et al. 1996. "Expression of A-Myb, but Not c-Myb and B-Myb, Is Restricted to Burkitt's Lymphoma, SIg+ B-Acute Lymphoblastic Leukemia, and a Subset of Chronic Lymphocytic Leukemias." *Blood* 87 (5): 1900–1911.
- González-Santillán, Edmundo, and Lourival D Possani. 2018. "North American Scorpion Species of Public Health Importance with a Reappraisal of Historical Epidemiology." *Acta Tropica* 187 (November): 264–74. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.08.002>.
- Gopalakrishnakone, P, Lourdes J Cruz, and Sulan Luo. n.d. *Toxins And*. Vol. I.
- Griesinger, C., G. Otting, K. Wüthrich, and R. R. Ernst. 1988. "Clean Tocsy for 1H Spin System Identification in Macromolecules." *Journal of the American Chemical Society* 110 (23): 7870–72. <https://doi.org/10.1021/ja00231a044>.
- Gulsevin, Aican, and Jens Meiler. 2020a. "An Investigation of Three-Finger Toxin-Nachr Interactions through Rosetta Protein Docking." *Toxins* 12 (9). <https://doi.org/10.3390/toxins12090598>.
- . 2020b. "An Investigation of Three-Finger Toxin-Nachr Interactions through Rosetta Protein Docking." *Toxins* 12 (9): 1–6. <https://doi.org/10.3390/toxins12090598>.
- Guo, Huabei, Bing Zhang, Alison V. Nairn, Tamas Nagy, Kelley W. Moremen, Phillip Buckhaults, and Michael Pierce. 2017. "O-Linked N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) Expression Levels Epigenetically Regulate Colon Cancer Tumorigenesis by Affecting the Cancer Stem Cell Compartment via Modulating Expression of Transcriptional Factor MYBL1." *Journal of Biological Chemistry* 292 (10): 4123–37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.763201>.
- Gurrola, Georgina B., Rogelio A. Hernández-López, Ricardo C. Rodríguez De La Vega, Zoltan Varga, Cesar V F Batista, Saida P. Salas-Castillo, Gyorgy Panyi, Federico Del Río-Portilla, and Lourival D. Possani. 2012. "Structure, Function, and Chemical Synthesis of Vaejovis Mexicanus Peptide 24: A Novel Potent Blocker of Kv1.3 Potassium Channels of Human T Lymphocytes." *Biochemistry* 51 (19): 4049–61.
- Heitzmann, Dirk, Viktoria Koren, Michael Wagner, Christina Sterner, Markus Reichold, Ines Tegtmeier, Tilmann Volk, and Richard Warth. 2007. "KCNE Beta Subunits Determine PH Sensitivity of KCNQ1 Potassium Channels." *Cellular Physiology and Biochemistry* 19 (1–4): 21–32. <https://doi.org/10.1159/000099189>.
- Hu, Youtian, Jing Chen, Bin Wang, Weishan Yang, Chuangeng Zhang, Jun Hu, Zili Xie, et al. 2015. "Engineering a Peptide Inhibitor towards the KCNQ1/KCNE1 Potassium Channel (IKs)." *Peptides* 71: 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.07.002>.
- Hwang, T. L., and A. J. Shaka. 1995. "Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients." *Journal of Magnetic Resonance - Series A* 112 (2): 275–79. <https://doi.org/10.1006/jmra.1995.1047>.

- Incamnoi, Paroonkorn, Rina Patramanon, Sompong Klaynongsruang, Arunrat Chaveerach, Wandee Bunyatratchata, Nunthawun Uawonggul, Sophida Sukprasert, et al. 2018. "Sequence Analysis and 3-Dimensional Molecular Modelling of Heteroscorpine from the Venom of *Heterometrus* Spp." *Maejo International Journal of Science and Technology* 12 (3): 187–98.
- Israel, Mathilde R, Michael Morgan, Bryan Tay, and Jennifer R Deuis. 2018. "Neuroscience Letters Toxins as Tools : Fingerprinting Neuronal Pharmacology," no. February. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.02.001>.
- IZHAR, KARBAT, COHEN LIOR, GILLES NICOLAS, GORDON DALIA, and GUREVITZ MICHAEL. 2004. "Conversion of a Scorpion Toxin Agonist into an Antagonist Highlights an Acidic Residue Involved in Voltage Sensor Trapping during Activation of Neuronal Na<sup>+</sup> Channels." *The FASEB Journal* 18 (6): 683–89. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0733com>.
- Jeon, Gye Sun, Hee Jine Byun, Sung Kyung Park, Sang Wook Park, Dong Woon Kim, Je Hoon Seo, Choong Ik Cha, and Sa Sun Cho. 2006. "Induction of Transcription Factor A-Myb Expression in Reactive Astrocytes Following an Excitotoxic Lesion in the Mouse Hippocampus." *Neurochemical Research* 31 (11): 1371–74. <https://doi.org/10.1007/s11064-006-9184-x>.
- Juichi, Hironori, Ryo Ando, Takafumi Ishido, Masahiro Miyashita, Yoshiaki Nakagawa, and Hisashi Miyagawa. 2018. "Chemical Synthesis of a Two-Domain Scorpion Toxin LaIT2 and Its Single-Domain Analogs to Elucidate Structural Factors Important for Insecticidal and Antimicrobial Activities." *Journal of Peptide Science* 24 (12). <https://doi.org/10.1002/psc.3133>.
- Juichi, Hironori, Masahiro Miyashita, Yoshiaki Nakagawa, and Hisashi Miyagawa. 2019. "Isolation and Characterization of the Insecticidal , Two-Domain Toxin LaIT3 from the *Liocheles Australasiae* Scorpion Venom." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 83 (12): 2183–89. <https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1654849>.
- Keaveney, Arthur, and A. Mayor. 2004. "Greek Fire, Poison Arrows & Scorpion Bombs: Biological and Chemical Warfare in the Ancient World." *Classics Ireland* 11 (4): 110. <https://doi.org/10.2307/25528407>.
- Keller, R. 2004. *The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial*. Goldau, Switzerland: Cantina Verlag.
- King, Glenn F. 2011. "Venoms as a Platform for Human Drugs: Translating Toxins into Therapeutics." *Expert Opinion on Biological Therapy* 11 (11): 1469–84. <https://doi.org/10.1517/14712598.2011.621940>.
- Kozlov, Sergey A., Alexander A. Vassilevski, Alexei V. Feofanov, Andrey Y. Surovoy, Dmitry V. Karpunin, and Eugene V. Grishin. 2006. "Latarcins, Antimicrobial and Cytolytic Peptides from the Venom of the Spider *Lachesana Tarabaevi* (Zodariidae) That Exemplify Biomolecular Diversity." *Journal of Biological Chemistry* 281 (30): 20983–92. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602168200>.
- la Rosa, Guillermo de, Ligia L. Corrales-García, Ximena Rodriguez-Ruiz, Estuardo López-Vera, and Gerardo Corzo. 2018. "Short-Chain Consensus Alpha-Neurotoxin: A Synthetic 60-Mer Peptide with Generic Traits and Enhanced Immunogenic Properties." *Amino Acids* 50 (7): 885–95. <https://doi.org/10.1007/s00726-018-2556-0>.
- Lebreton, F., M. Delepierre, A. N. Ramírez, C. Balderas, and L. D. Possani. 1994. "Primary and NMR Three-Dimensional Structure Determination of a Novel Crustacean Toxin from the Venom of the Scorpion *Centruroides Limpidus Limpidus* Karsch." *Biochemistry* 33 (37): 11135–49. <https://doi.org/10.1021/bi00203a010>.
- Lee, Woonghee, Marco Tonelli, and John L. Markley. 2015. "NMRFAM-SPARKY: Enhanced Software for Biomolecular NMR Spectroscopy." *Bioinformatics* 31 (8): 1325–27. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu830>.
- Legros, Christian, Brigitte Céard, Pierre E. Bougis, and Marie France Martin-Eauclaire. 1998. "Evidence for a New Class of Scorpion Toxin Active against K<sup>+</sup> Channels." *FEBS Letters* 431 (3): 375–80. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00780-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00780-7).

- Leonard, Paul, Stephen Hearty, and Richard O’Kennedy. 2011. “Measuring Protein--Protein Interactions Using Biacore.” In *Protein Chromatography: Methods and Protocols*, edited by Dermot Walls and Sinéad T Loughran, 403–18. Totowa, NJ: Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0\\_22](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0_22).
- Levitt, Malcolm H., Ray Freeman, and Thomas Frenkiel. 1982. “Broadband Heteronuclear Decoupling.” *Journal of Magnetic Resonance (1969)* 47 (2): 328–30. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(82\)90124-X](https://doi.org/10.1016/0022-2364(82)90124-X).
- Lian, Ling, Xin Li, Chunfang Zhao, Bo Han, Lujiang Qu, Jiuzhou Song, Changjun Liu, and Ning Yang. 2015. “Chicken Gga-MiR-181a Targets MYBL1 and Shows an Inhibitory Effect on Proliferation of Marek’s Disease Virus-Transformed Lymphoid Cell Line.” *Poultry Science* 94 (11): 2616–21. <https://doi.org/10.3382/ps/pev289>.
- López-Giraldo, Andrea Estefanía, Timoteo Olamendi-Portugal, Lidia Riaño-Umbarila, Baltazar Becerril, Lourival D. Possani, Muriel Delepierre, and Federico Del Río-Portilla. 2020. “The Three-Dimensional Structure of the Toxic Peptide Cl13 from the Scorpion *Centruroides Limpidus*.” *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology* 184 (June): 158–66. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.06.011>.
- Luo, Feng, Xian-chun Zeng, Richard Hahin, Zhi-jian Cao, Hui Liu, and Wen-xin Li. 2005. “Genomic Organization of Four Novel Nondisulfide-Bridged Peptides from Scorpion *Mesobuthus Martensii* Karsch : Gaining Insight into Evolutionary Mechanism &” 26: 2427–33. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.06.008>.
- MacHado, Luciana E.S.F., Viviane S. De Paula, Yulia Pustovalova, Irina Bezsonova, Ana Paula Valente, Dmitry M. Korzhnev, and Fabio C.L. Almeida. 2018. “Conformational Dynamics of a Cysteine-Stabilized Plant Defensin Reveals an Evolutionary Mechanism to Expose Hydrophobic Residues.” Research-article. *Biochemistry* 57 (40): 5797–5806. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00753>.
- Maraganore JM, Bourdon P, Jablonski J, Ramachandran KL, Fenton 2nd JW. 1990. “Design and Characterization of Hirulogs: A Novel Class of Bivalent Peptide Inhibitors of Thrombin.” *Biochemistry*. 29: 7095–7101.
- Markossian S, Sittampalam GS, Grossman A. 2017. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. Edited by Sarine Markossian, G Sitta Sittampalam, Abigail Grossman, Kyle Brimacombe, Michelle Arkin, Douglas Auld, Christopher P Austin, et al. Bethesda (MD).
- Markwardt F. 1970. “Hirudin as an Inhibitor of Thrombin.” *Method Enzymol*. 19: 924–932.
- Matsushita, Nobuto, Masahiro Miyashita, Yayoi Ichiki, Takehiko Ogura, Eiji Sakuradani, Yoshiaki Nakagawa, Sakayu Shimizu, and Hisashi Miyagawa. 2009. “Purification and cDNA Cloning of LaIT2, a Novel Insecticidal Toxin from Venom of the Scorpion *Liocheles Australasiae*.” *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 73 (12): 2769–72. <https://doi.org/10.1271/bbb.90509>.
- Medvedeva, Svetlana, Jean Pierre Simorre, Bernhard Brutscher, Françoise Guerlesquin, and Dominique Marion. 1993. “Extensive 1H NMR Resonance Assignment of Proteins Using Natural Abundance Gradient-Enhanced 13C-1H Correlation Spectroscopy.” *FEBS Letters* 333 (3): 251–56. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80664-G](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80664-G).
- Micsonai, András, Frank Wien, Linda Kernya, Young Ho Lee, Yuji Goto, Matthieu Réfrégiers, and József Kardos. 2015. “Accurate Secondary Structure Prediction and Fold Recognition for Circular Dichroism Spectroscopy.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (24): E3095–3103. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500851112>.
- Miljanich GP. 2004. “Ziconotide: Neuronal Calcium Channel Blocker for Treating Severe Chronic Pain.” *Curr Med Chem*. 11: 3029–3040.
- Norton, Raymond S. 2018. “Peptide Toxin Structure and Function by NMR.” In *Modern Magnetic Resonance*, edited by Graham A Webb, 2081–97. Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-28388-3\\_120](https://doi.org/10.1007/978-3-319-28388-3_120).
- Olamendi-Portugal, Timoteo, Rita Restano-Cassulini, Lidia Riaño-Umbarila, Baltazar Becerril, and Lourival D. Possani. 2017. “Functional and Immuno-Reactive Characterization of a Previously Undescribed Peptide from

- the Venom of the Scorpion *Centruroides Limpidus*." *Peptides* 87 (January): 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.11.008>.
- Olivera, Baldomero M., Jean Rivier, Craig Clark, Cecilia A. Ramilo, Gloria P. Corpuz, Fe C. Abogadie, E. Edward Mena, Scott R. Woodward, David R. Hillyard, and Lourdes J. Cruz. 1990. "Diversity of Conus Neuropeptides." *Science* 249 (4966): 257–63. <https://doi.org/10.1126/science.2165278>.
- Ortiz, Ernesto, and Lourival D Possani. 2018. "Scorpion Toxins to Unravel the Conundrum of Ion Channel Structure and Functioning." *Toxicon*. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.04.032>.
- Pennington, Michael W., Andrzej Czerwinski, and Raymond S. Norton. 2018. "Peptide Therapeutics from Venom: Current Status and Potential." *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 26 (10): 2738–58. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.09.029>.
- Peroz, David, Nicolas Rodriguez, Frank Choveau, Isabelle Baró, Jean Mérot, and Gildas Loussouarn. 2008. "Kv7.1 (KCNQ1) Properties and Channelopathies." *Journal of Physiology* 586 (7): 1785–89. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.148254>.
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. J. 2004. "UCSF Chimera--a Visualization System for Exploratory Research and Analysis." *Comput Chem*. 25 (13): 1605-1612.
- Piantini, U., O. W. Sørensen, and R. R. Ernst. 1982. "Multiple Quantum Filters for Elucidating NMR Coupling Networks." *Journal of the American Chemical Society* 104 (24): 6800–6801. <https://doi.org/10.1021/ja00388a062>.
- Pintar, Alessandro, Lourival D. Possani, and Muriel Delepierre. 1999. "Solution Structure of Toxin 2 from *Centruroides Noxius Hoffmann*, a  $\beta$ -Scorpion Neurotoxin Acting on Sodium Channels." *Journal of Molecular Biology* 287 (2): 359–67. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2611>.
- Possani, Lourival D., Baltazar Becerril, Muriel Delepierre, and Jan Tytgat. 1999. "Scorpion Toxins Specific for Na<sup>+</sup>-Channels." *European Journal of Biochemistry*. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00625.x>.
- Possani, Lourival D. 2019. "Hadrurid Scorpion Toxins : Evolutionary Conservation and Selective Pressures," 17–20.
- Possani, Lourival D, Baltazar Becerril, Muriel Delepierre, and Jan Tytgat. 2001. "Scorpion Toxins Specific for Na<sup>+</sup> - Channels" 300 (1999).
- Possani, Lourival D, Miguel Corona, and Mario H Rodríguez. 2002. "From Noxiustoxin to Scorpine and Possible Transgenic Mosquitoes Resistant to Malaria" 33: 398–404.
- Prouse, Michael B., and Malcolm M. Campbell. 2012. "The Interaction between MYB Proteins and Their Target DNA Binding Sites." *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1819 (1): 67–77. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.10.010>.
- Ramírez, Angelina N., Brian M. Martin, Georgina B. Gurrola, and Lourival D. Possani. 1994. "Isolation and Characterization of a Novel Toxin from the Venom of the Scorpion *Centruroides Limpidus Limpidus* Karsch." *Toxicon* 32 (4): 479–90. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90300-X](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90300-X).
- Ramkisson, Lori a, Peleg M Horowitz, Justin M Craig, Shakti H Ramkisson, and Benjamin E Rich. n.d. "Genomic Analysis of Diffuse Pediatric Low-Grade Gliomas Identifies Recurrent Oncogenic Truncating Rearrangements in the Transcription Factor MYBL1," 1–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300252110/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1300252110>.
- Rance, M., O. W. Sørensen, G. Bodenhausen, G. Wagner, R. R. Ernst, and K. Wüthrich. 1983. "Improved Spectral Resolution in COSY 1H NMR Spectra of Proteins via Double Quantum Filtering." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 117 (2): 479–85. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(83\)91225-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(83)91225-1).
- Riaño-Umbarila, Lidia, Gabriel Contreras-Ferrat, Timoteo Olamendi-Portugal, Citlalli Morelos-Juárez, Gerardo Corzo, Lourival D. Possani, and Baltazar Becerril. 2011. "Exploiting Cross-Reactivity to Neutralize Two



- Different Scorpion Venoms with One Single Chain Antibody Fragment." *Journal of Biological Chemistry* 286 (8): 6143–51. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.189175>.
- Riaño-Umbarila, Lidia, Ilse V. Gómez-Ramírez, Luis M. Ledezma-Candanoza, Timoteo Olamendi-Portugal, Everardo Remi Rodríguez-Rodríguez, Guillermo Fernández-Taboada, Lourival D. Possani, and Baltazar Becerril. 2019. "Generation of a Broadly Cross-Neutralizing Antibody Fragment against Several Mexican Scorpion Venoms." *Toxins* 11 (1). <https://doi.org/10.3390/toxins11010032>.
- Riaño-Umbarila, Lidia, Victor Rivelino Juárez-González, Timoteo Olamendi-Portugal, Mauricio Ortíz-León, Lourival Domingos Possani, and Baltazar Becerril. 2005. "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." *FEBS Journal* 272 (10): 2591–2601. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04687.x>.
- Riaño-Umbarila, Lidia, Luis M. Ledezma-Candanoza, Hugo Serrano-Posada, Guillermo Fernández-Taboada, Timoteo Olamendi-Portugal, Sonia Rojas-Trejo, Ilse V. Gómez-Ramírez, Enrique Rudiño-Piñera, Lourival D. Possani, and Baltazar Becerril. 2016. "Optimal Neutralization of Centruroides Noxius Venom Is Understood through a Structural Complex between Two Antibody Fragments and the Cn2 Toxin." *Journal of Biological Chemistry* 291 (4): 1619–30. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.685297>.
- Riaño-Umbarila, Lidia, Timoteo Olamendi-Portugal, Citlalli Morelos-Juárez, Georgina B Gurrola, Lourival D Possani, and Baltazar Becerril. 2013. "A Novel Human Recombinant Antibody Fragment Capable of Neutralizing Mexican Scorpion Toxins." *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology* 76 (December): 370–76. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.09.016>.
- Rocha ESM, Beraldo WT, Rosenfeld G. 1949. "Bradykinin, a Hypotensive and Smooth Muscle Stimulating Factor Released from Plasma Globulin by Snake Venoms and by Trypsin." *Am J Physiol.* 156: 261–273.
- Rogowski, R S, B K Krueger, J H Collins, and M P Blaustein. 1994. "Tityustoxin K Alpha Blocks Voltage-Gated Noninactivating K+ Channels and Unblocks Inactivating K+ Channels Blocked by Alpha-Dendrotoxin in Synaptosomes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (4): 1475–79. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.4.1475>.
- Sala, Arturo. 2005. "B-MYB, a Transcription Factor Implicated in Regulating Cell Cycle, Apoptosis and Cancer." *European Journal of Cancer* 41 (16): 2479–84. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.08.004>.
- Santibáñez-López, Carlos E., Oscar F. Francke, Carolina Ureta, and Lourival D. Possani. 2015. "Scorpions from Mexico: From Species Diversity to Venom Complexity." *Toxins*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/toxins8010002>.
- Saucedo, Alma L., Federico Del Rio-Portilla, Cristiana Picco, Georgina Estrada, Gianfranco Prestipino, Lourival D. Possani, Muriel Delepierre, and Gerardo Corzo. 2012. "Solution Structure of Native and Recombinant Expressed Toxin CssII from the Venom of the Scorpion Centruroides Suffusus Suffusus, and Their Effects on Nav1.5 Sodium Channels." *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1824 (3): 478–87. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.01.003>.
- Scarborough RM, Rose JW, Hsu MA, et al. Barbourin. 1991. "A GPIIb-IIIa-Specific Integrin Antagonist from the Venom of Sistrurus m. Barbouri." *J Biol Chem.* 266: 9359–9362.
- Schaenzer, Adam J, and Gerard D Wright. 2020. "Antibiotic Resistance by Enzymatic Modi Fi Cation of Antibiotic Targets." *Trends in Molecular Medicine*, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.05.001>.
- Schiavon, Emanuele, Martha Pedraza-Escalona, Georgina B. Gurrola, Timoteo Olamendi-Portugal, Gerardo Corzo, Enzo Wanke, and Lourival D. Possani. 2012. "Negative-Shift Activation, Current Reduction and Resurgent Currents Induced by  $\beta$ -Toxins from Centruroides Scorpions in Sodium Channels." *Toxicon* 59 (2): 283–93. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.12.003>.
- Schiavon, Emanuele, Tiziana Sacco, Rita Restano Cassulini, Georgina Gurrola, Filippo Tempia, Lourival D. Possani, and Enzo Wanke. 2006. "Resurgent Current and Voltage Sensor Trapping Enhanced Activation by a  $\beta$ -

- Scorpion Toxin Solely in Na v1.6 Channel: Significance in Mice Purkinje Neurons." *Journal of Biological Chemistry* 281 (29): 20326–37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600565200>.
- Schwartz, Elisabeth F, Elia Diego-garcia, Ricardo C Rodríguez, De Vega, and Lourival D Possani. 2007. "Hadrurus Gertschi ( Arachnida : Scorpiones )" 12: 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-119>.
- Secretaria de Salud. 2015. "Casos Por Entidad Federativa de Enfermedades No Transmisibles Hasta La Semana Epidemiológica." In *B. d. V. Epidemiologica*, edited by V.D.B.Epidemiologia, 52. Mexico.
- Seebohm, Guiscard, Jun Chen, Nathalie Strutz, Chris Culberson, Christian Lerche, and Michael C. Sanguinetti. 2003. "Molecular Determinants of KCNQ1 Channel Block by a Benzodiazepine." *Molecular Pharmacology* 64 (1): 70–77. <https://doi.org/10.1124/mol.64.1.70>.
- Shen, Yang, and Ad Bax. 2013. "Protein Backbone and Sidechain Torsion Angles Predicted from NMR Chemical Shifts Using Artificial Neural Networks." *Journal of Biomolecular NMR* 56 (3): 227–41. <https://doi.org/10.1007/s10858-013-9741-y>.
- States, D. J., R. A. Haberkorn, and D. J. Ruben. 1982. "A Two-Dimensional Nuclear Overhauser Experiment with Pure Absorption Phase in Four Quadrants." *Journal of Magnetic Resonance (1969)* 48 (2): 286–92. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(82\)90279-7](https://doi.org/10.1016/0022-2364(82)90279-7).
- Swartz, C. D., C. A. Afshari, L. Yu, K. E. Hall, and D. Dixon. 2005. "Estrogen-Induced Changes in IGF-I, Myb Family and MAP Kinase Pathway Genes in Human Uterine Leiomyoma and Normal Uterine Smooth Muscle Cell Lines." *Molecular Human Reproduction* 11 (6): 441–50. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah174>.
- Takahashi, Tomomi, Hideki Nakagoshi, Akinori Sarai, Nobuo Nomura, Tadashi Yamamoto, and Shunsuke Ishii. 1995. "Human A-Myb Gene Encodes a Transcriptional Activator Containing the Negative Regulatory Domains." *FEBS Letters* 358 (1): 89–96. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)01402-M](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)01402-M).
- Tammaro, Paolo, Kenju Shimomura, and Peter Proks. 2008. "Xenopus Oocytes as a Heterologous Expression System for Studying Ion Channels with the Patch-Clamp Technique." *Methods in Molecular Biology* 491 (3): 127–39. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-526-8\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-526-8_10).
- Tang, Huanghui, and Erwin Goldberg. 2012. "A-MYB (MYBL1) Stimulates Murine Testis-Specific Ldhc Expression via the CAMP-Responsive Element (CRE) Site1." *Biology of Reproduction* 86 (2): 1–8. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.095661>.
- "The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC." n.d.
- Tytgat, Jan, K. George Chandy, Maria L. Garcia, George A. Gutman, Marie France Martin-Eauclaire, Jurg J. Van Der Walt, and Lourival D. Possani. 1999. "A Unified Nomenclature for Short-Chain Peptides Isolated from Scorpion Venoms: ??-KTx Molecular Subfamilies." *Trends in Pharmacological Sciences* 20 (11): 444–47. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(99\)01398-X](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(99)01398-X).
- Uawonggul, Nunthawun, Sompong Thammasirirak, and Arunrat Chaveerach. 2007. "Purification and Characterization of Heteroscorpine-1 ( HS-1 ) Toxin from Heterometrus Laoticus Scorpion Venom" 49: 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.09.003>.
- Vargas, Leonel, Jaimes María, Carmen Rodriguez, Rocío Argotte, Ramos Víctor, and Rivelino Juárez. 2021. "Recombinant C - Terminal Domains from Scorpine - like Peptides Inhibit the Plasmodium Berghei Ookinete Development In Vitro," 817–29.
- Vetter, Irina. 2012. "Development and Optimization of FLIPR High Throughput Calcium Assays for Ion Channels and GPCRs." In *Calcium Signaling*, edited by Md. Shahidul Islam, 740th ed., 45–82. Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2_3).
- Vizioli, Jacopo, and Michel Salzet. 2002. "Antimicrobial Peptides versus Parasitic Infections?" *Trends in Parasitology* 18 (11): 475–76. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02428-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02428-5).

- Wüthrich, K. 2015. *NMR of Proteins and Nucleic Acids. Nuclear Magnetic Resonance*. Vol. 44. <https://doi.org/10.139/9781782622758-00348>.
- Wüthrich, Kurt. 1986. "NMR with Proteins and Nucleic Acids." *Europhysics News*. <https://doi.org/10.1051/e pn/19861701011>.
- Zasloff, Michael. 2019. "Antimicrobial Peptides of Multicellular Organisms: My Perspective." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1117 (January): 3–6. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-3588-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-13-3588-4_1).
- Zeng, Xian-chun, Gerardo Corzo, and Richard Hahin. 2005. "Critical Review Scorpion Venom Peptides without Disulfide Bridges" 57 (January): 13–21. <https://doi.org/10.1080/15216540500058899>.
- Zhu, S, and J Tytgat. 2004. "The Scorpine Family of Defensins : Gene Structure , Alternative Polyadenylation and Fold Recognition" 61: 1751–63. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4149-1>.
- Zhu, Shunyi, Bin Gao, André Aumelas, Carmen Rodríguez, Humberto Lanz-mendoza, Steve Peigneur, Elia Diego-garcia, Marie-france Martin-eauclaire, Jan Tytgat, and Lourival D Possani. 2010. "Biochimica et Biophysica Acta MeuTXK  $\beta$  1 , a Scorpion Venom-Derived Two-Domain Potassium Channel Toxin-like Peptide with Cytolytic Activity." *BBA - Proteins and Proteomics* 1804 (4): 872–83. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.12.017>.
- Zhu, Shunyi, Wenxin Li, Xianchun Zeng, Dahe Jiang, Xin Mao, and Hui Liu. 1999. "Molecular Cloning and Sequencing of Two ` Short Chain ' and Two ` Long Chain ' K<sup>+</sup> Channel-Blocking Peptides from the Chinese Scorpion *Buthus Martensii* Karsch" 457: 509–14.

## 9 ANEXOS

### ANEXO 1. Medios de cultivo y disoluciones.

#### MEDIO LURIA BERTANI (LB)

TRIPSINA	10 g/L
EXTRACTO DE LEVADURA	5 g/L
NACL	10 g/L
PH	7

#### AMORTIGUADOR DE LISIS (BL)

KCL	2.0 mM
NACL	130.0 mM
NA <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10.0 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.7 mM
PH	6.5

**AMORTIGUADOR DE CORTE SIN AGENTE  
CAOTRÓPICO**

TRIS	50.0 Mm
CACL <sub>2</sub>	1 Mm
PH	8.0

**5X TBE**

TRIS-BORATO	0.45 M
EDTA	10 mM
GLICEROL	25 %
PH	7

**DISOLUCIÓN PARA PREPARAR 1 GEL DE POLIACRILAMMIDA  
PARA EMSA**

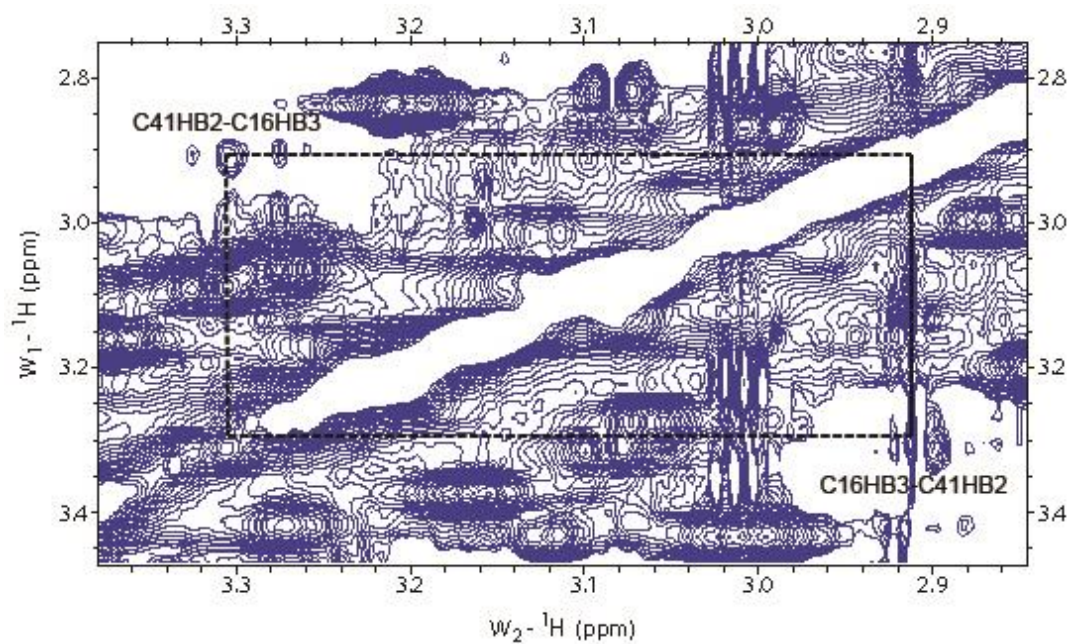
30% ACRILAMIDA/BIS (37.5:1)	10 mL
5X TBE	5 mL
10 % PERSULFATO DE AMONIO	350 µL
TEMED	100 µL
H <sub>2</sub> O	37.5 mL

**AMORTIGUADOR DE ENLACE PARA EMSA 2X**

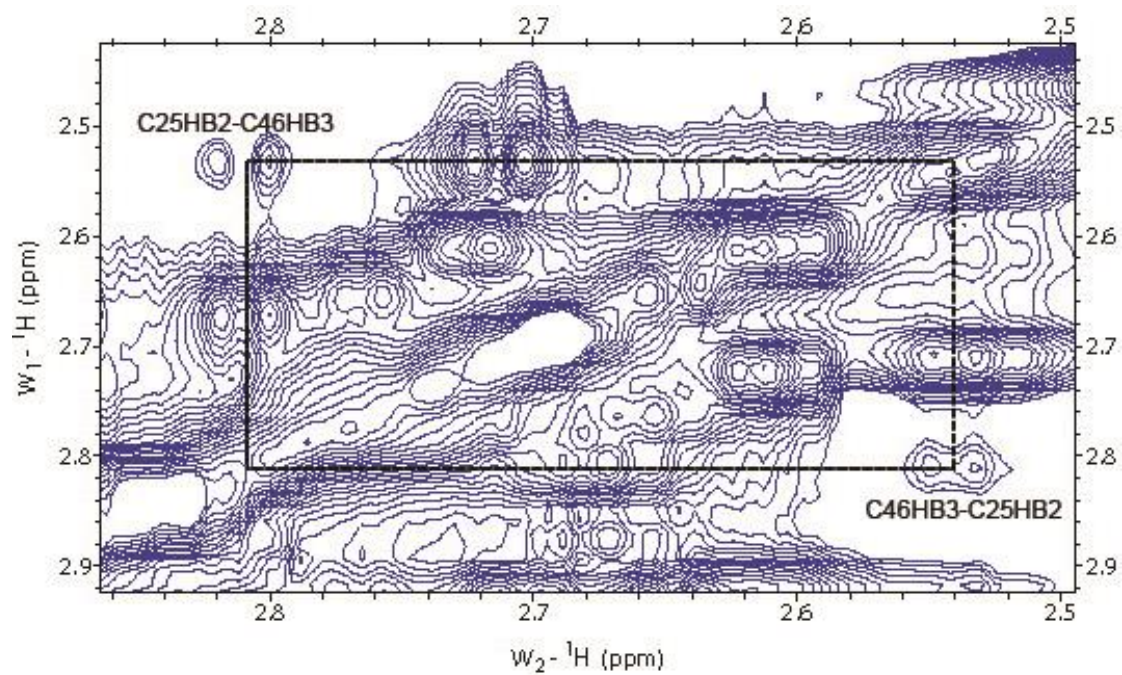
TRIS-BASE	40 mM
EDTA	1 mM
MGCL <sub>2</sub>	8 mM
KCL	120 mM
GLICEROL	20 %
PH	8

## ANEXO 2. Resultados adicionales del capítulo 2.

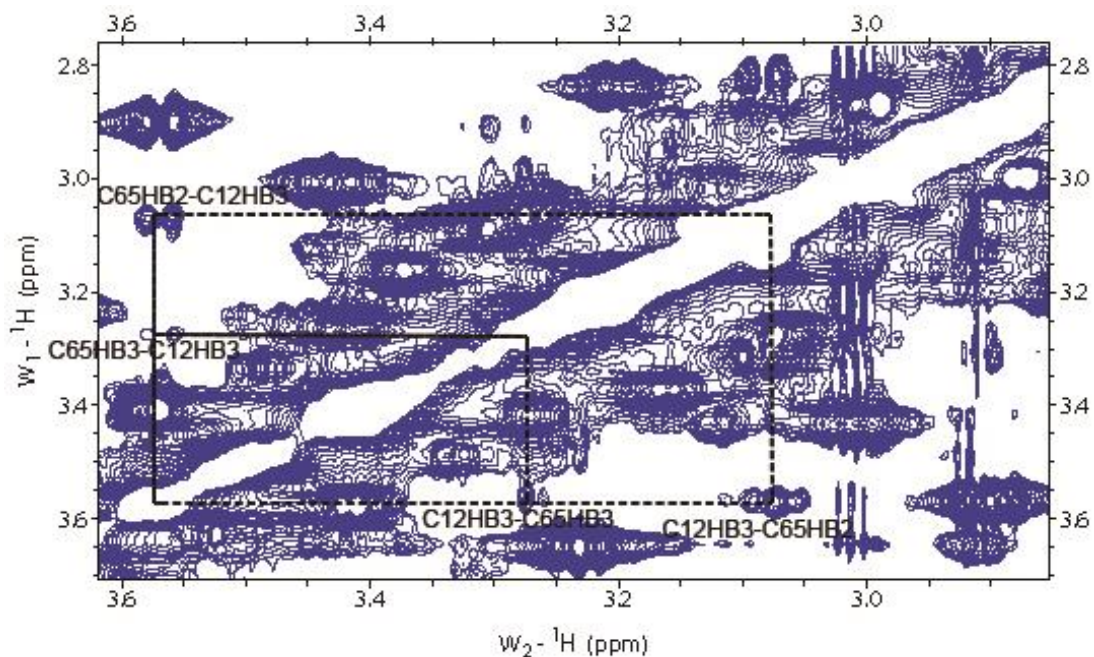
1.A



1.B

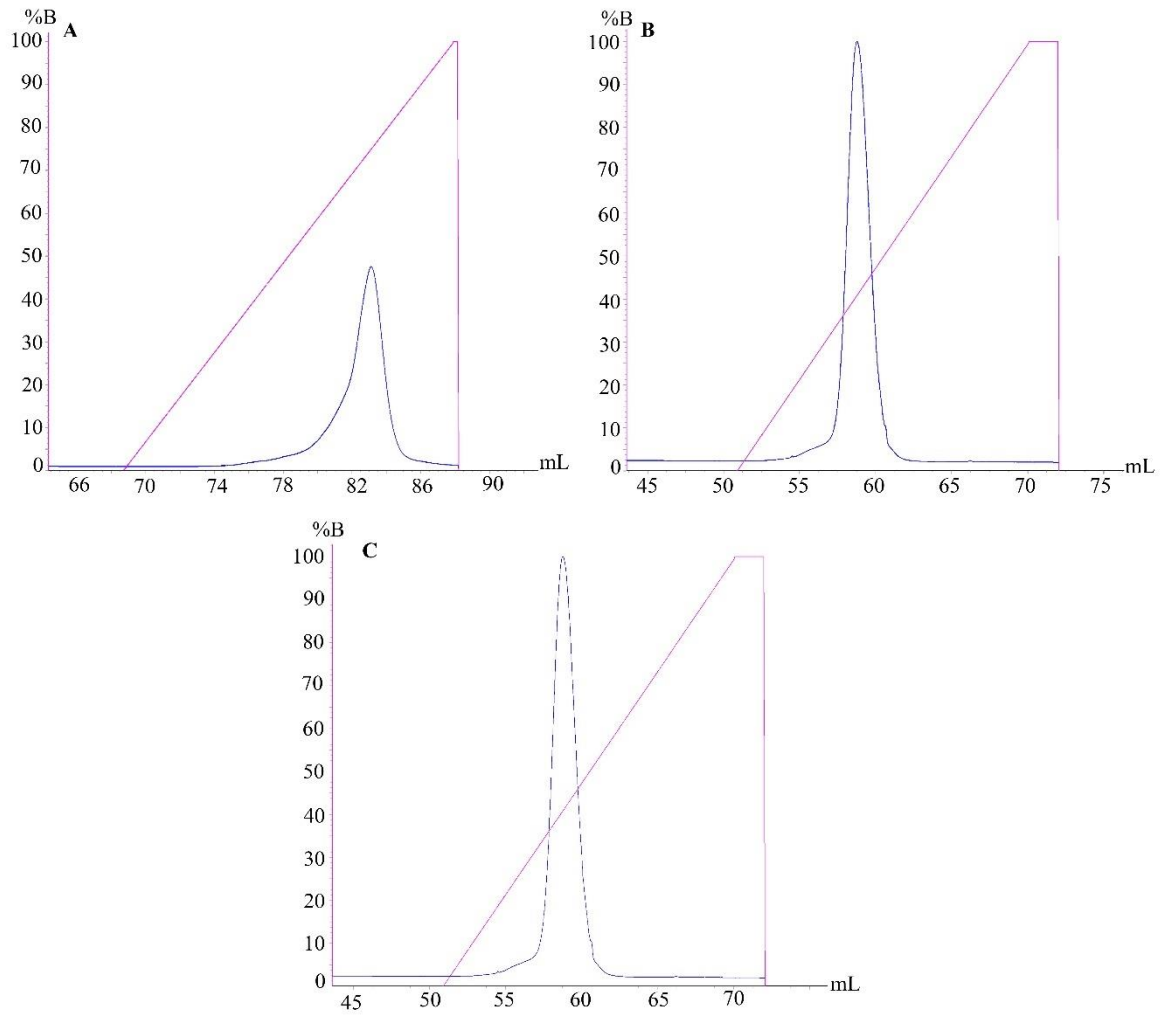


1.C

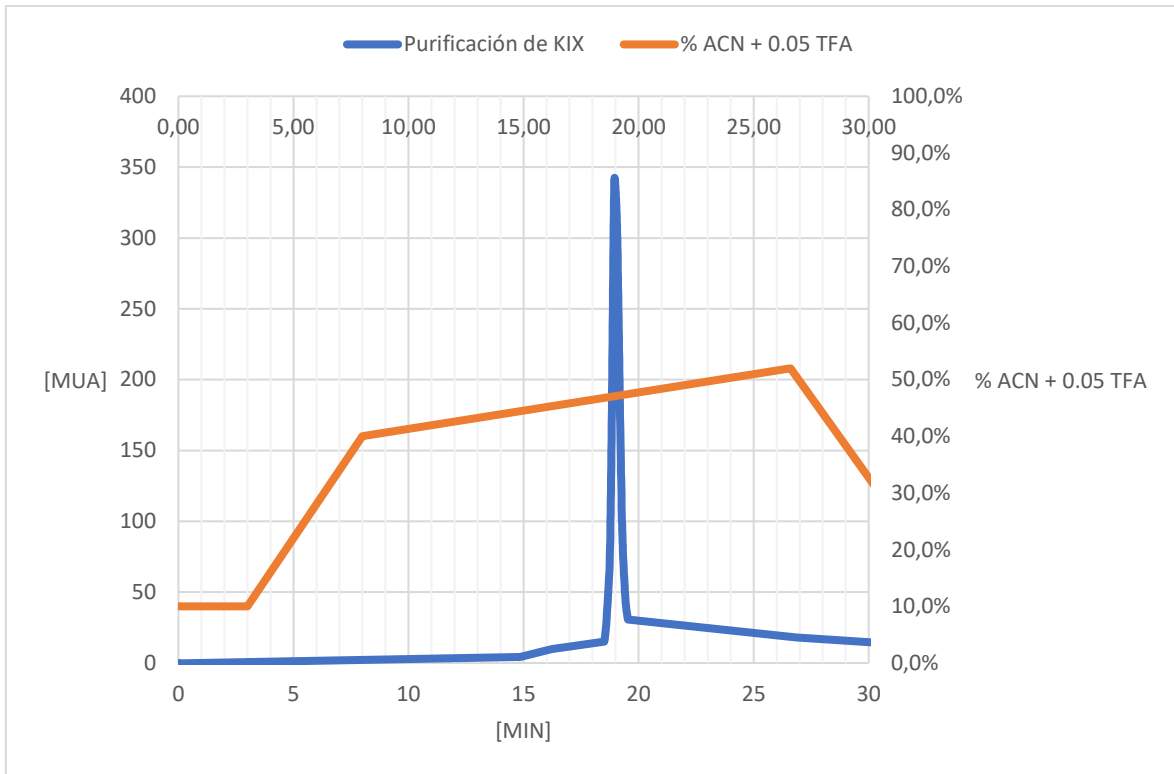


**Figure 1A.** Región Hb-Hb del NOESY 150 ms a 600 MHz. A) Correlación entre C41 y C16. 1.B) Correlación entre C25 y C46, y 1.C) Correlación entre C65 y C412.

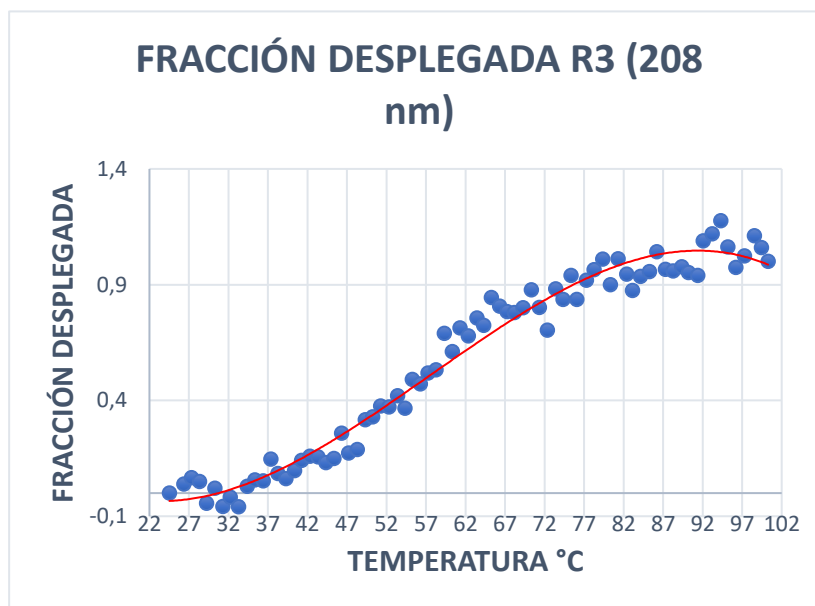
**ANEXO 3.** Resultados adicionales del capítulo 6.



**Figura A2.** Cromatograma de la purificación de A) R2, B) R3 y C) COM empleando una columna de intercambio catiónico HP SP FF. %B Equivale a PBS 1M NaCl.

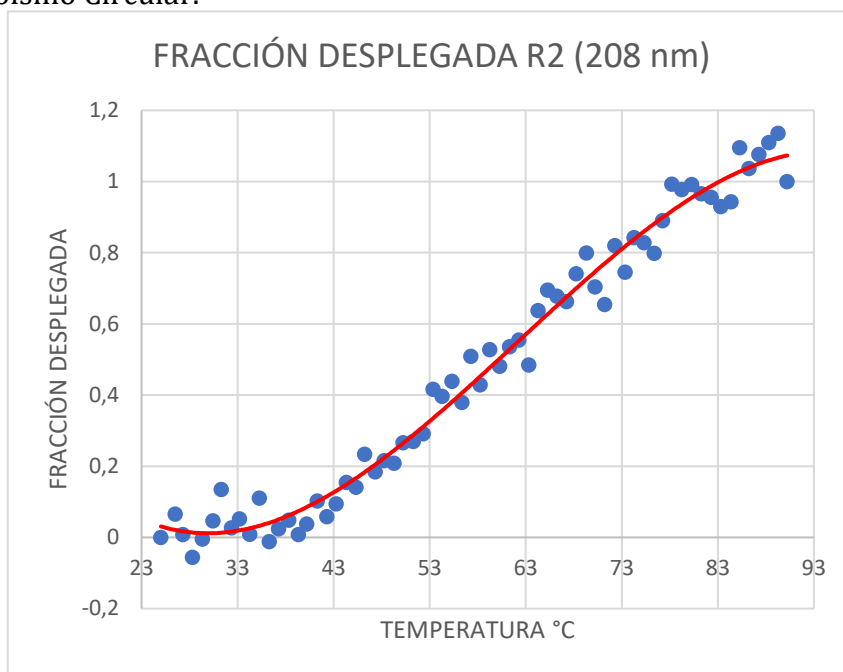


**Figura A3.** Cromatograma de la purificación del dominio KIX mediante RP-HPLC. Se observan un pico cromatográfico en el intervalo 15- 20, correspondiente a KIX replegada. Columna: Aeris Peptide, XB-C18, 250 x 4.60 mm, tamaño de partícula 3.6  $\mu\text{m}$ , detección: UV-VIS a 230 nm. Fase móvil: H<sub>2</sub>O + 0.05% TFA y ACN + 0.05% TFA, flujo: 1 mL/min.

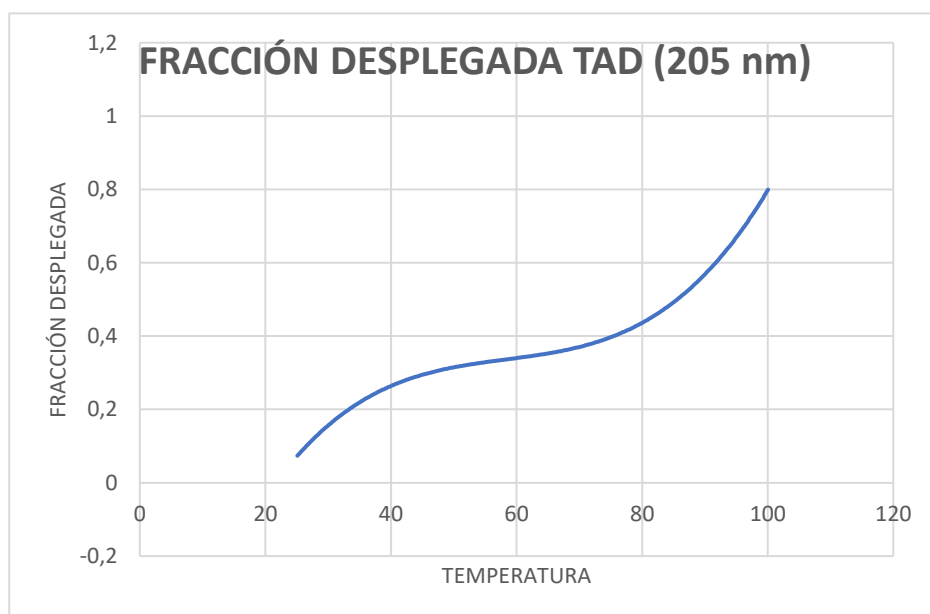




**Figura A4.** Curva de desplegamiento de R3 monitoreada a 208 nm empleando Dicroísmo Circular.



**Figura A5.** Curva de desplegamiento de R2 monitoreada a 208 nm empleando Dicroísmo Circular.



**Figura A6.** Curva de desplegamiento de TAD monitoreada a 208 nm empleando Dicroísmo Circular.

**ANEXO 4.** Artículo “Structural and Functional Studies Reveal the Presence of Two Different Activities for Scorpine: One Blocking Channel Activity and One Cytolytic Activity” en preparación.

Structural and Functional Studies Reveal the Presence of Two Different Activities for Scorpine: One Blocking Channel Activity and One Cytolytic Activity

Estefanía López-Giraldo<sup>1</sup>, Elisa Carrillo<sup>2</sup>, Gustavo Titau Delgado<sup>1</sup>, Patricia Cano-Sánchez<sup>1</sup>, Alland Colorado<sup>1</sup>, Lourival Possani-Postay<sup>3</sup> and Federico del Río-Portilla<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, CdMx, México.

<sup>2</sup>Center for Membrane Biology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Texas Health Science Center at Houston, Houston, Texas, USA.

<sup>3</sup>Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México.

\*Correspondence:

Federico del-Rio Portilla

federico.delrio@gmail.com, jfrp@unam.mx

Keywords:  $\beta$ -KTx, cytolytic peptides, NMR solution structure, potassium channels, scorpine, scorpine like-peptides.

Abstract

Scorpine is an antimicrobial and antimalarial peptide isolated from the *Pandinus imperator* scorpion venom. Since, there are few functional and structural studies reported of scorpine like-peptides, we studied by biological assays the recombinant N-terminal, C-terminal domains as well as the complete scorpine and we determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy the N-terminal and C-terminal structures. The study was conducted using the recombinant peptides N-terminal, C-terminal, and the complete scorpine expressed in *E. coli*. The results showed that N-scorpine presents a random coil structure in water and it adopts an  $\alpha$ -helical folding in the presence of 50% trifluoroethanol. C-scorpine contains three disulfide bonds with two structural domains: an unstructured N-terminal domain in water which can form a typical secondary alpha-helix structure in 50% TFE and a C-terminal domain with a cysteine-stabilized  $\alpha/\beta$  (CS- $\alpha\beta$ ) motif. Our findings demonstrate the presence of cytolytic activity associated with C-scorpine, N-scorpine and scorpine, as well as the presence of blocking channel activity associated with the C-scorpine domain.

Introduction

Scorpions have medical relevance due to a wide variety of biologically active peptides present in their venom (Andreotti, N., Di Luccio, E., Sampieri, F., De Waard, M. S., and Sabatier 2005; Possani et al. 1999; Cid-Urbe et al. 2020). The active peptides have played a key role in the innate defense of the host and typically have shown activity against a broad spectrum of organisms, including filamentous fungi, gram-negative bacteria, parasites, and viruses (S Zhu and Tytgat 2004; García-Hernández and Machado 2020). Based on the composition and structure, venom peptides have been classified into several groups, highlighting linear  $\alpha$ -helical peptides like cecropins and cysteine-rich forming disulfide bonds like defensins (Vizioli and Salzet 2002; S Zhu and Tytgat 2004).

A 75 amino acid (aa) peptide with hybrid characteristics called scorpine was isolated from the African scorpion *Pandinus imperator* venom (Conde, R., Zamudio, F. Z., Rodríguez, M. H., and Possani 2000). In the peptide primary structure was found an amino terminal sequence similar to cecropins, a cysteine rich zone with a Cys pattern typical of invertebrate defensins (CX4-15CX2HCX6-9GX1CX4-9CX1C), and a possible  $\alpha/\beta$  structural motif (Conde, R., Zamudio, F. Z., Rodríguez, M. H., and Possani 2000). Scorpine became a new interesting object of study as a molecule against malaria, because it is 100 times more active than other antimalarials reported (Possani, Corona, and Rodríguez 2002; Conde et al. 2001), it also represented a new group (scorpine-like peptides) of long-chain antimicrobial peptides. Several peptides homologous to the scorpine have been identified (Possani 2019; Bitar et al. 2020; Juichi et al. 2019; Vargas et al. 2021), including Opiscorpina 1-4 from the scorpion *Opisthophthalmus carinatus* (S Zhu and Tytgat 2004), Heteroscorpina-1 from the scorpion *Heterometrus laoticus* (Uawonggul, Thammasirirak, and Chaveerach 2007; Incamnoi et al. 2018) and HgeScplp

from the scorpion American *Hadrurus gertschi* (Elia Diego-García et al. 2007; Schwartz et al. 2007). Later, Diego-García et al. reported the scorpine-like peptides with the  $\beta$ -KTx toxins, these are molecules with neurotoxic characteristics used by scorpions mainly to kill or paralyze their prey (Ortiz and Possani 2018; Rogowski et al. 1994). Subsequently, due to the limited characterization,  $\beta$ -KTx and scorpine-like peptides were called orphan peptides and, a new classification for three subfamilies was proposed: 1) Peptides related to the TsTX-K $\beta$  toxin, including AaTX-K $\beta$ , BmTXK $\beta$ 2 and Tco $\beta$ KTx; 2) BmTXK $\beta$ -related peptides including TcoKIK, TdiKIK and TtrKIK, finally, 3) Scorpine-like peptides. The peptides belonging to the three subfamilies showed a high identity between them inside each subfamily (50-97%) and a low average identity between the subfamilies (< 30%) (Elia Diego-García et al. 2007). While the first two groups have shown neurotoxic features blocking potassium channels, the third group has shown mainly strong antimicrobial, antiparasitic and cytolytic activity against eukaryotic cells (Cao et al. 2003; Legros et al. 1998; Elia Diego-García et al. 2005; Juichi et al. 2018; Matsushita et al. 2009; Juichi et al. 2019; Conde, R., Zamudio, F. Z., Rodríguez, M. H., and Possani 2000; Rogowski et al. 1994).

Although  $\beta$ -KTx and scorpine-like peptides information is increasing, their relationship is still not clear, neither the interaction mechanism of  $\beta$ -KTx and scorpine-like peptides with their molecular targets. Hybrid functionality of scorpine-like peptides has been of interest in several studies, investigating if the possible neurotoxic activity is masked by the antimicrobial or cytolytic function. It was reported that removing an N-terminal sequence, while the potassium channel blocking activity is acquired by the scorpine-like peptide HgeScplp1, the blocking activity is decreased by Ev37. This type of behavior has also been observed for the antimicrobial activity (Feng et al. 2013; E. Diego-García et al. 2008).  $\beta$ -KTx and scorpine-like peptides represent some remarkable groups of peptides reported with multiple activities, including antimicrobial, cytolytic, antifungal, antiparasitic and neurotoxic activities (Batista, C. V. F., Román-González, S. A., Salas-Castillo, S. P., Zamudio, F. Z., Gómez-Lagunas, F., and Possani 2007; Conde, R., Zamudio, F. Z., Rodríguez, M. H., and Possani 2000; Possani, Corona, and Rodríguez 2002; Uawonggul, Thammasirirak, and Chaveerach 2007; Legros et al. 1998; E. Diego-García et al. 2008). If we know better the structure-activity relationship of the  $\beta$ -KTx and scorpine-like peptides we can find a key piece in the fight of some global health problems like antibiotic resistance and parasite diseases. Additionally,  $\beta$ -KTx and scorpine-like peptides could act as pharmacological tool to characterize the action mechanisms of ion channels involved into a wide channelopathies variety which affect the world population (Schaenzer and Wright 2020; Israel et al. 2018; Conde, R., Zamudio, F. Z., Rodríguez, M. H., and Possani 2000).

The relevance of some amino acids with hydrophobic, positive, and negative characteristics in the interaction with the molecular targets has been highlighted for peptides belonging to different families of scorpine like-peptides and  $\beta$ -KTx (López-Giraldo et al. 2020; Brogden 2005; Epan and Vogel 1999; Friedrich, Moyles, and Beveridge 2000; Cohen et al. 2005; Canul-Tec et al. 2011; Riaño-Umbarila et al. 2019; Clairfeuille et al. 2019; Estrada et al. 2011; MacHado et al. 2018). However, the important features in the functional structures of scorpine like-peptides and  $\beta$ -KTx toxins remain unclear and few functional and structural studies have been reported. These structural studies include some N-terminal fragments structure of  $\beta$ -KTx toxins and the scorpine-like peptide Hge36 C-terminal domain structure (Shunyi Zhu et al. 2010; Flores et al. 2016; Gao et al. 2010). For this reason, scorpine like-peptides and  $\beta$ -KTx are some of the least structurally studied families. The purpose of this research is to study the biological function of the recombinant N-terminal (renamed as N-scorpine), C-terminal (renamed as C-scorpine) domains and the complete scorpine, as well as, to determine the N-scorpine and C-scorpine structures applying nuclear magnetic resonance.

In this work we use the model peptide of the scorpine-like peptides group, the scorpine, as the study molecule. Scorpine was recombinantly produced, structurally characterized and the cytolytic and neurotoxic properties evaluated. We report the scorpine N-terminal and C-terminal domains structures and the N-terminal and C-terminal domains effect over the Shaker and KCNQ1 potassium channels. Additionally, we compare the C-scorpine structure with Hge36 and HgeD structures reported for scorpine-like peptides family and the N-scorpine structure with other cytolytic peptides structures reported, in order to look for structural information of scorpine like-peptides action mechanism. Our findings mainly demonstrate a structural organization of the positively charged, hydrophilic residues and hydrophobic residues on the helical construction of N-scorpine similar to other cytolytic peptides.

## Material and Methods

### Cloning of N-scorpine, C-scorpine and scorpine

Synthetic codon optimized gen for expression in *Escherichia coli* was produced by GenScrip using the amino acid sequence UniProt code P56972 (Conde et al. 2001) (amino acids 1-85), N-terminal (amino acid 1-28) and C-terminal (amino acid 29-85). These sequences were cloned in the expression vector pET32a to produce fusion protein with thioredoxin, a 6-HisTag and a TEV site.

### Expression and purification of the recombinant proteins N-scorpine, C-scorpine and scorpine

*Escherichia coli* Rosetta was used to express the recombinant proteins. The transformed cells with the plasmids pET32a-N-scorpine, pET32a-C-scorpine and pET32a-scorpine were incubated in LB medium (Miller's modification) supplemented with ampicillin and chloramphenicol to 220 rpm and 37°C until an optic density of 0.7. Then, IPTG was used for the expression induction to a final concentration of 0.5 mM. The protein expression was conducted at 30 °C for 16 h. The bacterial pellets were collected and re-suspended on the lysis buffer (50 mM Tris, 300 mM NaCl a pH 8.0) and sonicated (20 pulses of 15 s ON with 60 W and 35 s OFF). Afterwards, the proteins were fractionated using immobilized metal affinity chromatography (IMAC; Hi-Trap chelating columns from GE-Healthcare, Waukesha, WI, USA). The buffer was exchanged by dialysis to 50 mM Tris, 300 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM DTT and 5% glycerol pH 8.0, conditions need for TEV digestion. Enzymatic digestion was done using 1.0 mg of TEV for each 100 mg of the fusion protein, the final protein concentration was 1.0 mg/mL. TEV digestion gives a glycine residue at the N terminal, being additional to the C-scorpine sequence. The free proteins were purified with a second step of IMAC purification, were prepared with solid-phase extraction, and finally purified by RP-HPLC using a Jupiter Proteo C12 column of Phenomenex (Pore size 90 °Å, particle size 4.0 µm and 4.6 x 250 mm). The purification was made with a linear gradient starting at 85% A (H<sub>2</sub>O + 0.05% TFA v/v) to 90% B (ACN + 0.05% TFA v/v) in 45 minutes. All peptides were obtained in a folded manner, as demonstrated by NMR studies.

#### Mass Spectrometry

Mass spectrometry MALDI-TOF was used to obtain the peptide molecular weight with the  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix on a Bruker Daltonics Microflex LT instrument.

#### NMR procedures

The lyophilized samples of N-scorpine and C-scorpine were dissolved in 3.0% v/v D<sub>2</sub>O (Cambridge Isotopes Laboratories, Tewksbury, MA, USA) deionized water to a final protein concentration of 5.0 mM. 50% deuterated TFE was added to the N-terminal sample. NMR experiments were acquired on a 700 MHz Daltonics (Bruker Biospin, Billerica, MA, USA) spectrometer with a 16.4 Tesla magnetic field at 298 K. We used a collection of 2D NMR homonuclear experiments for spin system identification and sequential assignment. The spectra recorded were two nuclear Overhauser effect spectra (NOESY)(States, Haberkorn, and Ruben 1982) with 150 and 250 ms mixing times, a TOCSY(Griesinger et al. 1988) with 80 ms isotropic mixing period (MLEV-17)(Levitt, Freeman, and Frenkiel 1982; Bax and Davis 1985), and a double-quantum filtered COSY (DQFCOSY)(Piantini, Sørensen, and Ernst 1982; Rance et al. 1983). Double pulsed-field gradient spin echoes (DPFGSE)(Hwang and Shaka 1995; Dalvit et al. 1991) was used for the water suppression. The proton assignment was carried out based on the standard method developed by Wüthrich(Kurt Wüthrich 1986). We used the 2D-TOCSY at 298 K traces to obtain the HN-H $\alpha$  coupling constants following the modified J-doubling method in the frequency domain (Delrioportilla, Blechta, and Freeman 1994; Garza-García, Ponzanelli-Velázquez, and del Río-Portilla F 2001).

#### Structural calculation

The distance constraints used for the structure calculation were obtained of the homonuclear 1H-1H NOESY spectrum with 150 ms mixing time. The NMR data were processed with NMRPipe software(Delaglio et al. 1995). The peak picking, spin system identification, and NOE derived distance constraint assignments were carried out with CARA 1.5 software (Keller 2004). CYANA 2.1 was used for the structural calculation (Downing and Güntert 2004) with chemical shift tolerance between 0.02 and 0.015 ppm. From 500 structures were selected the 20 protein models with the lowest energy values and without restraint violations. In order to refine and minimize the 20 models with the lowest energy values, we followed the protocol described (Gurrola et al. 2012) using molecular dynamic calculations with AMBER 9. Additionally, the refined structural model of the N-scorpine and C-scorpine peptides were validated and deposited in the Protein Data Bank (PDB ID 7M1E. and 7M1D respectively) and Biological Magnetic Resonance Bank (BMRB ID 30879 and 30878 respectively). Structures were analyzed and visualized with UCSF Chimera(Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC 2004) and Pymol("The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.," n.d.).

#### Cell culture and channel expression

DMEM media (Gibco) was used to grow HEK 293T cells, the media was supplemented with penicillin G (100 units/ml), 10% FBS, and streptomycin (0.1 mg/ml). Lipofectamine 2000 Invitrogen was used to transiently transfect the cells with KCNQ1 or Shaker-IR (N-terminal deletion  $\Delta$ 6–46 Shaker clone). Additionally, the cells were co-transfected at a microgram ratio of 1:0.5 with GFP. 24 h after transfection, the cell patch clamps were recorded using an Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices) at -80 mV hold potential, acquired at 10 kHz using pCLAMP10 software (Molecular Devices), and filtered online at 5 kHz. The patch clamps recordings were performed using fire-polished borosilicate glass (Sutter instruments) pipettes with 3 – 5 m $\Omega$  resistance, filled with internal solution: 140 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10

mM HEPES, and 1 mM EGTA (adjusted to pH 7.4 with KOH). The external solutions contained 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, and 10 mM HEPES (adjusted to pH 7.4 with NaOH).

## Results

### Production of recombinant peptides

Recombinant proteins including whole scorpine, N-domain and C-domain were successfully produced in *E. coli* using Rosetta strain. After metal affinity chromatography (IMAC) and reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC) the proteins were at high purity and in oxidized state as demonstrated by MALDI-TOF results (Figure S1 and table S1). C-scorpine contains a glycine residue at the N-terminal as result of TEV digestion.

### NMR assignments and structure calculations

The N-scorpine NMR sample conditions were selected considering that this domain presents a random coil structure in water and its turns to  $\alpha$ -helical in the presence of 50% trifluoroethanol, considered as a membrane-mimicking environment (Gao et al. 2009; Kozlov et al. 2006). C-scorpine and N-scorpine domain peptide spin systems were identified through bond connectivities observed mainly in TOCSY but also in COSY, whereas sequential assignments were obtained using the through space connectivities observed between neighboring residues in the NOESY spectra. The good signal dispersion of the 150 ms mixing time NOESY and 80 ms TOCSY spectra allowed identifying 47 of 48 spin systems for C-scorpine domain and 27 of 28 spin systems of amino acid residues for N-scorpine domain. C-scorpine and N-scorpine <sup>1</sup>H completeness assignments were 91% and 93% respectively when natural abundance samples were used. C-scorpine solution structure (Figure 1) was obtained from 1,328 NOEs with off diagonal assignment; 93 of them are long-range NOEs  $|i-j| \leq 5$ , 102 medium-range NOEs  $1 < |i-j| < 5$  and 1,133 short-range NOEs  $|i-j| \leq 1$  (Tab. S2) and 21 HN-H $\alpha$  coupling constants. N-scorpine solution structure (Fig. 1) was obtained from 1,249 NOEs with off diagonal assignment; 2 of them are long-range NOEs  $|i-j| \leq 5$ , 243 medium-range NOEs  $1 < |i-j| < 5$  and 1,004 short-range NOEs  $|i-j| \leq 1$  (Fig. S2), as well as 8 HN-H $\alpha$  coupling constants. Figure 1A shows the C-scorpine NMR solution structure with a cysteine-stabilized  $\alpha/\beta$  (CS $\alpha/\beta$ ) motif, a  $\alpha$ -helix (Asn21-Thr28), a double stranded antiparallel  $\beta$ -sheet (Lys32-Cys35 and Cys40-Gly43), two loops ( $\alpha 1$ - $\beta 1$  and  $\beta 1$ - $\beta 2$ ), three disulfide bonds (Cys12-Cys35, Cys22-Cys40 and Cys26-Cys42) and a long random coil region (Gly1-Gly20). Figure 1B shows the superposition of the 20 lowest energy structures. Figure 1C shows the N-scorpine NMR solution structure with a typical secondary alpha helix structure (Ile3-Thr19). Figure 1D shows the superposition of the 20 lowest energy structures. The final average backbone RMSD to mean for C-scorpine (calculated from 22 aa to 45 aa) and N-scorpine (calculated from 3 aa to 26 aa) was 0.52 and 0.58 and considering the heavy atoms RMSD to mean was 0.83 and 0.95 respectively. C-scorpine and N-scorpine HN-H $\alpha$  coupling constants and proton chemical shifts are deposited in the Biological Magnetic Resonance Bank (BMRB: 30879 and 30878 for N-scorpine and C-scorpine respectively). A summary of the experimental constraints and structure calculation statistics is shown in Tab. S2.

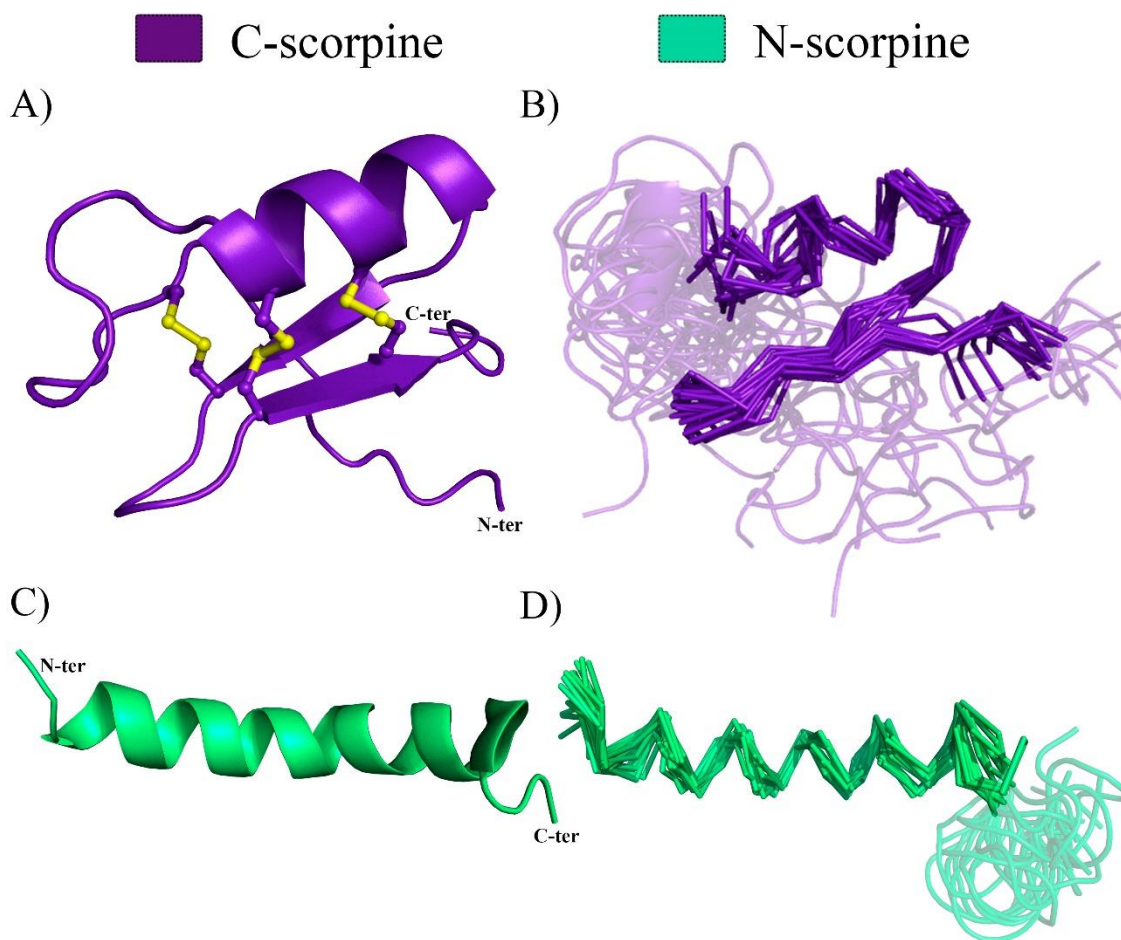


Figure 1. A) Lowest energy NMR structure of C-scorpine. The disulfides are painted in yellow. B) Backbone superposition of the 20 lowest energy structures of C-scorpine, the unfolded region (Gly1- Gly20) is shown with transparency. C) NMR solution structure of N-scorpine with the lowest energy. D) Backbone superposition of the 20 lowest energy structures of extreme N-scorpine.

We ran two different C-scorpine structure calculations to confirm the disulfide bonds: the first one, without S-S bond constraint; and the second one with S-S bonds constraint (Cys12-Cys35, Cys22-Cys40 and Cys26-Cys42) relative to the primary structure. The two calculations showed remarkably similar structures, see Fig. S2. The S-S bonds restrictions used for the second calculation were observed by NMR. Indeed, NOE's were clearly observed between H $\beta$ i-H $\beta$ j and H $\alpha$ i-H $\beta$ j of the cysteines present in disulfide between Cys12-Cys35 and Cys26-Cys642, while only NOE's H $\alpha$ i-H $\beta$ j were observed between (Cys22-Cys40) because of signal overlapping on H $\beta$ i-H $\beta$ j regions near of the diagonal (Fig. S3). We can observe there is not overlap on the region which could hinder the interpretation.

#### Comparison of N-scorpine with other $\alpha$ -helical peptides

We carried out structural analysis of N-scorpine with other reported structures of  $\alpha$ -helical peptides. Figure S5 shows the sequence alignment of N-scorpine with meucin-24(Gao et al. 2010) (*Mesobuthus eupeus*) and magainin 2(Gao et al. 2010), both antimalarial peptides. Despite there is a low similarity between the primary structures of N-scorpine, meucin 24 and magainin 2, they share the same helical structure when is added TFE (Fig. S4).

#### Comparison of C-scorpine with Hge36 peptide

C-scorpine shares 61.7% sequence identity with Hge36, an antiparasitic and potassium channel-blocking scorpine-like peptide(E. Diego-García et al. 2008; Flores et al. 2016). They have conserved disulfide bridges with the six cysteine residues located at positions homologous, see Fig. 2A. The 3D structures of the scorpine-like peptides show similar folds with two

loops and the same structural motif CS $\alpha$ / $\beta$  (Fig. 2B). The major structural difference between C-scorpine and Hge36 was the relative orientation of the N-terminal region.

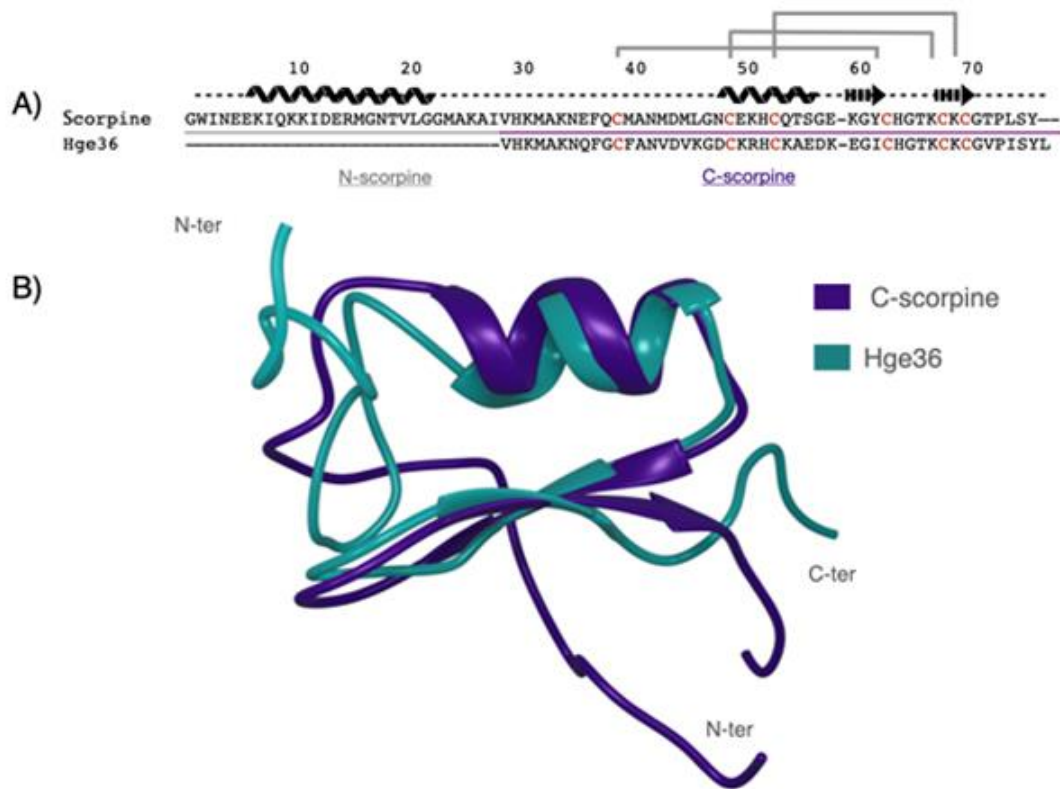


Figure 2. Structure comparison. A) Sequence alignment of scorpine and Hge36 B) Structure comparisons between C-scorpine (violet) and Hge36 (green), where it can be observed that these toxins have similar secondary and tertiary structure.

#### Electrophysiological experiments

Scorpine, N-scorpine and C-scorpine showed cytolytic activity in most of the recordings, on the HEK293T cells; it induces disruption of the cell membrane, leak currents and cell death, at a concentration of 25  $\mu$ M (Fig. 3A). However, in those recordings that were achieved on Shaker and KCNQ1 channels, the inhibition was only visible with C-scorpine, at a concentration of 18  $\mu$ M, blocked the Shaker and KCNQ1 currents in 36 and 20%, respectively (Fig. 3D).

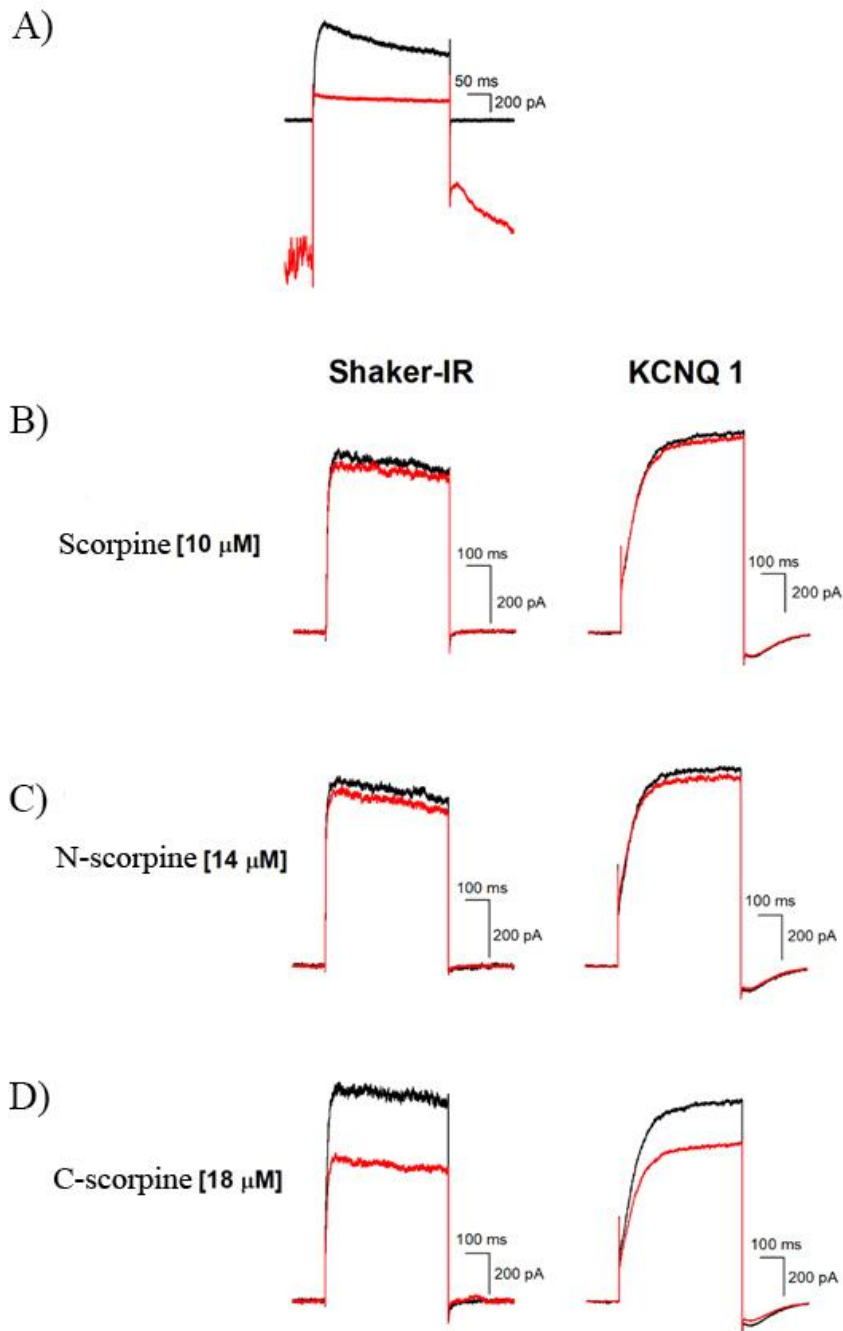


Figure 3. A) Cytolytic activity on the HEK293T cells. Representative traces showing the effect of C-scorpine at 25  $\mu\text{M}$ , inducing disruption of the cell membrane, leak currents and cell death. The black trace is a control on the Shaker current, at 20 mV, while the red trace is in the presence of C-Scorpine toxin. Toxins effects on the Shaker and KCNQ1 channels. Current inhibition by B) scorpine. C) N-scorpine and D) C-scorpine. The black traces are control, at 20 mV, while the red traces are in the presence of toxins.

#### Discussion



Full scorpine as well as the N and C terminal domains were successfully expressed in *E. coli* and purified a high purity (Fig. 1S). The thioredoxin helped to keep the peptides soluble as well as worked like mediator in the redox process to the formation of the correct disulfide bonds given the oxidized state of the produced proteins.

One of the most important characteristics of  $\beta$ -KTx, and especially of scorpion-like peptides, is the presence of two structural domains, an unstructured N-terminal capable of forming a helix when interacting with the membrane and the characteristic alpha-over-beta domain stabilized by cysteines apparently responsible for blocking potassium channels (Feng et al. 2013; E. Diego-García et al. 2008). Many works have mentioned that the cytolytic activity observed in most of the scorpion-like peptides is given by the N-terminal (E. Diego-García et al. 2008), with the electrophysiological tests carried out here, the cytolytic effect of scorpine is remarkable and it is observed an activity reduction by removing the amino terminal, thus reaffirming the effect that this domain represent on the scorpine.

N-scorpine does not show a clear typical helical amphipathic design (Fig. 4A-B), a unique structural arrangement, in which it is possible to observe two discrete domains, one of positively charged and hydrophilic residues; and the second with hydrophobic residues (Zaslhoff 2019). This fact has been reported as a structural behavior for cytolytic activity (Gao et al. 2009) and has been reported for some linear cationic antimalarial peptides, between them, meucic-24, meucic-25 (Gao et al. 2010), meucic-3, meucic-18 (Gao et al. 2009) *Mesobuthus eupeus*, magainin 2 (Gao et al. 2010), among others (Fig. S4-S5). Meucic-3 and meucic-18 also present cytolytic activity as N-scorpine. However, these results suggest that the balance hydrophobic/hydrophilic feature found in N-scorpine could be enough to find the cytolytic activity (Fig. 4A-B). Additionally, it has been reported that an hydrophobicity region present on some peptides is a characteristic closely correlated with the loss of the cytolytic activity (Dathe and Wieprecht 1999); we can see that N-scorpine present the opposite feature (Fig. 4B), excessive hydrophilic surface, which can increase the potential to interact with the negative membranes. In addition, we noticed that N-scorpine has three structurally (Lys7) (Lys10) (Lys11) adjacent cationic residues, similar fact observed for meucic-18 (Gao et al. 2009). These exposed residues to the molecular surface could be involved in the interaction with cell membranes with negative charge (Fig. 4C).

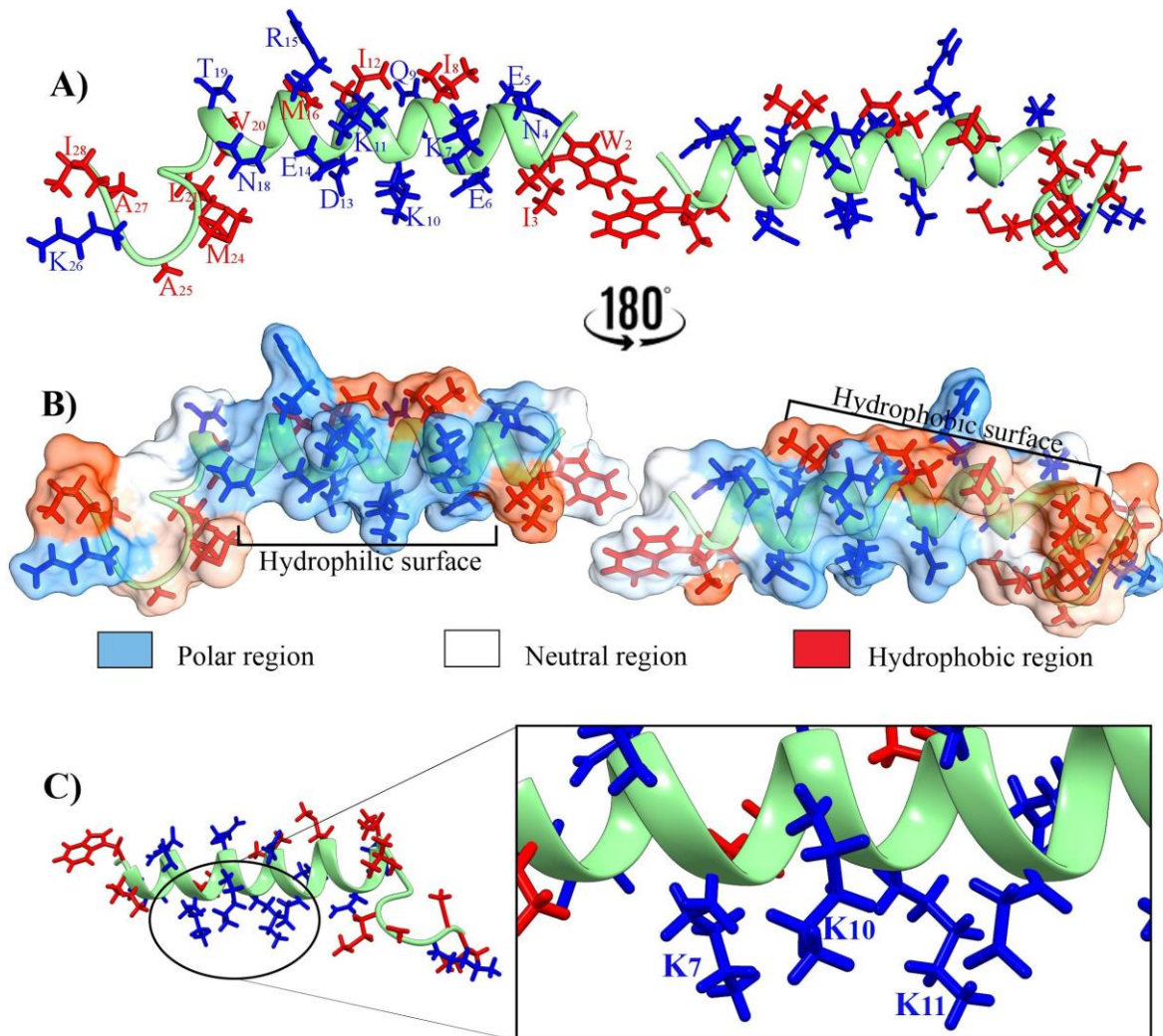


Figure 4. N-terminal structure of scorpine. A) Ribbon diagram of the minimized lowest energy structure of N-scorpine. Red, hydrophobic residues; blue, hydrophilic residues. B) The hydrophobic surface of N-scorpine. The surfaces were colored according to a scale of three colors where blue indicates a polar region, white a neutral region and orange a hydrophobic region. C) Amplification of the zone with the exposed lysines.

Amphipathic helical nature of meucin-24 and magainin-2 is observed due to hydrophobic residues tend to face upward (FACE A), while charged and polar residues face downward (FACE B); however, for N-scorpine the helical amphipathic design is not clear (Fig. S5A- F). N-scorpine hydrophobicity surface shows that residues Asn4, Lys7, Lys10, Lys11 and Arg15 form a hydrophilic path, whereas the other residues Ile12, Met16, Val20, Leu21, Met24 and Ala25 constitute another large hydrophobic path. The similar paths are observed for meucin-24 and magainin 2. This suggest the most important feature for the cytolytic activity of cationic peptides is the organization of positively charged, hydrophilic residues and hydrophobic residues on the helical construction, showing N-scorpine is not considered a cationic peptide. Some differences found in activity and potency could be understood for the hydrophilic/hydrophobic balance and cationic amino acid location. It is necessary to perform more experiments to allow us to evaluate structural factors important for their activities.

C-scorpine 3D structure reported here shares the same structural motif  $CS\alpha/\beta$  with Hge36 (Fig.2). The 3D structures differ particularly at the amino terminal domain because there is a long unfold region present on C-scorpine. This fact was observed by NMR because there was a few NOE's on the spectrum corresponding to the amino acids present at the C-scorpine amino terminal domain which could imply a not well-defined region. The opposite was reported for Hge36(Flores-Solis et al. 2016) where it was reported that the amino terminal region poses more NOE's than the carboxyl terminal,

producing an N-terminal that is better defined. Furthermore, C-scorpine and Hge36 are the only 3D structures reported for the subfamily 3 of  $\beta$ -KTx group.

We calculated the hydrophobic (Fig. S6) and the coulombic (Fig. S7) surfaces of C-scorpine and Hge36 of Hoffmannhadhrurus gertschi (E. Diego-García et al. 2008), to compare and try to find structural features that could be relevant for the toxin function. The hydrophobic surface of C-scorpine (Fig. S6A) shows two main hydrophobic patches. The smallest is formed by amino acids V1 and L45; however, this patch is not conserved on the two peptides. Additionally, there is a second patch on the N-terminal region (amino acids Met15, Met17, Leu18, Ala13, Met12 and Phe9), which is conserved at different position in the two peptides.

A few structural studies have been made for scorpine like-peptides. We compared the coulombic surface of C-scorpine with the Hge36 structure (Fig. S7), but we couldn't find any remarkable facts on the charge distribution for C-scorpine and Hge36 peptides. The loss of the scorpine N-terminal domain reveals a weak block activity over ionic channels shaker and KCNQ1. Consequently, C-scorpine joins a small group of active molecules over KCNQ1 channels, where it is worth mentioning that KCNQ1 channels are considered as potential therapeutic targets (Seebohm et al. 2003) firstly because they play an important role in process like mediate repolarization of cardiac action potential as well as controlling the water and salt homeostasis in several epithelial tissues (Hu et al. 2015; Heitzmann et al. 2007; Peroz et al. 2008).

#### Concluding remarks

C-scorpine showed a tightly folded C-terminal domain with a cysteine-stabilized  $\alpha/\beta$  (CS- $\alpha\beta$ ) motif. We found that C-scorpine and Hge36 toxins share a hydrophobic path formed by the amino acids 15, 17, 13 and 12. Additionally, N-scorpine presents an essential random coil conformation in water, but the  $\alpha$ -helical content largely increases in the presence of 50% TFE. Consequently, NMR structure of N-scorpine showed an  $\alpha$ -helical architecture with a small amphipathic region which is a structural prerequisite (Gao et al. 2009) for cytolytic activity as well as three structurally exposed cationic residues that could interact with the negatively charged cell membranes. Our findings reveal two different activities in the scorpine study: the first one, present in N-scorpine, C-scorpine and scorpine, with cytolytic activity and the second one, present in C-scorpine with channel blocking activity. Our results suggest that the scorpine activity over ionic channels is masked by the cytolytic activity. These results provide important structural information for the design of more potent KCNQ1 channel blockers and serve as the basis for the understanding of structure and functional relationships of these channels.

#### Conflict of Interest

*The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.*

#### Author Contributions

ELG wrote the paper, performed molecular biology experiments, analyzed the NMR data and determined the NMR protein structures; GTD wrote the paper and analyzed the NMR data; PCS wrote the paper and performed molecular biology experiments; AC produced, purified and analyzed the NMR data; EC wrote the paper and performed the electrophysiological studies, LPP conceptualized the project and wrote the paper and FRP conceptualized the project, wrote paper, designed experiments and acquired NMR data.

#### Funding

Details of all funding sources should be provided, including grant numbers if applicable. Please ensure to add all necessary funding information, as after publication this is no longer possible.

#### Acknowledgments

AEL-G and GT-D acknowledges to the national council of science and technology (CONACyT) for the scholarships number 273490 and 766250, respectively. EC was supported by a fellowship from Programa de Becas Posdoctorales, Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA). This work was partially supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico with grants DGAPA-PAPIIT number IN210319 (FRP) and Departamento de Supercómputo, Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de la Información y Comunicación [Project LANCAD-UNAM-DGTIC-145]. This study was made possible in part thanks to the UNAM's NMR lab: LURMN at IQ-UNAM which is funded by CONACyT (Project 0224747).

#### References

Alagón, A C, H S Guzmán, B M Martin, A N Ramírez, E Carbone, and L D Possani. 1988. "Isolation and

- Characterization of Two Toxins from the Mexican Scorpion *Centruroides Limpidus Limpidus* Karsch.” *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry* 89 (1): 153–61. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(88\)90277-5](https://doi.org/10.1016/0305-0491(88)90277-5).
- Andreotti, N., Di Luccio, E., Sampieri, F., De Waard, M. S., and Sabatier, J. M. 2005. “Molecular Modeling and Docking Simulations of Scorpion Toxins and Related Analogs on Human SKCa2 and SKCa3 Channels.” *Peptides* 26: 1095–1108. [10.1016/j.peptides.2005.01.022](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.01.022).
- Batista, C. V. F., Román-González, S. A., Salas-Castillo, S. P., Zamudio, F. Z., Gómez-Lagunas, F., and Possani, L. D. 2007. “Proteomic Analysis of the Venom from the Scorpion *Tityus Stigmurus* : Biochemical and Physiological Comparison with Other *Tityus* Species.” *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 146: 147–57. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.12.004>.
- Bax, Ad, and Donald G. Davis. 1985. “MLEV-17-Based Two-Dimensional Homonuclear Magnetization Transfer Spectroscopy.” *J. Magn. Reson.* 65 (2): 355–60. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(85\)90018-6](https://doi.org/10.1016/0022-2364(85)90018-6).
- Bitar, Alaa M H El, Moustafa Sarhan, Mohamed A Abdel, Rahman Veronica, Quintero Hernandez, Chie Aoki, Utsubo Mohsen, A Moustafa Lourival, and D Possani Hak. 2020. “Smp76 , a Scorpine - Like Peptide Isolated from the Venom of the Scorpion *Scorpio Maurus Palmatus* , with a Potent Antiviral Activity Against Hepatitis C Virus and Dengue Virus.” *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 26 (2): 811–21. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09888-2>.
- Bolcun-Filas, E., L. A. Bannister, A. Barash, K. J. Schimenti, S. A. Hartford, J. J. Eppig, M. A. Handel, L. Shen, and J. C. Schimenti. 2011. “A-MYB (MYBL1) Transcription Factor Is a Master Regulator of Male Meiosis.” *Journal of Cell Science* 124 (15): e1–e1. <https://doi.org/10.1242/jcs096685>.
- Brogden, Kim A. 2005. “Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria?” 3 (MARCH): 238–50. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>.
- Canul-Tec, Juan Carlos, Lidia Riaño-Umbarila, Enrique Rudiño-Piñera, Baltazar Becerril, Lourival D. Possani, and Alfredo Torres-Larios. 2011. “Structural Basis of Neutralization of the Major Toxic Component from the Scorpion *Centruroides Noxius Hoffmann* by a Human-Derived Single-Chain Antibody Fragment.” *Journal of Biological Chemistry* 286 (23): 20892–900. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.238410>.
- Cao, Zhijian, Fan Xiao, Fang Peng, Dahe Jiang, Xin Mao, Hui Liu, Wenxin Li, Dan Hu, and Teng Wang. 2003. “Expression, Purification and Functional Characterization of a Recombinant Scorpion Venom Peptide BmTXKβeta.” *Peptides* 24 (2): 187–92. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(03\)00025-1](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(03)00025-1).
- Chen, Zongyun, Fan Luo, Jing Feng, Weishan Yang, Danyun Zeng, Ruiming Zhao, Zhijian Cao, et al. 2013. “Genomic and Structural Characterization of Kunitz-Type Peptide LmKTT-1a Highlights Diversity and Evolution of Scorpion Potassium Channel Toxins.” *PLoS ONE* 8 (4): 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060201>.
- Chippaux, J. P., and M. Goyffon. 2008. “Epidemiology of Scorpionism: A Global Appraisal.” *Acta Tropica* 107 (2): 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.05.021>.
- Cid-Urbe, Jimena I., Erika P. Meneses, Cesar V.F. Batista, Ernesto Ortiz, and Lourival D. Possani. 2019. “Dissecting Toxicity: The Venom Gland Transcriptome and the Venom Proteome of the Highly Venomous Scorpion *Centruroides Limpidus* (Karsch, 1879).” *Toxins* 11 (5). <https://doi.org/10.3390/toxins11050247>.
- Cid-Urbe, Jimena I., José Ignacio Veytia-Bucheli, Teresa Romero-Gutierrez, Ernesto Ortiz, and Lourival D Possani. 2020. “Scorpion Venomics: A 2019 Overview.” *Expert Review of Proteomics* 17 (1): 67–83. <https://doi.org/10.1080/14789450.2020.1705158>.
- Clairfeuille, Thomas, Alexander Cloake, Daniel T. Infield, José P. Llongueras, Christopher P. Arthur, Zhong Rong Li, Yuwen Jian, et al. 2019. “Structural Basis of α-Scorpion Toxin Action on Nav Channels.” *Science* 363 (6433): 1–25. <https://doi.org/10.1126/science.aav8573>.
- Cohen, Lior, Izhar Karbat, Nicolas Gilles, Nitza Ilan, Morris Benveniste, Dalia Gordon, and Michael Gurevitz. 2005. “Common Features in the Functional Surface of Scorpion β-Toxins and Elements That Confer Specificity for Insect and Mammalian Voltage-Gated Sodium Channels.” *Journal of Biological Chemistry* 280 (6): 5045–53. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408427200>.
- Conde, R., Zamudio, F. Z., Rodríguez, M. H., and Possani, L. D. 2000. “Scorpine, an Anti-Malaria and Anti-Bacterial Agent Purified from Scorpion Venom.” *FEBS Letters* 471 (2000): 165–68. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01384-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01384-3).

- Conde, Renaud, Fernando Z Zamudio, Mario H Rodríguez, and Lourival D. Possani. 2001. "Scorpine , an Anti-Malaria and Anti-Bacterial Agent Purified from Scorpion Venom." *FEBS Letters* 471 (2000): 165–68.
- Dalvit, C, G Shapiro, JM Bohlen, and T Parella. 1991. "Technical Aspects of an Efficient Multiple Solvent Suppression Pulse Sequence." *MAGNETIC RESONANCE IN CHEMISTRY* 37 (1): 7–14.
- Dathe, Margitta, and Torsten Wieprecht. 1999. "Structural Features of Helical Antimicrobial Peptides: Their Potential to Modulate Activity on Model Membranes and Biological Cells." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1462 (1–2): 71–87. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00201-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00201-1).
- Dehesa-Dávila, Manuel, Angelina N. Ramírez, Fernando Z. Zamudio, Georgina Gurrola-Briones, Arturo Liévano, Alberto Darszon, and Lourival D. Possani. 1996. "Structural and Functional Comparison of Toxins from the Venom of the Scorpions *Centruroides Infamatus Infamatus*, *Centruroides Limpidus Limpidus* and *Centruroides Noxius*." *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* 113 (2): 331–39. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(95\)02031-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(95)02031-4).
- Delaglio, Frank, Stephan Grzesiek, Geerten W. Vuister, Guang Zhu, John Pfeifer, and Ad Bax. 1995. "NMRPipe: A Multidimensional Spectral Processing System Based on UNIX Pipes." *Journal of Biomolecular NMR* 6 (3): 277–93. <https://doi.org/10.1007/BF00197809>.
- Delrioportilla, F., V. Blechta, and R. Freeman. 1994. "Measurement of Poorly Resolved Splittings by J Doubling in the Frequency Domain." *Journal of Magnetic Resonance, Series A*. <https://doi.org/10.1006/jmra.1994.1238>.
- Diego-García, E., Y. Abdel-Mottaleb, E. F. Schwartz, R. C. Rodríguez De La Vega, J. Tytgat, and L. D. Possani. 2008. "Cytolytic and K<sup>+</sup> Channel Blocking Activities of  $\beta$ -KTx and Scorpine-like Peptides Purified from Scorpion Venoms." *Cellular and Molecular Life Sciences* 65 (1): 187–200. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7370-x>.
- Diego-García, Elia, Cesar V.F. Batista, Blanca I. García-Gómez, Sylvia Lucas, Denise M. Candido, Froylan Gómez-Lagunas, and Lourival D. Possani. 2005. "The Brazilian Scorpion *Tityus Costatus* Karsch: Genes, Peptides and Function." *Toxicon* 45 (3): 273–83. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.10.014>.
- Diego-García, Elia, Elisabeth F. Schwartz, Gina D'Suze, Sergio A. Román González, Cesar V.F. Batista, Blanca I. García, Ricardo C. Rodríguez de la Vega, and Lourival D. Possani. 2007. "Wide Phylogenetic Distribution of Scorpine and Long-Chain  $\beta$ -KTx-like Peptides in Scorpion Venoms: Identification of 'Orphan' Components." *Peptides* 28 (1): 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.06.012>.
- Downing, A. Kristina, and Peter Güntert. 2004. "Automated NMR Structure Calculation With CYANA." *Protein NMR Techniques* 278: 353–78. <https://doi.org/10.1385/1-59259-809-9:353>.
- Drane, Stephen B., Samuel D. Robinson, Christopher A. MacRaild, Sandeep Chhabra, Balasubramanyam Chittoor, Rodrigo A.V. Morales, Eleanor W.W. Leung, et al. 2017. "Structure and Activity of Contryphan-Vc2: Importance of the D-Amino Acid Residue." *Toxicon* 129: 113–22. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.02.012>.
- Epanand, Richard M, and Hans J Vogel. 1999. "Diversity of Antimicrobial Peptides and Their Mechanisms of Action" 1462.
- Estrada, Georgina, Rita Restano-Cassulini, Ernesto Ortiz, Lourival D. Possani, and Gerardo Corzo. 2011. "Addition of Positive Charges at the C-Terminal Peptide Region of CsxII, a Mammalian Scorpion Peptide Toxin, Improves Its Affinity for Sodium Channels Nav1.6." *Peptides* 32 (1): 75–79. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.11.001>.
- Facchinetti, V., R. Lopa, F. Spreafico, F. Bolognese, R. Mantovani, F. Tavner, R. Watson, M. Introna, and J. Golay. 2000. "Isolation and Characterization of the Human A-Myb Promoter: Regulation by NF-Y and Sp1." *Oncogene* 19 (34): 3931–40. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203730>.
- Facchinetti, Valeria, Livio Loffarelli, Sabine Schreck, Michael Oelgeschla, and Bernhard Lu. 1997. "With the CBP / P300 Adaptor Molecules" 736: 729–36.
- Feng, Jing, Congya Yu, Mingyu Wang, Zhi Li, Yingliang Wu, Zhijian Cao, Wenxin Li, Xiaohua He, and Song Han. 2013. "Expression and Characterization of a Novel Scorpine-like Peptide Ev37 , from the Scorpion *Euscorpions Validus*." *Protein Expression and Purification* 88 (1): 127–33. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.12.004>.
- Flores-Solis, David, Yanis Toledano, Oscar Rodríguez-Lima, Patricia Cano-Sánchez, Belen Ernestina Ramírez-Cordero, Abraham Landa, Ricardo C. Rodríguez de la Vega, and Federico del Rio-Portilla. 2016. "Solution Structure and Antiparasitic Activity of Scorpine-like Peptides from *Hoffmannihadrurus Gertschi*." *FEBS Letters* 590: 2286–96. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12255>.

- Flores, David, Abraham Landa, Ricardo C Rodr, and Federico Rio-portilla. 2016. "Solution Structure and Antiparasitic Activity of Scorpine- like Peptides from Hoffmannihadrurus Gertschi" 590: 2286–96. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12255>.
- Friedrich, Carol L, Dianne Moyles, and Terry J Beveridge. 2000. "Antibacterial Action of Structurally Diverse Cationic Peptides on Gram-Positive Bacteria" 44 (8): 2086–92.
- Fung, Siau Min, Gary Ramsay, and Alisa L. Katzen. 2003. "MYB and CBP: Physiological Relevance of a Biochemical Interaction." *Mechanisms of Development* 120 (6): 711–20. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(03\)00044-3](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(03)00044-3).
- Gan ZR, Gould RJ, Jacobs JW, Friedman PA, Polokoff MA. Echistatin. 1988. "A Potent Platelet Aggregation Inhibitor from the Venom of the Viper, Echis Carinatus." *Biol Chem.* 263: 19827–19832.
- Gao, Bin, Patrick Sherman, Lan Luo, John Bowie, and Shunyi Zhu. 2009. "Structural and Functional Characterization of Two Genetically Related Meucin Peptides Highlights Evolutionary Divergence and Convergence in Antimicrobial Peptides." *The FASEB Journal* 23 (4): 1230–45. <https://doi.org/10.1096/fj.08-122317>.
- Gao, Bin, Jia Xu, Carmen Rodriguez, Humberto Lanz-mendoza, Rosaura Hernández-rivas, Weihong Du, and Shunyi Zhu. 2010. "Biochimie Characterization of Two Linear Cationic Antimalarial Peptides in the Scorpion Mesobuthus Eupeus" 92: 350–59. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.01.011>.
- García-Hernández, Solimary, and Glauco Machado. 2020. "'Tail' Autotomy and Consequent Stinger Loss Decrease Predation Success in Scorpions." *Animal Behaviour* 169: 157–67. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2020.08.019>.
- Garza-García, a, G Ponzanelli-Velázquez, and del Río-Portilla F. 2001. "Deconvolution and Measurement of Spin-Spin Splittings by Modified J Doubling in the Frequency Domain." *Journal of Magnetic Resonance (San Diego, Calif. : 1997)* 148 (1): 214–19. <https://doi.org/10.1006/jmre.2000.2235>.
- Golay, J, M Luppi, S Songia, C Palvarini, L Lombardi, A Aiello, D Delia, et al. 1996. "Expression of A-Myb, but Not c-Myb and B-Myb, Is Restricted to Burkitt's Lymphoma, SIg+ B-Acute Lymphoblastic Leukemia, and a Subset of Chronic Lymphocytic Leukemias." *Blood* 87 (5): 1900–1911.
- González-Santillán, Edmundo, and Lourival D Possani. 2018. "North American Scorpion Species of Public Health Importance with a Reappraisal of Historical Epidemiology." *Acta Tropica* 187 (November): 264–74. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.08.002>.
- Gopalakrishnakone, P, Lourdes J Cruz, and Sulan Luo. n.d. *Toxins And*. Vol. I.
- Griesinger, C., G. Otting, K. Wüthrich, and R. R. Ernst. 1988. "Clean Tocsy for 1H Spin System Identification in Macromolecules." *Journal of the American Chemical Society* 110 (23): 7870–72. <https://doi.org/10.1021/ja00231a044>.
- Gulsevin, Alican, and Jens Meiler. 2020a. "An Investigation of Three-Finger Toxin-Nachr Interactions through Rosetta Protein Docking." *Toxins* 12 (9). <https://doi.org/10.3390/toxins12090598>.
- . 2020b. "An Investigation of Three-Finger Toxin-Nachr Interactions through Rosetta Protein Docking." *Toxins* 12 (9): 1–6. <https://doi.org/10.3390/toxins12090598>.
- Guo, Huabei, Bing Zhang, Alison V. Nairn, Tamas Nagy, Kelley W. Moremen, Phillip Buckhaults, and Michael Pierce. 2017. "O-Linked N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) Expression Levels Epigenetically Regulate Colon Cancer Tumorigenesis by Affecting the Cancer Stem Cell Compartment via Modulating Expression of Transcriptional Factor MYBL1." *Journal of Biological Chemistry* 292 (10): 4123–37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.763201>.
- Gurrola, Georgina B., Rogelio A. Hernández-López, Ricardo C. Rodríguez De La Vega, Zoltan Varga, Cesar V F Batista, Saida P. Salas-Castillo, Gyorgy Panyi, Federico Del Río-Portilla, and Lourival D. Possani. 2012. "Structure, Function, and Chemical Synthesis of Vaejovis Mexicanus Peptide 24: A Novel Potent Blocker of Kv1.3 Potassium Channels of Human T Lymphocytes." *Biochemistry* 51 (19): 4049–61.
- Heitzmann, Dirk, Viktoria Koren, Michael Wagner, Christina Sterner, Markus Reichold, Ines Tegtmeier, Tilmann Volk, and Richard Warth. 2007. "KCNE Beta Subunits Determine PH Sensitivity of KCNQ1 Potassium Channels." *Cellular Physiology and Biochemistry* 19 (1–4): 21–32. <https://doi.org/10.1159/000099189>.
- Hu, Youtian, Jing Chen, Bin Wang, Weishan Yang, Chuangeng Zhang, Jun Hu, Zili Xie, et al. 2015. "Engineering a Peptide Inhibitor towards the KCNQ1/KCNE1 Potassium Channel (IKs)." *Peptides* 71: 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.07.002>.

- Hwang, T. L., and A. J. Shaka. 1995. "Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients." *Journal of Magnetic Resonance - Series A* 112 (2): 275–79. <https://doi.org/10.1006/jmra.1995.1047>.
- Incamnoi, Paroonkorn, Rina Patramanon, Sompong Klaynongsruang, Arunrat Chaveerach, Wandee Bunyatrachata, Nunthawun Uawonggul, Sophida Sukprasert, et al. 2018. "Sequence Analysis and 3-Dimensional Molecular Modelling of Heteroscorpine from the Venom of *Heterometrus* Spp." *Maejo International Journal of Science and Technology* 12 (3): 187–98.
- Israel, Mathilde R, Michael Morgan, Bryan Tay, and Jennifer R Deuis. 2018. "Neuroscience Letters Toxins as Tools : Fingerprinting Neuronal Pharmacology," no. February. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.02.001>.
- IZHAR, KARBAT, COHEN LIOR, GILLES NICOLAS, GORDON DALIA, and GUREVITZ MICHAEL. 2004. "Conversion of a Scorpion Toxin Agonist into an Antagonist Highlights an Acidic Residue Involved in Voltage Sensor Trapping during Activation of Neuronal Na<sup>+</sup> Channels." *The FASEB Journal* 18 (6): 683–89. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0733com>.
- Jeon, Gye Sun, Hee Jine Byun, Sung Kyung Park, Sang Wook Park, Dong Woon Kim, Je Hoon Seo, Choong Ik Cha, and Sa Sun Cho. 2006. "Induction of Transcription Factor A-Myb Expression in Reactive Astrocytes Following an Excitotoxic Lesion in the Mouse Hippocampus." *Neurochemical Research* 31 (11): 1371–74. <https://doi.org/10.1007/s11064-006-9184-x>.
- Juichi, Hironori, Ryo Ando, Takafumi Ishido, Masahiro Miyashita, Yoshiaki Nakagawa, and Hisashi Miyagawa. 2018. "Chemical Synthesis of a Two-Domain Scorpion Toxin LaIT2 and Its Single-Domain Analogs to Elucidate Structural Factors Important for Insecticidal and Antimicrobial Activities." *Journal of Peptide Science* 24 (12). <https://doi.org/10.1002/psc.3133>.
- Juichi, Hironori, Masahiro Miyashita, Yoshiaki Nakagawa, and Hisashi Miyagawa. 2019. "Isolation and Characterization of the Insecticidal , Two-Domain Toxin LaIT3 from the *Liocheles Australasiae* Scorpion Venom." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 83 (12): 2183–89. <https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1654849>.
- Keaveney, Arthur, and A. Mayor. 2004. "Greek Fire, Poison Arrows & Scorpion Bombs: Biological and Chemical Warfare in the Ancient World." *Classics Ireland* 11 (4): 110. <https://doi.org/10.2307/25528407>.
- Keller, R. 2004. *The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial*. Goldau, Switzerland: Cantina Verlag.
- King, Glenn F. 2011. "Venoms as a Platform for Human Drugs: Translating Toxins into Therapeutics." *Expert Opinion on Biological Therapy* 11 (11): 1469–84. <https://doi.org/10.1517/14712598.2011.621940>.
- Kozlov, Sergey A., Alexander A. Vassilevski, Alexei V. Feofanov, Andrey Y. Surovov, Dmitry V. Karpunin, and Eugene V. Grishin. 2006. "Latarcins, Antimicrobial and Cytolytic Peptides from the Venom of the Spider *Lachesana Tarbaevi* (Zodariidae) That Exemplify Biomolecular Diversity." *Journal of Biological Chemistry* 281 (30): 20983–92. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602168200>.
- la Rosa, Guillermo de, Ligia L. Corrales-García, Ximena Rodriguez-Ruiz, Estuardo López-Vera, and Gerardo Corzo. 2018. "Short-Chain Consensus Alpha-Neurotoxin: A Synthetic 60-Mer Peptide with Generic Traits and Enhanced Immunogenic Properties." *Amino Acids* 50 (7): 885–95. <https://doi.org/10.1007/s00726-018-2556-0>.
- Lebreton, F., M. Delepierre, A. N. Ramírez, C. Balderas, and L. D. Possani. 1994. "Primary and NMR Three-Dimensional Structure Determination of a Novel Crustacean Toxin from the Venom of the Scorpion *Centruroides Limpidus Limpidus* Karsch." *Biochemistry* 33 (37): 11135–49. <https://doi.org/10.1021/bi00203a010>.
- Lee, Woonghee, Marco Tonelli, and John L. Markley. 2015. "NMRFAM-SPARKY: Enhanced Software for Biomolecular NMR Spectroscopy." *Bioinformatics* 31 (8): 1325–27. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu830>.
- Legros, Christian, Brigitte Céard, Pierre E. Bougis, and Marie France Martin-Eauclaire. 1998. "Evidence for a New Class of Scorpion Toxin Active against K<sup>+</sup> Channels." *FEBS Letters* 431 (3): 375–80. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00780-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00780-7).
- Leonard, Paul, Stephen Hearty, and Richard O’Kennedy. 2011. "Measuring Protein--Protein Interactions Using Biacore." In *Protein Chromatography: Methods and Protocols*, edited by Dermot Walls and Sinéad T Loughran, 403–18. Totowa, NJ: Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0\\_22](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0_22).
- Levitt, Malcolm H., Ray Freeman, and Thomas Frenkiel. 1982. "Broadband Heteronuclear Decoupling." *Journal of Magnetic Resonance (1969)* 47 (2): 328–30. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(82\)90124-X](https://doi.org/10.1016/0022-2364(82)90124-X).

- Lian, Ling, Xin Li, Chunfang Zhao, Bo Han, Lujiang Qu, Jiuzhou Song, Changjun Liu, and Ning Yang. 2015. "Chicken Gga-MiR-181a Targets MYBL1 and Shows an Inhibitory Effect on Proliferation of Marek's Disease Virus-Transformed Lymphoid Cell Line." *Poultry Science* 94 (11): 2616–21. <https://doi.org/10.3382/ps/pev289>.
- López-Giraldo, Andrea Estefanía, Timoteo Olamendi-Portugal, Lidia Riaño-Umbarila, Baltazar Becerril, Lourival D. Possani, Muriel Delepierre, and Federico Del Río-Portilla. 2020. "The Three-Dimensional Structure of the Toxic Peptide C113 from the Scorpion *Centruroides Limpidus*." *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology* 184 (June): 158–66. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.06.011>.
- Luo, Feng, Xian-chun Zeng, Richard Hahin, Zhi-jian Cao, Hui Liu, and Wen-xin Li. 2005. "Genomic Organization of Four Novel Nondisulfide-Bridged Peptides from Scorpion *Mesobuthus Martensii* Karsch: Gaining Insight into Evolutionary Mechanism &" 26: 2427–33. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.06.008>.
- MacHado, Luciana E.S.F., Viviane S. De Paula, Yulia Pustovalova, Irina Bezsonova, Ana Paula Valente, Dmitry M. Korzhnev, and Fabio C.L. Almeida. 2018. "Conformational Dynamics of a Cysteine-Stabilized Plant Defensin Reveals an Evolutionary Mechanism to Expose Hydrophobic Residues." Research-article. *Biochemistry* 57 (40): 5797–5806. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00753>.
- Maraganore JM, Bourdon P, Jablonski J, Ramachandran KL, Fenton 2nd JW. 1990. "Design and Characterization of Hirulogs: A Novel Class of Bivalent Peptide Inhibitors of Thrombin." *Biochemistry*. 29: 7095–7101.
- Markossian S, Sittampalam GS, Grossman A. 2017. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. Edited by Sarine Markossian, G Sitta Sittampalam, Abigail Grossman, Kyle Brimacombe, Michelle Arkin, Douglas Auld, Christopher P Austin, et al. Bethesda (MD).
- Markwardt F. 1970. "Hirudin as an Inhibitor of Thrombin." *Method Enzymol*. 19: 924–932.
- Matsushita, Nobuto, Masahiro Miyashita, Yayoi Ichiki, Takehiko Ogura, Eiji Sakuradani, Yoshiaki Nakagawa, Sakayu Shimizu, and Hisashi Miyagawa. 2009. "Purification and CDNA Cloning of LaIT2, a Novel Insecticidal Toxin from Venom of the Scorpion *Liocheles Australasiae*." *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 73 (12): 2769–72. <https://doi.org/10.1271/bbb.90509>.
- Medvedeva, Svetlana, Jean Pierre Simorre, Bernhard Brutscher, Françoise Guerlesquin, and Dominique Marion. 1993. "Extensive 1H NMR Resonance Assignment of Proteins Using Natural Abundance Gradient-Enhanced 13C-1H Correlation Spectroscopy." *FEBS Letters* 333 (3): 251–56. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80664-G](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80664-G).
- Micsonai, András, Frank Wien, Linda Kernya, Young Ho Lee, Yuji Goto, Matthieu Réfrégiers, and József Kardos. 2015. "Accurate Secondary Structure Prediction and Fold Recognition for Circular Dichroism Spectroscopy." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (24): E3095–3103. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500851112>.
- Miljanich GP. 2004. "Ziconotide: Neuronal Calcium Channel Blocker for Treating Severe Chronic Pain." *Curr Med Chem*. 11: 3029–3040.
- Norton, Raymond S. 2018. "Peptide Toxin Structure and Function by NMR." In *Modern Magnetic Resonance*, edited by Graham A Webb, 2081–97. Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-28388-3\\_120](https://doi.org/10.1007/978-3-319-28388-3_120).
- Olamendi-Portugal, Timoteo, Rita Restano-Cassulini, Lidia Riaño-Umbarila, Baltazar Becerril, and Lourival D. Possani. 2017. "Functional and Immuno-Reactive Characterization of a Previously Undescribed Peptide from the Venom of the Scorpion *Centruroides Limpidus*." *Peptides* 87 (January): 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.11.008>.
- Olivera, Baldomero M., Jean Rivier, Craig Clark, Cecilia A. Ramilo, Gloria P. Corpuz, Fe C. Abogadie, E. Edward Mena, Scott R. Woodward, David R. Hillyard, and Lourdes J. Cruz. 1990. "Diversity of Conus Neuropeptides." *Science* 249 (4966): 257–63. <https://doi.org/10.1126/science.2165278>.
- Ortiz, Ernesto, and Lourival D Possani. 2018. "Scorpion Toxins to Unravel the Conundrum of Ion Channel Structure and Functioning." *Toxicon*. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.04.032>.
- Pennington, Michael W., Andrzej Czerwinski, and Raymond S. Norton. 2018. "Peptide Therapeutics from Venom: Current Status and Potential." *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 26 (10): 2738–58. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.09.029>.
- Peroz, David, Nicolas Rodriguez, Frank Choveau, Isabelle Baró, Jean Mérot, and Gildas Loussouarn. 2008. "Kv7.1 (KCNQ1) Properties and Channelopathies." *Journal of Physiology* 586 (7): 1785–89.



<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.148254>.

- Petterson EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. J. 2004. "UCSF Chimera--a Visualization System for Exploratory Research and Analysis." *Comput Chem.* 25 (13): 1605-1612.
- Piantini, U., O. W. Sørensen, and R. R. Ernst. 1982. "Multiple Quantum Filters for Elucidating NMR Coupling Networks." *Journal of the American Chemical Society* 104 (24): 6800-6801. <https://doi.org/10.1021/ja00388a062>.
- Pintar, Alessandro, Lourival D. Possani, and Muriel Delepierre. 1999. "Solution Structure of Toxin 2 from *Centruroides Noxius Hoffmann*, a  $\beta$ -Scorpion Neurotoxin Acting on Sodium Channels." *Journal of Molecular Biology* 287 (2): 359-67. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2611>.
- Possani, Lourival D., Baltazar Becerril, Muriel Delepierre, and Jan Tytgat. 1999. "Scorpion Toxins Specific for Na<sup>+</sup>-Channels." *European Journal of Biochemistry.* <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00625.x>.
- Possani, Lourival D. 2019. "Hadruroid Scorpion Toxins : Evolutionary Conservation and Selective Pressures," 17-20.
- Possani, Lourival D, Baltazar Becerril, Muriel Delepierre, and Jan Tytgat. 2001. "Scorpion Toxins Specific for Na<sup>+</sup> - Channels" 300 (1999).
- Possani, Lourival D, Miguel Corona, and Mario H Rodríguez. 2002. "From Noxiustoxin to Scorpine and Possible Transgenic Mosquitoes Resistant to Malaria" 33: 398-404.
- Prouse, Michael B., and Malcolm M. Campbell. 2012. "The Interaction between MYB Proteins and Their Target DNA Binding Sites." *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1819 (1): 67-77. <https://doi.org/10.1016/j.bbarm.2011.10.010>.
- Ramírez, Angelina N., Brian M. Martin, Georgina B. Gurrola, and Lourival D. Possani. 1994. "Isolation and Characterization of a Novel Toxin from the Venom of the Scorpion *Centruroides Limpidus Limpidus* Karsch." *Toxicon* 32 (4): 479-90. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90300-X](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90300-X).
- Ramkissoon, Lori a, Peleg M Horowitz, Justin M Craig, Shakti H Ramkissoon, and Benjamin E Rich. n.d. "Genomic Analysis of Diffuse Pediatric Low-Grade Gliomas Identifies Recurrent Oncogenic Truncating Rearrangements in the Transcription Factor MYBL1," 1-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300252110/-/DCSupplemental>. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1300252110](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1300252110).
- Rance, M., O. W. Sørensen, G. Bodenhausen, G. Wagner, R. R. Ernst, and K. Wüthrich. 1983. "Improved Spectral Resolution in COSY 1H NMR Spectra of Proteins via Double Quantum Filtering." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 117 (2): 479-85. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(83\)91225-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(83)91225-1).
- Riaño-Umbarila, Lidia, Gabriel Contreras-Ferrat, Timoteo Olamendi-Portugal, Citlalli Morelos-Juárez, Gerardo Corzo, Lourival D. Possani, and Baltazar Becerril. 2011. "Exploiting Cross-Reactivity to Neutralize Two Different Scorpion Venoms with One Single Chain Antibody Fragment." *Journal of Biological Chemistry* 286 (8): 6143-51. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.189175>.
- Riaño-Umbarila, Lidia, Ilse V. Gómez-Ramírez, Luis M. Ledezma-Candanoza, Timoteo Olamendi-Portugal, Everardo Remi Rodríguez-Rodríguez, Guillermo Fernández-Taboada, Lourival D. Possani, and Baltazar Becerril. 2019. "Generation of a Broadly Cross-Neutralizing Antibody Fragment against Several Mexican Scorpion Venoms." *Toxins* 11 (1). <https://doi.org/10.3390/toxins11010032>.
- Riaño-Umbarila, Lidia, Victor Rivelino Juárez-González, Timoteo Olamendi-Portugal, Mauricio Ortíz-León, Lourival Domingos Possani, and Baltazar Becerril. 2005. "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." *FEBS Journal* 272 (10): 2591-2601. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04687.x>.
- Riaño-Umbarila, Lidia, Luis M. Ledezma-Candanoza, Hugo Serrano-Posada, Guillermo Fernández-Taboada, Timoteo Olamendi-Portugal, Sonia Rojas-Trejo, Ilse V. Gómez-Ramírez, Enrique Rudiño-Piñera, Lourival D. Possani, and Baltazar Becerril. 2016. "Optimal Neutralization of *Centruroides Noxius* Venom Is Understood through a Structural Complex between Two Antibody Fragments and the Cn2 Toxin." *Journal of Biological Chemistry* 291 (4): 1619-30. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.685297>.
- Riaño-Umbarila, Lidia, Timoteo Olamendi-Portugal, Citlalli Morelos-Juárez, Georgina B Gurrola, Lourival D Possani, and Baltazar Becerril. 2013. "A Novel Human Recombinant Antibody Fragment Capable of Neutralizing Mexican Scorpion Toxins." *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology* 76 (December): 370-76. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.09.016>.

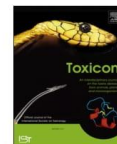
- Rocha ESM, Beraldo WT, Rosenfeld G. 1949. "Bradykinin, a Hypotensive and Smooth Muscle Stimulating Factor Released from Plasma Globulin by Snake Venoms and by Trypsin." *Am J Physiol.* 156: 261–273.
- Rogowski, R S, B K Krueger, J H Collins, and M P Blaustein. 1994. "Tityustoxin K Alpha Blocks Voltage-Gated Noninactivating K<sup>+</sup> Channels and Unblocks Inactivating K<sup>+</sup> Channels Blocked by Alpha-Dendrotoxin in Synaptosomes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (4): 1475–79. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.4.1475>.
- Sala, Arturo. 2005. "B-MYB, a Transcription Factor Implicated in Regulating Cell Cycle, Apoptosis and Cancer." *European Journal of Cancer* 41 (16): 2479–84. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.08.004>.
- Santibáñez-López, Carlos E., Oscar F. Francke, Carolina Ureta, and Lourival D. Possani. 2015. "Scorpions from Mexico: From Species Diversity to Venom Complexity." *Toxins*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/toxins8010002>.
- Saucedo, Alma L., Federico Del Rio-Portilla, Cristiana Picco, Georgina Estrada, Gianfranco Prestipino, Lourival D. Possani, Muriel Delepierre, and Gerardo Corzo. 2012. "Solution Structure of Native and Recombinant Expressed Toxin C<sub>ss</sub>II from the Venom of the Scorpion *Centruroides Suffusus Suffusus*, and Their Effects on Nav1.5 Sodium Channels." *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1824 (3): 478–87. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.01.003>.
- Scarborough RM, Rose JW, Hsu MA, et al. Barbourin. 1991. "A GPIIb-IIIa-Specific Integrin Antagonist from the Venom of *Sistrurus m. Barbouri*." *J Biol Chem.* 266: 9359–9362.
- Schaenzer, Adam J, and Gerard D Wright. 2020. "Antibiotic Resistance by Enzymatic Modification of Antibiotic Targets." *Trends in Molecular Medicine*, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.05.001>.
- Schiavon, Emanuele, Martha Pedraza-Escalona, Georgina B. Gurrola, Timoteo Olamendi-Portugal, Gerardo Corzo, Enzo Wanke, and Lourival D. Possani. 2012. "Negative-Shift Activation, Current Reduction and Resurgent Currents Induced by  $\beta$ -Toxins from *Centruroides* Scorpions in Sodium Channels." *Toxicon* 59 (2): 283–93. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.12.003>.
- Schiavon, Emanuele, Tiziana Sacco, Rita Restano Cassulini, Georgina Gurrola, Filippo Tempia, Lourival D. Possani, and Enzo Wanke. 2006. "Resurgent Current and Voltage Sensor Trapping Enhanced Activation by a  $\beta$ -Scorpion Toxin Solely in Na v1.6 Channel: Significance in Mice Purkinje Neurons." *Journal of Biological Chemistry* 281 (29): 20326–37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600565200>.
- Schwartz, Elisabeth F, Elia Diego-garcia, Ricardo C Rodríguez, De Vega, and Lourival D Possani. 2007. "Hadruus Gertschi ( Arachnida : Scorpiones )" 12: 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-119>.
- Secretaria de Salud. 2015. "Casos Por Entidad Federativa de Enfermedades No Transmisibles Hasta La Semana Epidemiológica." In *B. d. V. Epidemiologica*, edited by V.D.B.Epidemiologia, 52. Mexico.
- Seebohm, Guiscard, Jun Chen, Nathalie Strutz, Chris Culberson, Christian Lerche, and Michael C. Sanguinetti. 2003. "Molecular Determinants of KCNQ1 Channel Block by a Benzodiazepine." *Molecular Pharmacology* 64 (1): 70–77. <https://doi.org/10.1124/mol.64.1.70>.
- Shen, Yang, and Ad Bax. 2013. "Protein Backbone and Sidechain Torsion Angles Predicted from NMR Chemical Shifts Using Artificial Neural Networks." *Journal of Biomolecular NMR* 56 (3): 227–41. <https://doi.org/10.1007/s10858-013-9741-y>.
- States, D. J., R. A. Haberkorn, and D. J. Ruben. 1982. "A Two-Dimensional Nuclear Overhauser Experiment with Pure Absorption Phase in Four Quadrants." *Journal of Magnetic Resonance (1969)* 48 (2): 286–92. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(82\)90279-7](https://doi.org/10.1016/0022-2364(82)90279-7).
- Swartz, C. D., C. A. Afshari, L. Yu, K. E. Hall, and D. Dixon. 2005. "Estrogen-Induced Changes in IGF-I, Myb Family and MAP Kinase Pathway Genes in Human Uterine Leiomyoma and Normal Uterine Smooth Muscle Cell Lines." *Molecular Human Reproduction* 11 (6): 441–50. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah174>.
- Takahashi, Tomomi, Hideki Nakagoshi, Akinori Sarai, Nobuo Nomura, Tadashi Yamamoto, and Shunsuke Ishii. 1995. "Human A-Myb Gene Encodes a Transcriptional Activator Containing the Negative Regulatory Domains." *FEBS Letters* 358 (1): 89–96. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)01402-M](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)01402-M).
- Tammaro, Paolo, Kenju Shimomura, and Peter Proks. 2008. "Xenopus Oocytes as a Heterologous Expression System for Studying Ion Channels with the Patch-Clamp Technique." *Methods in Molecular Biology* 491 (3): 127–39. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-526-8\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-526-8_10).

- Tang, Huanghui, and Erwin Goldberg. 2012. "A-MYB (MYBL1) Stimulates Murine Testis-Specific Ldhc Expression via the CAMP-Responsive Element (CRE) Site1." *Biology of Reproduction* 86 (2): 1–8. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.095661>.
- "The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC." n.d.
- Tytgat, Jan, K. George Chandy, Maria L. Garcia, George A. Gutman, Marie France Martin-Eauclaire, Jurg J. Van Der Walt, and Lourival D. Possani. 1999. "A Unified Nomenclature for Short-Chain Peptides Isolated from Scorpion Venoms: ??-KTx Molecular Subfamilies." *Trends in Pharmacological Sciences* 20 (11): 444–47. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(99\)01398-X](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(99)01398-X).
- Uawonggul, Nunthawun, Sompong Thammisirak, and Arunrat Chaveerach. 2007. "Purification and Characterization of Heteroscorpine-1 ( HS-1 ) Toxin from Heterometrus Laoticus Scorpion Venom" 49: 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.09.003>.
- Vargas, Leonel, Jaimes María, Carmen Rodríguez, Rocío Argotte, Ramos Víctor, and Rivelino Juárez. 2021. "Recombinant C - Terminal Domains from Scorpine - like Peptides Inhibit the Plasmodium Berghei Ookinete Development In Vitro," 817–29.
- Vetter, Irina. 2012. "Development and Optimization of FLIPR High Throughput Calcium Assays for Ion Channels and GPCRs." In *Calcium Signaling*, edited by Md. Shahidul Islam, 740th ed., 45–82. Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2_3).
- Vizioli, Jacopo, and Michel Salzet. 2002. "Antimicrobial Peptides versus Parasitic Infections?" *Trends in Parasitology* 18 (11): 475–76. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02428-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02428-5).
- Wüthrich, K. 2015. *NMR of Proteins and Nucleic Acids. Nuclear Magnetic Resonance*. Vol. 44. <https://doi.org/10.139/9781782622758-00348>.
- Wüthrich, Kurt. 1986. "NMR with Proteins and Nucleic Acids." *Europhysics News*. <https://doi.org/10.1051/eprn/19861701011>.
- Zasloff, Michael. 2019. "Antimicrobial Peptides of Multicellular Organisms: My Perspective." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1117 (January): 3–6. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-3588-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-13-3588-4_1).
- Zeng, Xian-chun, Gerardo Corzo, and Richard Hahin. 2005. "Critical Review Scorpion Venom Peptides without Disulfide Bridges" 57 (January): 13–21. <https://doi.org/10.1080/15216540500058899>.
- Zhu, S, and J Tytgat. 2004. "The Scorpine Family of Defensins : Gene Structure , Alternative Polyadenylation and Fold Recognition" 61: 1751–63. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4149-1>.
- Zhu, Shunyi, Bin Gao, André Aumelas, Carmen Rodríguez, Humberto Lanz-mendoza, Steve Peigneur, Elia Diego-garcia, Marie-france Martin-eauclaire, Jan Tytgat, and Lourival D Possani. 2010. "Biochimica et Biophysica Acta MeuTXK β 1 , a Scorpion Venom-Derived Two-Domain Potassium Channel Toxin-like Peptide with Cytolytic Activity." *BBA - Proteins and Proteomics* 1804 (4): 872–83. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.12.017>.
- Zhu, Shunyi, Wenxin Li, Xianchun Zeng, Dahe Jiang, Xin Mao, and Hui Liu. 1999. "Molecular Cloning and Sequencing of Two ` Short Chain ´ and Two ` Long Chain ´ K † Channel-Blocking Peptides from the Chinese Scorpion Buthus Martensii Karsch" 457: 509–14.



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/toxicon>

## The three-dimensional structure of the toxic peptide Cl13 from the scorpion *Centruroides limpidus*

Andrea Estefanía López-Giraldo<sup>a</sup>, Timoteo Olamendi-Portugal<sup>b</sup>, Lidia Riaño-Umbarila<sup>b,c</sup>, Baltazar Becerril<sup>b</sup>, Lourival D. Possani<sup>b</sup>, Muriel Delepierre<sup>d,\*\*</sup>, Federico del Río-Portilla<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, CDMX, 04510, Mexico

<sup>b</sup> Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad, 2001 Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, 62210 Mexico

<sup>c</sup> Cátedra CONACYT - Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad, 2001 Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, 62210, Mexico

<sup>d</sup> CNRS UMR3528, Department of Structural Biology and Chemistry, Institut Pasteur, Paris, France

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
NMR solution structure  
Scorpion toxins  
Sodium channels  
Toxin Cl13

### ABSTRACT

Cl13 is a toxin purified previously from the venom of the Mexican scorpion *Centruroides limpidus*. This toxin affects the function of voltage gated Na<sup>+</sup>-channels, human subtypes Nav1.4, Nav1.5 and Nav1.6 in a similar manner as other known  $\beta$ -toxins from scorpion venoms. Here, we report a correction of the primary structure of Cl13, previously published. The peptide does contain 66 amino acids, but residue 58 is a tryptophan and the last C-terminal amino acid is an amidated lysine, instead of arginine. The main contribution of this communication is the determination of the 3D-structure of Cl13, by solution NMR, showing that Cl13 has the classical cysteine-stabilized  $\alpha/\beta$  (CS $\alpha/\beta$ ) folding. It has a triple stranded antiparallel beta sheet commonly present in scorpion sodium channel  $\beta$ -toxins. In addition, we report and discuss a comparison of Cl13 structure with two other toxins (Cn2 and Css2) from scorpions of the same genus *Centruroides*, which shows important surface similarities with the structure reported here. Finally, the lack of neutralization of Cl13 toxin by two single-chain antibody fragments (scFvs), named LR and 10FG2, which are capable of neutralizing various toxins from Mexican scorpions, is revised. In particular, 10FG2 is capable of neutralizing toxins Cl11 and Cl12 of the same scorpion *C. limpidus*. The reasons why LR and 10FG2 are unable of neutralizing Cl13 toxin are discussed.

### 1. Introduction

Mexico is the country where a very high number of human stings by scorpions occurs (Chippaux and Goyffon, 2008). It is estimated to be close to 300,000 people stung per year (Secretaría de Salud, 2015). It also harbors the highest biodiversity of scorpion species in the world, with 289 species described until now (Santibáñez-López et al., 2015). From this number of species, only 21 are assumed to be dangerous to humans (González-Santillán and Possani, 2018). *Centruroides limpidus*, here thereafter abbreviated *C. limpidus*, is possibly the most important species in this regard, because it is extensively distributed in the states of Morelos, Guerrero, Mexico and Michoacan. The venom of this species has been extensively studied (Alagón et al., 1988; Cid-Urbe et al., 2019; Dehesa-Dávila et al., 1996; Lebreton et al., 1994; Riaño-Umbarila et al., 2013). Initially, two main toxic peptides were described Cl11 (Ramírez

et al., 1994) and Cl12 (Dehesa-Dávila et al., 1996) which are capable of impairing proper function of sodium ion-channels (Possani et al., 1999). Our group is interested in developing human antibody fragments capable of protection against toxins of this scorpion and others of the genus *Centruroides* of Mexico (Riaño-Umbarila et al., 2019, 2016). Previous work by our group showed that a single-chain antibody (LR) directed against toxin Cn2 of another species of scorpion (*C. noxius*) was capable of neutralizing the entire soluble venom of this species (Riaño-Umbarila et al., 2011). Similarly, a single-chain antibody of human origin (10FG2) showed to be adequate for complete neutralization of the above mentioned toxins Cl11 and Cl12 (Riaño-Umbarila et al., 2019). Besides, a mixture of these antibody fragments was not capable of fully protecting against the entire soluble venom of *C. limpidus*, contrary to what it was shown with toxin Cn2 and the corresponding whole venom as well as some other venoms. The experimental mice injected with

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [jfrp@unam.mx](mailto:jfrp@unam.mx), [federico.delrio@gmail.com](mailto:federico.delrio@gmail.com) (F. del Río-Portilla).

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.06.011>

Received 5 March 2020; Received in revised form 9 June 2020; Accepted 15 June 2020

Available online 20 June 2020

0041-0101/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

these two single-chain antibodies survived the challenge, but still showed symptoms of intoxication. This prompted us to conduct further characterization of possible minor toxic components present in the venom of *C. limpidus*, which were not protected by our newly developed antibodies. In fact, a minor component, denominated Cl13 was found. It is very toxic to mice. The peptide was isolated, sequenced, physiologically characterized and published (Olamendi-Portugal et al., 2017). For the scFv 10FG2 that recognizes Cl11 and Cl12, the cognate epitope on the toxins have been located. Since the amino acid sequence similarity of Cl13 compared to that of Cl11 and Cl12 is over 70% identical, it suggests the need for further knowledge of their 3D-structures. For this reason the determination of the three-dimensional structure of Cl13 was undertaken. With this information, we hoped conducting comparative studies with the various scorpion toxins of the genus *Centruroides*, for which the structure and function are known. The NMR analysis of Cl13 indicated that a discrepancy in the reported primary structure of peptide was found. The sequence analysis by Edman degradation of the peptide was repeated with more material and the discrepancy was elucidated. The conduction of this work was very important, as we describe below, because the NMR results helped solving an ambiguity found in the primary structure of Cl13, as earlier published. Position 58 corresponds to a tryptophan and position 66 was identified as an amidated lysine, instead of an arginine. In addition, the determination of Cl13 3D-structure allowed to conduct a comparative analysis with the other known toxic peptides, which is the main contribution of this manuscript.

## 2. Material and methods

### 2.1. Source of material

Scorpions of the species *C. limpidus* were collected in Iguala (latitude 17.850, longitude 100.367) with official permit of SEMARNAT (number 004474/18), brought to the laboratory and milked for venom extraction. The soluble venom was fractionated, as earlier described by our group (Olamendi-Portugal et al., 2017) for obtaining purified Cl13. The pure peptide was used for NMR studies and *de novo* peptide sequencing.

### 2.2. Amino acid sequence

A PPSQ-31A Protein Sequencer from Shimadzu Scientific Instruments, Inc. (Columbia, MD, USA) was used for automatic Edman degradation. The peptide Cl13 was used in native and alkylated format for sequence determination. In order to obtain overlapping segments of the Cl13 the peptide was enzymatically digested and processed as earlier described (Olamendi-Portugal et al., 2017).

### 2.3. Mass spectrometry

The molecular weights of toxins and peptides after digestion were obtained by mass spectrometry measurements using a LCQFleet apparatus, from Thermo Fisher Inc, (San Diego, CA, USA).

### 2.4. NMR procedures

NMR experiments were recorded on an either 800 MHz Avance NEO (Bruker Biospin, Billerica, MA, USA) spectrometer with an 18.1 T magnetic field or a 600 MHz Avance III HD spectrometer with a 14.1 T magnetic field. The two spectrometers were equipped with a cryogenically cooled triple resonance  $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  probe. Spectra were recorded using TOPSPIN 4.05 (Bruker Biospin). The lyophilized toxin (about 4 mg) was dissolved in 180  $\mu\text{l}$  of 10% D<sub>2</sub>O 20 mM acetate pH 5 buffer (Eurisio-Top, Saclay, France) to produce a 2.8 mM (7846 MW) sample that was studied by NMR using a 3 mm Shigemi tube (Shigemi, Alison Park, PA, USA). Experiments were run at 283, 288, 298, 303, 313 and 318 K with either a 9615 Hz or 7194 Hz sweep widths. Spectra were referenced to external DSS (4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid).

The 2D proton NMR spectra were collected with 4 K data points in the t<sub>2</sub> dimension and 512 or 1024 t<sub>1</sub> increments, with typically 32–64 scans per increment. For spin system identification and sequential assignment, the following 2D NMR homonuclear experiments were recorded: (a) total correlation spectroscopy or Clean TOCSY (Griesinger et al., 1988) using a MLEV-17 pulse scheme with 80 ms or 40 ms isotropic mixing period (Bax and Davis, 1985; Levitt et al., 1982), (b) double-quantum spectroscopy (DQCOSY) (Wagner and Zuiderweg, 1983), (c) double-quantum filtered COSY (DQFCOSY) (Piantini et al., 1982; Rance et al., 1983) and (d) nuclear Overhauser effect spectra (NOESY) (States et al., 1982). NOESY spectra were acquired with mixing times of 100, 150 and 250 ms. Water suppression was achieved either by pre-saturation during the recycle delay or, in the NOESY experiment, by double pulsed-field gradient spin echoes (DPFGSE) (Dalvit et al., 1991; Hwang and Shaka, 1995). Assignment of signals to peptide protons was achieved by the standard method developed by Wüthrich (1986). HN-Ho coupling constants were measured using the modified J-doubling method in the frequency domain (Delrioportilla et al., 1994; Garza-García et al., 2001) from 2D-TOCSY at 303 K traces. To satisfy the J-doubling method requirement, TOCSY experiment was re-transformed using 1024 X 65,536 complex points to have a resolution of 0.20 Hz/point for each trace used.

In addition, two dimensional heteronuclear experiments were run at 308 K on the 800 MHz, namely  $^{15}\text{N}$  HSQC, Multiplicity edited  $^{13}\text{C}$  HSQC,  $^{13}\text{C}$  HSQC-TOCSY and  $^{13}\text{C}$  HMBC, to back up the proton assignments (Medvedeva et al., 1993).  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  chemical shift assignments were used to obtain Phi and Psi angles using the TalosN web server (Shen and Bax, 2013).

### 2.5. Structural calculation

A homonuclear  $^1\text{H}-^1\text{H}$  NOESY spectrum acquired at 308 K with a 150 ms mixing time was used to obtain distance constraints for structure calculations. The experimental results obtained by NMR were processed with the software NMRPipe (Delaglio et al., 1995). CARA 1.5 (Keller, 2004) software was used for spin system identification, peak picking and NOE derived distance constraints assignments. The structural calculation was run using CYANA 2.1 (Downing and Güntert, 2004) with chemical shift tolerance between 0.02 and 0.015 ppm. The 20 protein's models with the lowest energy values and without violations were selected between 500 structures. Additionally, 20 models with the lowest energy values were minimized and refined using molecular dynamic calculations with AMBER 9, the protocol applied was as described by Gurrola (Gurrola et al., 2012). The refined structural model of the toxin Cl13 was validated and deposited in the Protein Data Bank (PDB: 6VXW). Structures were analyzed and visualized with UCSF Chimera (Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, 2004).

## 3. Results

### 3.1. Extraction and sequence

Due to the ambiguity found between the earlier published amino acid sequence regarding position 58 of the primary structure of Cl13, it was decided to purify a greater amount of toxin and repeat the determination of the Edman degradation. For the sequence reported in Olamendi-Portugal (Olamendi-Portugal et al., 2017), we used 75  $\mu\text{g}$  of purified Cl13; for the present communication we used 250  $\mu\text{g}$ . The C-terminal fragment obtained by digesting the peptide with Asp-N endopeptidase allowed determining the full sequence from residue number 53 to 66. To our surprise the last residue was lysine, instead of arginine, as earlier surmised based on mass spectrometry results. The first time the sequence was obtained by Edman degradation did not allow the identification of residue in position 66. The molecular mass obtained from the purified peptides of the C-terminal segments Glu53 to

Lys66 was 1723.5 Da (see [Olamendi-Portugal et al., 2017](#)) and under the repeated experiment reported here is 1722.9 Da, which within the experimental error of our mass spectrometer means that it corresponds to the same molecular weight. These results agree with the expected molecular mass of the peptide found. It is important to mention that this C-terminal peptide had the cysteine reduced and alkylated. Knowing that the last residue was an amidated Lys66 and that in position 58 there was Trp, as shown on the NMR results, the fully corrected amino acid sequence of Cl13 was obtained. The molecular mass experimentally observed is (7846.6) and the expected molecular mass for the newly determined sequence is (7846.0), thus confirming the right amino acid sequence of Cl13.

### 3.2. NMR assignments and structure calculations

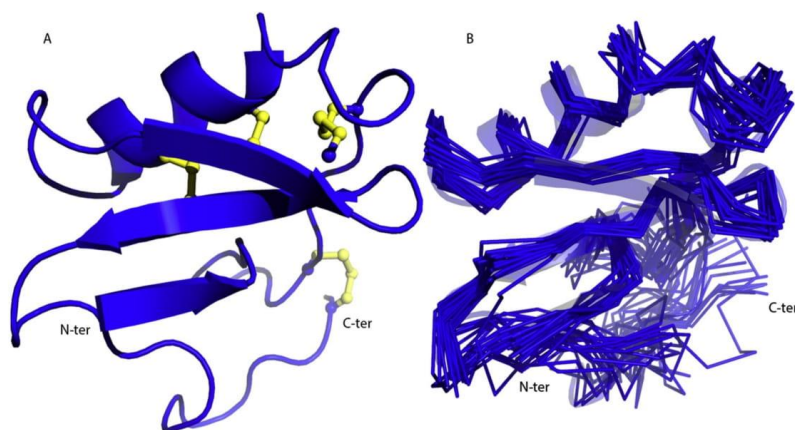
The sequence specific assignment of Cl13 were acquired according to a standard procedure ([Wüthrich, 1986](#)) using spectra recorded at different temperatures ranging from 283 to 313 K to solve ambiguities due to overlapping signals. Although, linewidths of amide resonances are quite broad at 283 K for all the amide protons those sharpened up differentially when increasing the temperature the ultimate case being Phe44 amide proton only detectable at 313 K. Briefly, spin systems of all amino acid residues were identified via their through-bond connectivities observed in DQFCOSY, TOCSY and DQCOSY whereas sequential assignments were obtained using the through space connectivities ( $\text{NH}_i\text{-NH}_{i+1}$ ,  $\text{H}\alpha_i\text{-NH}_{i+1}$  and  $\text{H}\beta_i\text{-NH}_{i+1}$ ) observed between neighboring residues in the NOESY spectra. While fairly strong NOEs sequential interactions were observed between the  $\text{H}\alpha$  proton of Leu60 and the  $\text{H}\delta$  of Pro61 allowing to assign the *trans* conformation for the Leu60-Pro61 peptide bond. Although unambiguous NOE sequential interaction could not be stated between the  $\text{H}\alpha$  protons of Trp58 and Pro59 as a result of unfortunate overlap between Phe44  $\text{H}\alpha$  and  $\text{H}\beta$  protons with Trp58 $\text{H}\alpha$  and Pro59  $\text{H}\alpha$  protons respectively, the up-field shifted value of the Pro59  $\text{H}\alpha$  chemical shift, 3.62 ppm together with the lack of NOE interaction between Trp58  $\text{H}\alpha$  and Pro59  $\text{H}\delta$  protons are in favor of a Trp58-Pro59 peptide bond in the *cis* conformation ([Dyson et al., 1988](#)).

To complete the proton assignments  $2\text{D}^{13}\text{C}\text{-}^1\text{H}$  HSQC, HSQC-TOCSY and HMBC were acquired using the natural unlabeled protein. The carbon chemical shifts displayed characteristic ranges for each amino

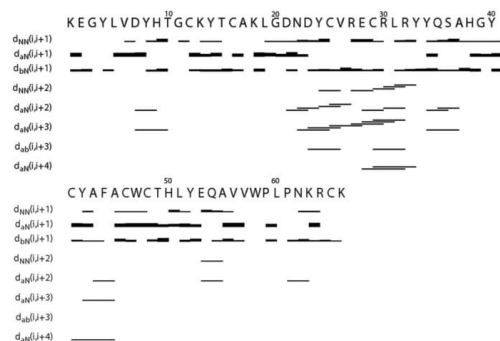
acid providing sufficient information to back up the proton assignments. The  $^{13}\text{C}$ -HSQC with multiplicity editing was of significant importance because it allowed direct identification of Gly  $\text{H}\alpha$  protons, Val, Ser and Thr  $\text{H}\beta$  protons. The  $^{13}\text{C}\text{-}^1\text{H}$  HSQC-TOCSY was quite helpful to complete side chain assignments of Pro, Lys, Arg whereas the HMBC was used to complete carbon signals of aromatic side chains ([Medvedeva et al., 1993](#)).

The Cl13 HN- $\text{H}\alpha$  coupling constants, proton, carbon and nitrogen chemical shifts are deposited in the Biological Magnetic Resonance Bank (BMRB: 30727). The 150 ms mixing time NOESY and 80 ms TOCSY at 308 K spectra showed a reasonable signal dispersion which allowed identifying the 66 spin systems of all amino acid residues; however, the dispersion was not good enough to measure  $\text{H}\alpha\text{-H}\beta$  coupling constants. The  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  completeness assignment are 93%, 66% and 72% respectively at natural abundance sample used. The solution structure of Cl13 ([Fig. 1](#)) was obtained from 2,102 NOEs with off diagonal assignment; 253 of them are long-range NOEs  $|i-j| \geq 5$ , 132 medium-range NOEs  $1 < |i-j| < 5$  and 1,717 short-range NOEs  $|i-j| \leq 1$  ([Fig. 2](#)), 67 angle restrictions from TalosN and 48 HN- $\text{H}\alpha$  coupling constants. [Fig. 1A](#) shows the Cl13 NMR solution structure, which comprise an  $\alpha$ -helix (Tyr24-Arg32), a triple stranded antiparallel  $\beta$ -sheet (Lys1-Tyr4, Ala45-Leu51 and His38-Tyr42), three loops ( $\beta 1\text{-}\alpha 1$ ,  $\alpha 1\text{-}\beta 2$  and  $\beta 2\text{-}\beta 3$ ) and four disulfide bridges. [Fig. 1B](#) shows the superposition of the 20 lowest energy structures. The final average backbone RMSD to mean was 0.66 and considering the heavy atoms RMSD to mean was 1.04. A summary of the experimental constraints and structure calculation statistics are shown in [Supplementary Material Table S1](#). Temperature coefficients of amide proton as a function of temperature were measured from 10 °C to 45 °C (1D spectra are shown in the [Supplementary Material Fig. S1](#)). The sample in  $\text{H}_2\text{O}$  was freeze dried and dissolved in  $\text{D}_2\text{O}$  to assign the remaining amide assuming they are hydrogen bonded.

We performed two different structure calculations to define the disulfide bonds: the first one, without S-S bond constraint; and, the second one with S-S bonds (C1-C8, C2-C5, C3-C6, and C4-C7) relative to the primary structure. The two calculations converged to very similar structures, see [Fig. S-2](#). The S-S bonds used for the second calculation were those observed by NMR. Indeed, NOE's were clearly observed between  $\text{H}\beta_i\text{-H}\beta_j$  and  $\text{H}\alpha_i\text{-H}\beta_j$  of the cysteines present in each disulfide bond. We present the Cys29 $\text{H}\beta$  and -Cys48  $\text{H}\beta$  NOE correlation in [Fig. 3](#).



**Fig. 1.** A) NMR solution structure of Cl13 with the lowest energy. The disulfides are painted in yellow. B) Backbone superposition of the 20 lowest energy structures of Cl13. The C-terminus is amidated. Structure calculation without disulfide bonds and superposition of the Cl13 with and without disulfide bond restrictions are in [Supplementary Material Figs. S2 and S3](#) respectively. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)



**Fig. 2.** NOE's used in the structure calculations. Thick, medium and thin lines correspond to short, medium and long range NOE's. It could be seen clearly the  $\alpha$ -helix in between residues Asp23-Tyr33, a double  $\beta$ -stranded antiparallel  $\beta$ -sheet (His38-Tyr42 and Ala45-Leu49). The  $\beta$ -strand between Glu2-Leu5 is hardly seen; however, the angle measurement and proximity found with the second  $\beta$ -strand shows its existence. NMR statistics and Ramachandran plot are in [Supplementary Material Fig. S4](#).

It can be seen that no overlap can hinder the interpretation. These calculations and the NOE's indicate that the specific cysteines are close by and therefore should be forming a bond between them. Also, the other H $\beta$  regions (Cys16-Cys41, Cys25-Cys46 and Cys65-Cys12) can be observed in [Fig. S-3](#). H $\alpha$ /H $\alpha$ , H $\alpha$ /H $\beta$  NOEs between C41 and C46, which are not covalently linked each other, were also observed as a result of beta strand formation. Considering these two results and the fact that this disulfide bond arrangement is similar to all other  $\beta$ -toxin whose structures are known, we added those restrictions to the calculation.

[Fig. 4](#) shows the sequence alignment of Cl11, Cl12, Cl13, Cn2, Css2 and CsEv2 toxins which have high identity percentage and tertiary structures reported in the PDB for Cl13, Cn2, Css2 and CsEv2 toxins only. The amino acids that form  $\beta$ -strands are highlighted in blue meanwhile those that form  $\alpha$ -helices are highlighted in red. The differences found in the secondary structure elements are highlighted in [Fig. 4](#). Additionally, Cl13 shows a well defined first  $\beta$ -strand. [Fig. 5](#) shows Cn2, Css2 and Cl13 backbone superposition of their structures. All

of these toxins have a CS $\alpha$ / $\beta$  folding motif.

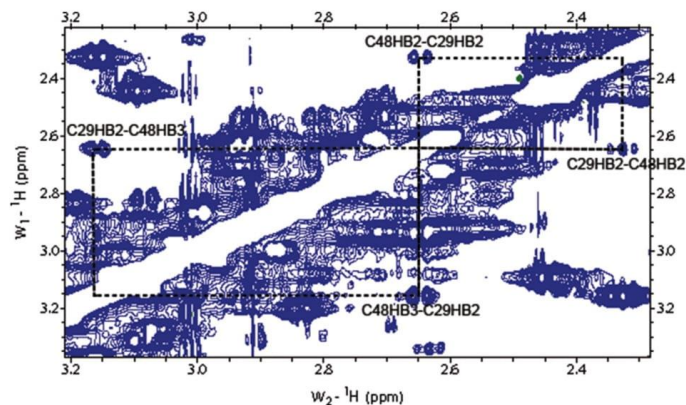
The structures being established, we did calculate the hydrophobic ([Fig. 6](#)) and the coulombic ([Fig. 7](#)) regions of Cl13, as well as those of Css2 of *Centruroides suffusus suffusus* ([Saucedo et al., 2012](#)) and Cn2 of *Centruroides noxius Hoffmann* ([Pintar et al., 1999](#)), as these are highly similar in activity and have their 3D structure solved in order to contrast those regions which have been relevant for the toxin function.

#### 4. Discussion

[Cid-Urbe et al. \(2019\)](#) in their recent published transcriptomic analysis of venom components from *C. limpidus* reported the presence of a gene that possibly codes for the toxin Cl13. The authors report the identification of 59 transcripts with similar amino acid sequence as those described for known Na<sup>+</sup>-channel specific toxins. One of them (CLiNaTbet37, COHR69) was exactly the same as the sequence now corrected for Cl13.

Taking into account the high sequence homology with two other beta-scorpion toxins Css2 of *Centruroides suffusus suffusus* ([Saucedo et al., 2012](#)) and Cn2 of *Centruroides noxius Hoffmann* ([Pintar et al., 1999](#)) whose structures have been solved by our teams, we used the two NMR experimental beta-scorpion toxin structures in order to compare them with the resulting structure of Cl13 ([Fig. 1A](#)). Indeed, all of them are toxic to mammals; however, while Cl13 and Css2 have a strong activity over hNav1.5 channel ([Olamendi-Portugal et al., 2017](#); [Schiavon et al., 2006](#)), Cn2 has a strong activity over hNav1.6 channel. An intrinsic property of toxin Cl13 is that although it also affects hNav 1.6 channels it displays some interesting and unusual effects on the inactivation process.

The sequence identity of the toxins shown in [Fig. 4](#) is higher than 56% (78% with Cn2 and 56.9% with Css2). The 3D structures differed in limited regions, see [Figs. 3–6](#). Indeed, sequence alignment of Cl13, Cn2, Css2 and CsEv2 toxins shows a high identity percentage which correlates with their conserved tertiary structures reported in the PDB sharing the typical CS $\alpha$ / $\beta$  folding. The TM score is 0.67 for Cn2 and Cl13, indicating that there is a good match between these two structures (see [Fig. 4](#)). The differences between these toxins are only in the length of amino acid segments which form the secondary structure elements. However, the alignment between Cl13 and Css2 produces very different results because there is some extra amino acids present in Css2 which give a small TM score value; nevertheless, these two structures are very similar considering visual comparison ([Fig. 5](#)). It is interesting to note that the



**Fig. 3.** H $\beta$ -H $\beta$  region of Cys29-Cys48 2D NOESY disulfide correlation obtained for Cl13 experiment at 150 ms mixing time, 308 K pH5 and 2.8 mM toxin concentration; assignments are labeled in black. The whole NOE correlation regions of cysteines forming disulfide bonds are in the [Supplementary Material Fig. S3](#). It can be seen that those correlations are well defined. This figure was made with NMRFAM-SPARKY software ([Lee et al., 2015](#)).





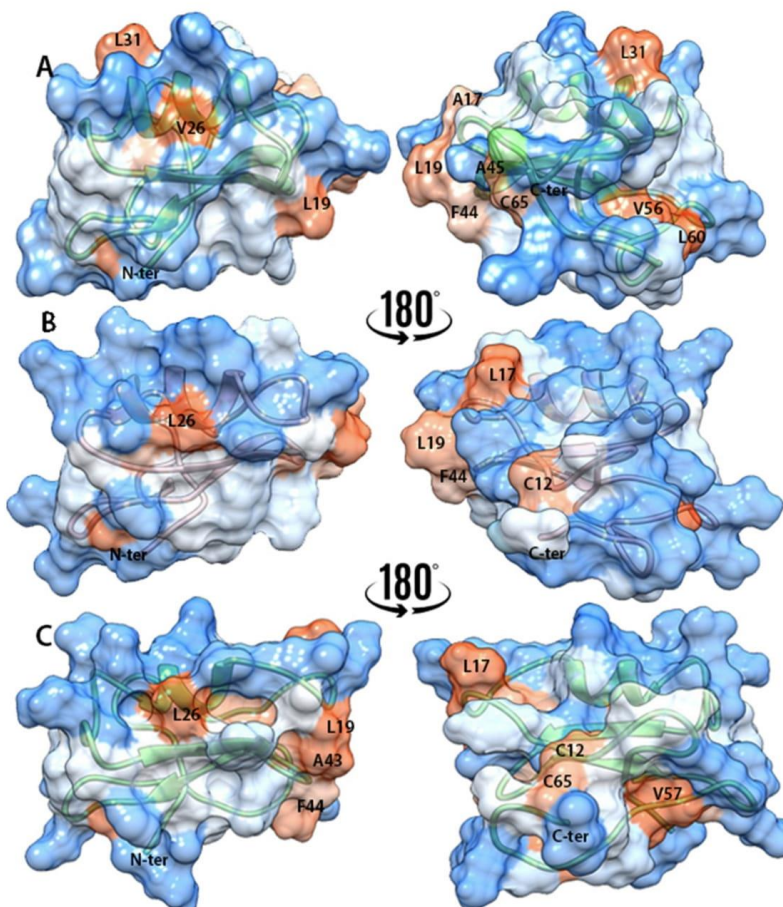


Fig. 6. The hydrophobic surfaces were calculated using UCSF Chimera (Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, 2004) of the toxins A) Cl13, B) Css2 and C) Cn2. The surfaces were colored according to a scale of three colors where blue indicates a polar region, white a neutral region and orange a hydrophobic region. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Cl13 and Lys66 for Cl13.

Previously, mutagenesis studies and a neutralizing monoclonal antibody have shown the relevance of His64 in Nav channel modulation which help to guide the  $\alpha$ -toxin into a stable binding pose (Clairfeuille et al., 2019). For Cl13 and Cn2 toxins, in this position, it is filled with an Arg64 which forms a positive patch in C-terminal region with Lys63. In Cn2, this patch is less conserved and is formed by Lys63 and Pro61.

Then, there is a second positive patch formed by the amino acids 30 and 35 that is more or less conserved in the three toxins considering that there is difference in the amino acid composition, this patch is situated in the loop  $\alpha$ 1- $\beta$ 2. Finally, the amino acid Lys8 which has been shown to play an important role for the interaction with the channel (Clairfeuille et al., 2019; Fabrichny et al., 2012) in the case of  $\alpha$ -toxin, is conserved in Cn2 and Css2, whereas it is replaced by a tyrosine followed by a histidine in Cl13. This leads to the presence of a third positive patch that is not present in Cl13 as clearly observed in Fig. 4. It clearly appears that Cl13 displays the largest negative surface as compared to Cn2 and Css2.

It is important to remember the fact that only 10FG2 single-chain antibody fragment of human origin is able to completely neutralize the two  $\beta$ -toxins Cl1 and Cl2 (Riño-Umbarila et al., 2019), and that a mixture LR and 10FG2 antibody fragments are not capable to fully protect against the entire soluble venom of *C. limpidus*, contrary to what it was shown with toxin Cn2 of *C. noxius*. For this reason the minor component Cl13 was isolated, sequenced and physiologically characterized (Olamendi-Portugal et al., 2017). It is very toxic to mice. The residue Glu15 known to have a crucial role in the action of  $\beta$ -toxins in term of toxicity (Izhar et al., 2004; Schiavon et al., 2012) is replaced here by a threonine. Cl13 is one of the most toxic components that we have studied together with Cn2, which suggests that there are other residues in the toxin that contribute to the binding and alteration of the functioning of the above mentioned sodium channels.

The study described here shows that the three-dimensional structure of Cl13 is very similar to that of Cn2 and Css2 and therefore is likely to be similar to that of Cl1 and Cl2 taking into account the high sequence

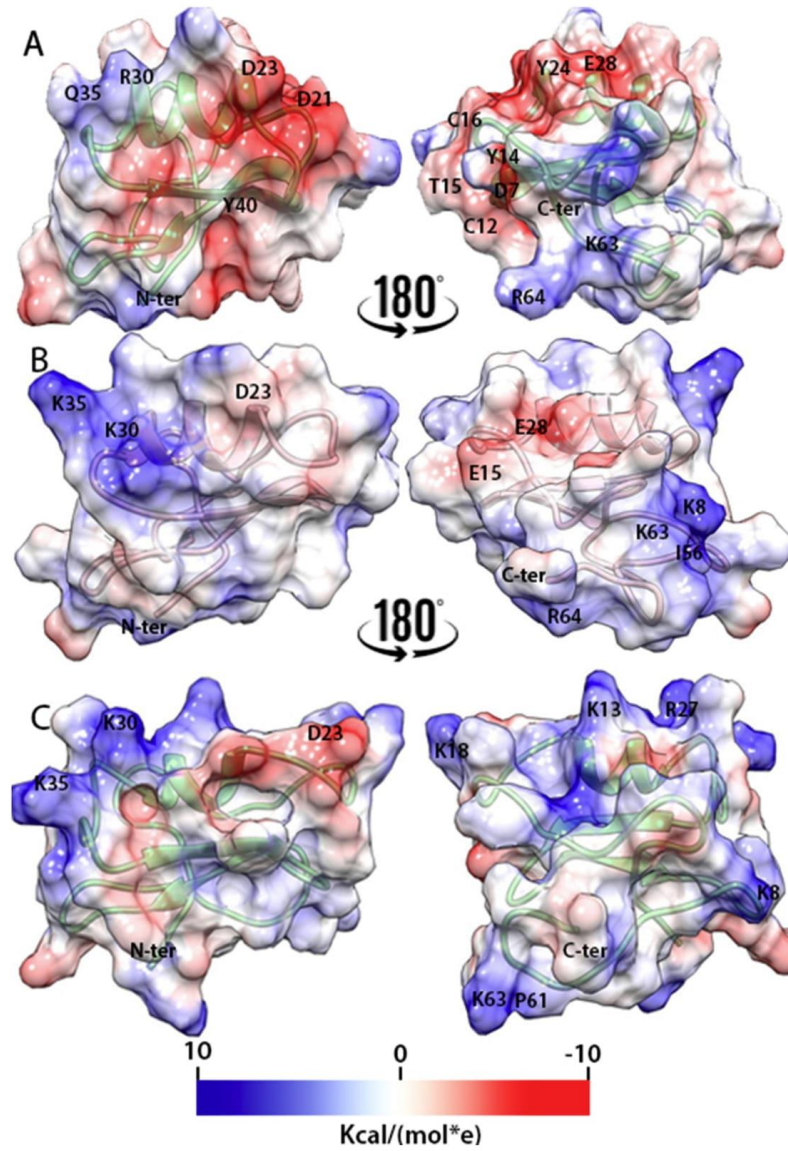


Fig. 7. Comparison between the coulombic surfaces of A) Cl13 and B) Cn2 and C) Ccs2. Positively charged regions are in blue, negatively charged regions are in red. We use UCSF Chimera software (Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, 2004) to create this figure. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

similarity among these toxins, although the 3D structures of these two last toxins are not known yet (Fig. 4). As reported earlier (Olamendi-Portugal et al., 2017), the three stretches namely positions 7–9, 30–38 and 62–66, that have been reported to be different for Cl13 as compared to the two toxins Cl11 and Cl12, might be responsible for the lack of its interaction with the single chain neutralizing antibodies. In previous

studies of the 3D structure of the ternary complex of the scFv LR, Cn2 and the predecessor scFv of 10FG2 (RU1), it was found that the core of the binding site of scFv LR is located near the N-terminus of the  $\alpha$ -helix's region of toxin Cn2 whereas that of scFv RU1 is located near the corresponding C-terminus (Riño-Umbarila et al., 2016).

The alignment shown in Fig. 4B highlights the amino acid residues

recognized in Cn2 by scFv LR in red and the ones recognized by scFv 10FG2 in blue. In Cl13 toxin, the amino acid residues that differ between Cn2 and Cl13 are highlighted in bold with respect to the sequence of the Cn2 toxin, Fig. 4B. These differences coincide with important anchor sites of the LR scFv in the Cn2 toxin, since the different contacts formed with Glu15 (a saline bridge with His35 of the VH domain of the scFv, hydrogen bonds with Ala33, Gly102, van der Waals contacts with A33H, G99H, V101H in LR) (Canul-Tec et al., 2011). In the same way, scFv 10FG2 has a very important anchorage with residues Gln31 and Glu32 of Cn2 (Riño-Umbarila et al., 2019), which are different in Cl13 (Leu31 and Arg31) indicating that these interactions could not be established with toxin Cl13.

## 5. Concluding remarks

Having assigned all protons chemical shifts and also most of carbon and nitrogen chemical shifts for Cl13 at natural abundance, its NMR solution structure was solved showing a cysteine-stabilized  $\alpha/\beta$  (CS $\alpha/\beta$ ) motif commonly found in sodium channel  $\beta$ -toxins. The structural comparison analysis shows that the three-scorpion sodium  $\beta$  toxins active on mammals share a similar hydrophobic surface and some conserved positive regions, but also a large negative region for Cl13 which suggest that the activity of these disulfide-stabilized proteins is regulated by different interaction interfaces. Indeed, the three stretches already pointed out as well as the nature of residue at position 15, which in Cl13 is a Thr whereas in most of the others is Glu, which might be responsible for the lack of interaction of Cl13 toxin with LR. The changes in positions 30, 31 and 32 do not permit the interaction with 10FG2 and as a consequence, the null neutralization of Cl13 and the deficient neutralization of the *Centruroides limpidus* whole venom.

## Ethical declaration

The authors declare that we have followed the ethical-guidelines for authors established by the editorial. We are reporting original, accurate and objective research. We do not have conflict of interest. There are not multiple, redundant or concurrent publication besides of what is submitted.

## Declaration of competing interest

The authors declare that they have not known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## CRedit authorship contribution statement

**Andrea Estefanía López-Giraldo:** Investigation, Visualization, Data curation, Formal analysis. **Timoteo Olamendi-Portugal:** Investigation, Methodology. **Lidia Riño-Umbarila:** Investigation, Methodology. **Baltazar Becerril:** Conceptualization, Writing - original draft. **Lourival D. Possani:** Conceptualization, Writing - original draft, Funding acquisition, Supervision. **Muriel Delepierre:** Conceptualization, Writing - original draft, Funding acquisition, Supervision, Data curation, Formal analysis. **Federico del Río-Portilla:** Conceptualization, Writing - original draft, Funding acquisition, Supervision, Visualization, Data curation, Formal analysis.

## 7. Acknowledgements

The authors acknowledge Dr. Fernando Z. Zamudio for the service of determining the Edman degradation and mass spectrometry data of this manuscript. The work in Paris was supported by fund from the Pasteur Institute and the Centre National de la Recherche Scientifique (UMR 3528). The 800 MHz NMR spectrometer of the Institut Pasteur was partially funded by the Région Ile de France (SESAME 2014 NMRCH

grant no 4014526). Partially supported by grant FORDECYT 303045 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología to BB and LDP; also, Dirección General del Personal Académico UNAM IN210319 and Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de la Información y Comunicación, Supercomputing Project LANCAD-UNAM-DGTIC-145 given to FRP.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.06.011>.

## References

- Alagón, A.C., Guzmán, H.S., Martín, B.M., Ramírez, A.N., Carbone, E., Possani, L.D., 1988. Isolation and characterization of two toxins from the Mexican scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch. *Comp. Biochem. Physiol. B* 89, 153–161. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(88\)90277-5](https://doi.org/10.1016/0305-0491(88)90277-5).
- Bax, A., Davis, D.G., 1985. MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. *J. Magn. Reson.* 65, 355–360. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(85\)90018-6](https://doi.org/10.1016/0022-2364(85)90018-6).
- Canul-Tec, J.C., Riño-Umbarila, L., Rudíño-Piñera, E., Becerril, B., Possani, L.D., Torres-Larios, A., 2011. Structural basis of neutralization of the major toxic component from the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann by a human-derived single-chain antibody fragment. *J. Biol. Chem.* 286, 20892–20900. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.238410>.
- Chippaux, J.P., Goyffon, M., 2008. Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. *Acta Trop.* <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.05.021>.
- Cid-Urbe, J.I., Meneses, E.P., Batista, C.V.F., Ortiz, E., Possani, L.D., 2019. Dissecting Toxicity: the Venom Gland Transcriptome and the Venom Proteome of the Highly Venomous Scorpion *Centruroides Limpidus* (Karsch, 1879). *Toxins* 11. <https://doi.org/10.3390/toxins11050247>.
- Clairfeuille, T., Cloake, A., Infeld, D.T., Llongueras, J.P., Arthur, C.P., Li, Z.R., Jian, Y., Martin-Eauclaire, M.F., Bougis, P.E., Ciferri, C., Ahern, C.A., Bosmans, F., Hackos, D. H., Rohou, A., Payandeh, J., 2019. Structural basis of a scorpion toxin action on Na v channels. *Science* 363, 1–25. <https://doi.org/10.1126/science.aav8573>, 80.
- Cohen, L., Karbat, I., Gilles, N., Ilan, N., Benveniste, M., Gordon, D., Gurevitz, M., 2005. Common features in the functional surface of scorpion  $\beta$ -toxins and elements that confer specificity for insect and mammalian voltage-gated sodium channels. *J. Biol. Chem.* 280, 5045–5053. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408427200>.
- Dalvit, C., Shapiro, G., Bohlen, J., Parella, T., 1991. Technical aspects of an efficient multiple solvent suppression pulse sequence. *Magn. Reson. Chem.* 37, 7–14.
- Dehesa-Dávila, M., Ramírez, A.N., Zamudio, F.Z., Gurrola-Briones, G., Liévano, A., Darszon, A., Possani, L.D., 1996. Structural and functional comparison of toxins from the venom of the scorpions *Centruroides infamatus infamatus*, *Centruroides limpidus limpidus* and *Centruroides noxius*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 113, 331–339. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(95\)02031-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(95)02031-4).
- Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G.W., Zhu, G., Pfeifer, J., Bax, A., 1995. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR* 6, 277–293. <https://doi.org/10.1007/BF00197809>.
- Delrioportilla, F., Blechta, V., Freeman, R., 1994. Measurement of poorly resolved splittings by J doubling in the frequency domain. *J. Magn. Reson., Ser. A* <https://doi.org/10.1006/jmra.1994.1238>.
- Downing, A.K., Güntert, P., 2004. Automated NMR structure calculation with CYANA. *Protein NMR Tech* 278, 353–378. <https://doi.org/10.1385/1-59259-809-9:353>.
- Dyson, H.J., Rance, M., Houghten, R.A., Lerner, R.A., Wright, P.E., 1988. Folding of immunogenic peptide fragments of proteins in water solution. I. Sequence requirements for the formation of a reverse turn. *J. Mol. Biol.* 201, 161–200. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(88\)90446-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90446-9).
- Estrada, G., Restano-Cassulini, R., Ortiz, E., Possani, L.D., Corzo, G., 2011. Addition of positive charges at the C-terminal peptide region of CsslI, a mammalian scorpion peptide toxin, improves its affinity for sodium channels Nav1.6. *Peptides* 32, 75–79. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.11.001>.
- Fabrichny, I.P., Mondielli, G., Conrod, S., Martin-Eauclaire, M.F., Bourne, Y., Marchot, P., 2012. Structural insights into antibody sequestering and neutralizing of Na<sup>+</sup> channel  $\alpha$ -type modulator from old world scorpion venom. *J. Biol. Chem.* 287, 14136–14148. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.315382>.
- Garza-García, A., Ponzanelli-Velázquez, G., del Río-Portilla, F., 2001. Deconvolution and measurement of spin-spin splittings by modified J doubling in the frequency domain. *J. Magn. Reson.* 148, 214–219. <https://doi.org/10.1006/jmre.2000.2235>.
- Goldstein, S.A.N., Pheasant, D.J., Miller, C., 1994. The charybotoxin receptor of a Shaker K<sup>+</sup> channel: peptide and channel residues mediating molecular recognition. *Neuron* 12, 1377–1388. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90452-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90452-9).
- González-Santillán, E., Possani, L.D., 2018. North American scorpion species of public health importance with a reappraisal of historical epidemiology. *Acta Trop.* 187, 264–274. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.08.002>.
- Griesinger, C., Otting, G., Wüthrich, K., Ernst, R.R., 1988. Clean tocsy for 1H spin system identification in macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* 110, 7870–7872. <https://doi.org/10.1021/ja00231a044>.
- Gurrola, G.B., Hernández-López, R.A., Rodríguez De La Vega, R.C., Varga, Z., Batista, C. V.F., Salas-Castillo, S.P., Panyi, G., Del Río-Portilla, F., Possani, L.D., 2012. Structure, function, and chemical synthesis of Vaejovis mexicanus peptide 24: a

- novel potent blocker of Kv1.3 potassium channels of human T lymphocytes. *Biochemistry* 51, 4049–4061.
- Hidalgo, P., MacKinnon, R., 1995. Revealing the architecture of a K<sup>+</sup> channel pore through mutant cycles with a peptide inhibitor. *Science* 268, 307–310. <https://doi.org/10.1126/science.7716527>, 80.
- Hwang, T.L., Shaka, A.J., 1995. Water suppression that works. Excitation sculpting using arbitrary wave-forms and pulsed-field gradients. *J. Magn. Reson., Ser. A* 112, 275–279. <https://doi.org/10.1006/jmra.1995.1047>.
- Izhar, K., Lior, C., Nicolas, G., Dalia, G., Michael, G., 2004. Conversion of a scorpion toxin agonist into an antagonist highlights an acidic residue involved in voltage sensor trapping during activation of neuronal Na<sup>+</sup> channels. *Faseb. J.* 18, 683–689. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0733com>.
- Keller, R., 2004. *The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial*. Cantina Verlag, Goldau, Switzerland.
- Kharrat, R., Darbon, H., Granier, C., Rochat, H., 1990. Structure-activity relationships of scorpion  $\alpha$ -neurotoxins: contribution of arginine residues. *Toxicol* 28, 509–523. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(90\)90295-1](https://doi.org/10.1016/0041-0101(90)90295-1).
- Krezel, A.M., Kasibhatla, C., Hidalgo, P., MacKinnon, R., Wagner, G., 1995. Solution structure of the potassium channel inhibitor agitoxin 2: caliper for probing channel geometry. *Protein Sci.* 4, 1478–1489. <https://doi.org/10.1002/pro.5560040805>.
- Lebreton, F., Delepiere, M., Ramirez, A.N., Balderas, C., Possani, L.D., 1994. Primary and NMR three-dimensional structure determination of a novel Crustacean toxin from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus* karsch. *Biochemistry* 33, 11135–11149. <https://doi.org/10.1021/bi00203a010>.
- Lee, W., Tonelli, M., Markley, J.L., 2015. NMRFAM-SPARKY: enhanced software for biomolecular NMR spectroscopy. *Bioinformatics* 31, 1325–1327. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu830>.
- Levitt, M.H., Freeman, R., Frenkiel, T., 1982. Broadband heteronuclear decoupling. *J. Magn. Reson.* 47, 328–330. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(82\)90124-X](https://doi.org/10.1016/0022-2364(82)90124-X).
- Loret, E.P., Soto Del Valle, R.M., Mansuelle, P., Sampieri, F., Rochat, H., 1994. Positively charged amino acid residues located similarly in sea anemone and scorpion toxins. *J. Biol. Chem.* 269, 16785–16788.
- MacHado, L.E.S.F., De Paula, V.S., Pustovalova, Y., Bezsonova, I., Valente, A.P., Korzhnev, D.M., Almeida, F.C.L., 2018. Conformational dynamics of a cysteine-stabilized plant defensin reveals an evolutionary mechanism to expose hydrophobic residues. *Biochemistry* 57, 5797–5806. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00753>.
- Medvedeva, S., Simorre, J.P., Brutscher, B., Guerlesquin, F., Marion, D., 1993. Extensive 1H NMR resonance assignment of proteins using natural abundance gradient-enhanced 13C-1H correlation spectroscopy. *FEBS Lett.* 333, 251–256. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80664-G](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80664-G).
- Notredame, C., Higgins, D.G., Heringa, J., 2000. T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.* 17 (302), 205.
- Olamendi-Portugal, T., Restano-Cassulini, R., Riano-Umbarila, L., Becerril, B., Possani, L. D., 2017. Functional and immuno-reactive characterization of a previously undescribed peptide from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus*. *Peptides* 87, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.11.008>.
- Petersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., F. T.J., 2004. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Comput. Chem.* 25, 1605–1612.
- Piantini, U., Sørensen, O.W., Ernst, R.R., 1982. Multiple quantum filters for elucidating NMR coupling networks. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 6800–6801. <https://doi.org/10.1021/ja00388a062>.
- Pintar, A., Possani, L.D., Delepiere, M., 1999. Solution structure of toxin 2 from *Centruroides noxius* Hoffmann, a  $\beta$ -scorpion neurotoxin acting on sodium channels. *J. Mol. Biol.* 287, 359–367. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2611>.
- Possani, L.D., Becerril, B., Delepiere, M., Tytgat, J., 1999. Scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup> channels. *Eur. J. Biochem.* <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00625.x>.
- Ramírez, A.N., Martín, B.M., Gurrola, G.B., Possani, L.D., 1994. Isolation and characterization of a novel toxin from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus* karsch. *Toxicol* 32, 479–490. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90300-X](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90300-X).
- Rance, M., Sørensen, O.W., Bodenhausen, G., Wagner, G., Ernst, R.R., Wüthrich, K., 1983. Improved spectral resolution in COSY 1H NMR spectra of proteins via double quantum filtering. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117, 479–485. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(83\)91225-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(83)91225-1).
- Riano-Umbarila, L., Contreras-Ferrat, G., Olamendi-Portugal, T., Morelos-Juárez, C., Corzo, G., Possani, L.D., Becerril, B., 2011. Exploiting cross-reactivity to neutralize two different scorpion venoms with one single chain antibody fragment. *J. Biol. Chem.* 286, 6143–6151. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.189175>.
- Riano-Umbarila, L., Gómez-Ramírez, I.V., Ledezma-Candanoza, L.M., Olamendi-Portugal, T., Rodríguez-Rodríguez, E.R., Fernández-Taboada, G., Possani, L.D., Becerril, B., 2019. Generation of a broadly cross-neutralizing antibody fragment against several mexican scorpion venoms. *Toxins* 11. <https://doi.org/10.3390/toxins11010032>.
- Riano-Umbarila, L., Ledezma-Candanoza, L.M., Serrano-Posada, H., Fernández-Taboada, G., Olamendi-Portugal, T., Rojas-Trejo, S., Gómez-Ramírez, I.V., Rudiño-Piñera, E., Possani, L.D., Becerril, B., 2016. Optimal neutralization of *Centruroides noxius* venom is understood through a structural complex between two antibody fragments and the Cn2 toxin. *J. Biol. Chem.* 291, 1619–1630. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.685297>.
- Riano-Umbarila, L., Olamendi-Portugal, T., Morelos-Juárez, C., Gurrola, G.B., Possani, L. D., Becerril, B., 2013. A novel human recombinant antibody fragment capable of neutralizing Mexican scorpion toxins. *Toxicol* 76, 370–376. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2013.09.016>.
- Santibáñez-López, C.E., Francke, O.F., Ureta, C., Possani, L.D., 2015. Scorpions from Mexico: from species diversity to venom complexity. *Toxins (Basel)*. <https://doi.org/10.3390/toxins8010002>.
- Saucedo, A.L., Del Rio-Portilla, F., Picco, C., Estrada, G., Prestipino, G., Possani, L.D., Delepiere, M., Corzo, G., 2012. Solution structure of native and recombinant expressed toxin CxII from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*, and their effects on Nav1.5 Sodium channels. *Biochim. Biophys. Acta Protein Proteomics* 1824, 478–487.
- Schiavon, E., Pedraza-Escalona, M., Gurrola, G.B., Olamendi-Portugal, T., Corzo, G., Wanke, E., Possani, L.D., 2012. Negative-shift activation, current reduction and resurgent currents induced by  $\beta$ -toxins from *Centruroides* scorpions in sodium channels. *Toxicol* 59, 283–293. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2011.12.003>.
- Schiavon, E., Sacco, T., Cassulini, R.R., Gurrola, G., Tempia, F., Possani, L.D., Wanke, E., 2006. Resurgent current and voltage sensor trapping enhanced activation by a  $\beta$ -scorpion toxin solely in Na v1.6 channel: significance in mice Purkinje neurons. *J. Biol. Chem.* 281, 20326–20337. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600565200>.
- Secretaría de Salud, 2015. Casos por entidad federativa de enfermedades no transmisibles hasta la semana epidemiológica. In: *Epidemiología, V.D.B. (Ed.)*, B. D. V. Epidemiológica, p. 52. Mexico.
- Shen, Y., Bax, A., 2013. Protein backbone and sidechain torsion angles predicted from NMR chemical shifts using artificial neural networks. *J. Biomol. NMR* 56, 227–241. <https://doi.org/10.1007/s10858-013-9741-y>.
- Stampe, P., Kolmakova-Partensky, L., Miller, C., 1994. Intimations of K<sup>+</sup> channel structure from a complete functional map of the molecular surface of charybdoxin. *Biochemistry* 33, 443–450. <https://doi.org/10.1021/bi00168a008>.
- States, D.J., Haberkorn, R.A., Ruben, D.J., 1982. A two-dimensional nuclear overhauser experiment with pure absorption phase in four quadrants. *J. Magn. Reson.* 48, 286–292. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(82\)90279-7](https://doi.org/10.1016/0022-2364(82)90279-7).
- Wagner, G., Züderweg, E.R., 1983. Two-dimensional double quantum 1H NMR spectroscopy of proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113, 854–860. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(83\)91077-X](https://doi.org/10.1016/0006-291X(83)91077-X).
- Wüthrich, K., 1986. NMR with Proteins and Nucleic Acids. *Europhys. News*. <https://doi.org/10.1051/epn/19861701011>.
- Xu, J., Zhang, Y., 2010. How significant is a protein structure similarity with TM-score = 0.5? *Bioinformatics* 26, 889–895. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq066>.