

03072

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES



AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LA SECUENCIA NUCLEOTIDICA DE
 UN cDNA DE CENTROROIDES NOXIUS HOFFMAN QUE CODIFICA PARA UNA
 TOXINA SEMEJANTE A LA VARIANTE 3 DE CENTROROIDES SCULPTURATUS EWING

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A

MARIA CONSUELO GARCIA RODRIGUEZ

CUERNAVACA, MORELOS

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DEL DR. BOLIVAR, EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR Y EN EL LABORATORIO DEL DR. POSSANI, EN EL DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO BAJO LA DIRECCION DEL DR. BALTAZAR BECERRIL LUJAN.

DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO EL AUTOR FUE BECARIO DE LA DIRECCION GENERAL DE INTERCAMBIO ACADEMICO DE LA UNAM Y DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA.

ESTA TESIS FUE FINANCIADA PARCIALMENTE POR LOS PROYECTOS

HOWARD HUGHES MEDICAL INSTITUTE 75191-527104

DGAPA-UNAM IN202689 E IN300991

CONACyT-0018-N9105

**JURADO DESIGNADO POR EL PROYECTO ACADÉMICO DE ESPECIALIZACIÓN,
MAESTRIA Y DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA.**

PRESIDENTE: DR. FRANCISCO G. BOLIVAR ZAPATA
SECRETARIO: DR. BALTAZAR BECERRIL LUJAN
VOCAL: DR. ROBERTO HERNANDEZ FERNANDEZ
SUPLENTE: DR. LOURIVAL D. POSSANI POSTAY
SUPLENTE: DR. DAVID RENE ROMERO CAMACHIA

**JURADO DESIGNADO POR EL PROYECTO ACADEMICO DE ESPECIALIZACION,
MAESTRIA Y DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA.**

PRESIDENTE: DR. FRANCISCO G. BOLIVAR ZAPATA
SECRETARIO: DR. BALTAZAR BECERRIL LUJAN
VOCAL: DR. ROBERTO HERNANDEZ FERNANDEZ
SUPLENTE: DR. LOURIVAL D. POSSANI POSTAY
SUPLENTE: DR. DAVID RENE ROMERO CAMARENA

INDICE

- RESUMEN	1
- PRESENTACION	2
I INTRODUCCION	3
II ANTECEDENTES	5
III OBJETIVO	11
IV PUBLICACIONES	12
V METODOLOGIA	20
VI RESULTADOS Y DISCUSION	23
VII CONCLUSIONES	30
VIII REFERENCIAS	32

RESUMEN

En esta tesis se reporta el aislamiento, caracterización y determinación de la secuencia nucleotídica de dos clonas de cDNA que codifican para sendas toxinas del veneno del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann aún no reportadas por secuencia directa de aminoácidos. También se reporta la edición por técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de uno de esos cDNAs y su clonación en un vehículo de expresión con el objeto de generar toxinas funcionales por técnicas de biología molecular.

PRESENTACION

El propósito de esta tesis fue el hacer una contribución al conocimiento de la biología molecular de las toxinas del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann como parte de un proyecto más amplio relacionado con el estudio de la relación estructura-función de dichas toxinas. La contribución de la parte de biología molecular se centra en la caracterización de los genes que codifican para estas toxinas, expresión de genes tanto silvestres como mutantes para entonces ensayar sus productos en los modelos biológicos adecuados. Esto nos permitirá correlacionar los cambios estructurales introducidos, con la especificidad y/o toxicidad de dichas toxinas.

En esta tesis se presenta primero el marco teórico y antecedentes que sirvieron de base para elaborar este proyecto. Se anexa una copia de un artículo publicado en la revista Gene en el cual se incluyen los datos relativos a la clonación y determinación de la secuencia nucleotídica de las clonas de cDNA antes mencionadas y que fueron denominadas *CngtII* y *CngtIII*. En la parte de metodología sólo se presentan los datos referentes a un ensayo adicional que no se planteó al inicio de esta tesis y que corresponde a la edición, clonación y expresión del gene *CngtII*. En la discusión y conclusiones se trata de conjuntar ambos grupos de datos.

XXXXXXXXXX

The following is a summary of the research conducted by the author in the field of quantum mechanics. The study focuses on the behavior of particles at the atomic level, particularly in the context of wave-particle duality. The author discusses the experimental setup used to observe the interference patterns of electrons, which are characteristic of wave-like behavior. The results show that the interference pattern is significantly affected by the presence of a detector, demonstrating the collapse of the wave function upon measurement. This finding is consistent with the Copenhagen interpretation of quantum mechanics, which posits that the act of observation influences the system being observed. The author also explores the implications of these results for the development of quantum technologies, such as quantum computing and quantum cryptography. The study concludes that the experimental results provide strong evidence for the non-classical nature of quantum systems and the role of the observer in the measurement process.

I INTRODUCCION

Aún cuando el número de especies del orden scorpiones es muy grande (aproximadamente 800) sólo unas 50 especies de la familia *Buthidae* pueden considerarse peligrosas al hombre. Estas especies pertenecen a los géneros *Androctonus*, *Buthus*, *Leiurus*, *Parabuthus*, *Mesobuthus* en Africa y Medio Oriente, *Centruroides* en México y sur de Estados Unidos y *Tityus* en America del Sur (Keegan 1980). Se sabe que la actividad tóxica de los venenos de alacrán es debida a la presencia de pequeños péptidos básicos de cadena sencilla que se encuentran estabilizados mediante puentes disulfuro. También se sabe que el veneno de cada especie de alacrán contiene una serie de estas proteínas neurotóxicas, las cuales presentan diferencias en la composición de aminoácidos y en el grado de toxicidad que exhiben hacia las diferentes especies animales (Babin *et al.*, 1974). Se han realizado numerosos trabajos enfocados a la purificación y caracterización de estas toxinas (Zlotkin *et al.*, 1978, Possani 1984). Las toxinas encontradas en estos venenos se han dividido en dos grupos de acuerdo a la longitud de su cadena peptídica (Possani 1984, Zamudio *et al.*, 1992, Ménez *et al.*, 1992). En el primer grupo se encuentran toxinas de cadena larga con 60-70 residuos de aminoácidos, 4 puentes disulfuro y son toxinas que se unen al canal de Na^+ de células excitables. En el segundo grupo se encuentran péptidos de cadena corta con 37-39 residuos de aminoácidos con 3 puentes disulfuro y que modifican canales de K^+ . Atendiendo a su mecanismo de acción y al sitio de pegado al canal, las toxinas de cadena larga se dividen en dos tipos: α y β (Jover *et al.*, 1980, Couraud *et al.*, 1982, Couraud y Jover 1984). Las toxinas tipo α se unen, de manera dependiente del

voltaje, al sitio de pegado No. 3 del canal de sodio y afectan la inactivación del mismo. Las toxinas tipo β se unen al sitio de pegado No. 4 del canal de sodio, de manera independiente del voltaje, afectando la activación.

Al hacer alineamientos de las secuencias primarias de estas toxinas se puede observar que mantienen varias características en común, como son la misma localización general de los residuos cisteína, un patrón similar de puentes disulfuro y la localización de algunos residuos invariantes o conservados (Fontecilla-Camps *et al.*, 1980). Respecto a la estructura tridimensional los trabajos de difracción circular, resonancia magnética nuclear y cristalografía de rayos-X han permitido proponer la conservación de un marco estructural para todas las toxinas de alacrán, independientemente de su tamaño (Fontecilla-Camps *et al.*, 1980, Almasy *et al.*, 1983, Loret *et al.*, 1990, Bontems *et al.*, 1991). La conservación de este marco estructural se mantiene aún en ciertas toxinas contra insectos que presentan un puente disulfuro atípico (Fontecilla-Camps 1989).

El interés por el estudio de las toxinas de alacrán, que en sus inicios fue motivado sólo por el aspecto médico, se ha incrementado en función de que dichas toxinas han resultado ser herramientas fundamentales en el estudio de la relación estructura-función de los canales iónicos así como su caracterización y aislamiento (Fontecilla-Camps *et al.*, 1980, Couraud y Jover 1984, Possani 1984, Blaustein *et al.*, 1991). Además presentan ciertas características como: tamaño pequeño, alta estabilidad, selectividad y especificidad que las perfilan como proteínas modelo para el estudio de la relación estructura-función pues nos ofrecen la posibilidad de introducir nuevas funciones bajo un mismo tema estructural (Zlotkin *et al.*, 1978, Ménez *et al.*, 1992).

II ANTECEDENTES

II.1.- Al iniciarse el presente trabajo el grupo del Dr. Baltazar Becerril contaba ya con un banco de cDNAs, del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann, el cual fué construido en el fago gt11 aprovechando su alta eficiencia de empaquetamiento *in vitro* de DNA como un método para introducir los genes de las toxinas del veneno de este alacrán a una cepa de *E. coli*. Se utilizaron aproximadamente 800 glándulas de organismos 7 días después de la extracción del veneno, tiempo necesario para la regeneración de las células glandulares, concomitante con un importante incremento de la concentración de mRNA que codifica para las toxinas.

Se contaba también con la secuencia nucleotídica de la clona *Cngt1* la cual se obtuvo de una búsqueda en la que se utilizó como sonda un oligonucleótido diseñado a partir de la región carboxilo de la toxina II.9.2.2 (residuos 42-48) cuya secuencia primaria había sido determinada por el grupo del Dr. Possani (Possani *et al.*, 1981). Dicha clona se encuentra truncada y codifica para la región carboxilo de una proteína del residuo Cis 25 al Ser 66 los cuales presentan una alta similitud (40 de 41 residuos son idénticos) con la región equivalente de la variante 3 del alacrán *C. sculpturatus* Ewing (CsEv3)(Fig.# 1), cuya secuencia de aminoácidos se conoce (Babin *et al.*, 1974).

II.2.- En el veneno de *C. sculpturatus* se han encontrado varias toxinas, algunas muy potentes contra vertebrados como son las toxinas I, II, III y IV, así como tres toxinas denominadas variantes 1, 2 y 3 las cuales presentan una baja actividad contra insectos y aún más baja contra vertebrados (Babin *et al.*, 1974). Esta mínima toxicidad en

vertebrados las hace buenos candidatos para los ensayos de protección en mamíferos. Con respecto a su estructura, las variantes fueron consideradas toxinas β sin embargo los ensayos electrofisiológicos mostraron que su mecanismo de acción es tipo α (Meves *et al.*, 1984).

El aspecto más importante de la toxina CsEv3 es que su estructura tridimensional ha sido determinada (Fontecilla-Camps *et al.*, 1980, Almassy *et al.*, 1983) mediante cristalografía de rayos-X, de alta resolución (1.8 Å). Los rasgos más prominentes de la estructura secundaria (Fig.# 2) son: dos y media vueltas de hélice α que incluye del residuo 23 al 31, una corta lámina β plegada de 3 hebras antiparalelas que comprenden del residuo 1 al 4, del 37 al 41 y del 46 al 50. La lámina β plegada corre aproximadamente paralela a la hélice α y ambas se conectan mediante dos puentes disulfuro de las cisteínas 25 a la 46 y de la 29 a la 48. Cerca de esta región se encuentra un tercer puente disulfuro que se forma entre las cisteínas 16 y 41. Además la molécula presenta tres vueltas reversas que incluyen los residuos 31 a 34, 42 a 45 y 52 a 55.

II.3.- Al momento de iniciar este trabajo existía ya un reporte sobre clonación y expresión de toxinas de alacrán. En dicho trabajo (Bougis *et al.*, 1989) parten de un banco de cDNAs del alacrán norteafricano *Androctonus australis* Hector para aislar una serie de cDNAs que codifican para 6 toxinas diferentes, 4 contra mamíferos y 2 contra insectos. Este fue el primer trabajo que mostró la existencia de precursores para las toxinas de alacrán y sugiere un posible procesamiento de estos precursores para llegar al péptido maduro.

Logran la expresión de una toxina biológicamente activa, en células COS-7. Sin embargo mencionan que la cantidad de proteína obtenida sólo permitió hacer el ensayo biológico

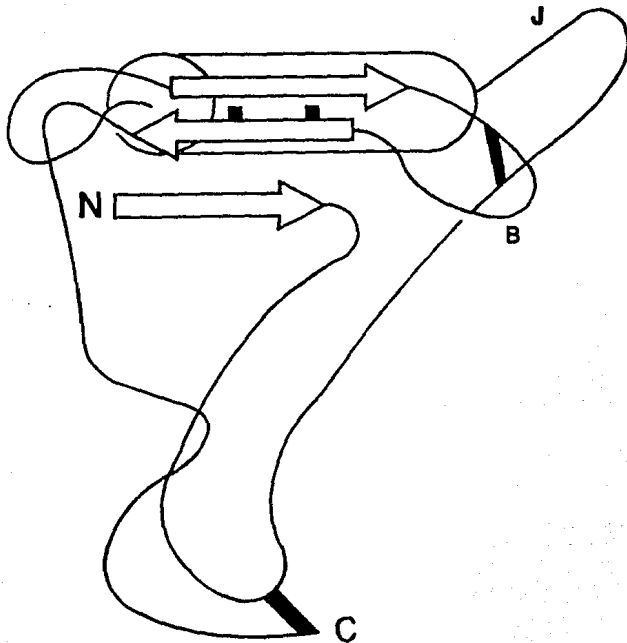


Fig.# 2 Representación esquemática de la estructura de la toxina CsEv3. La hélice- α se representa como un cilindro; las tres hebras antiparalelas de la lámina β plegada se representan por medio de flechas y los puentes disulfuro están representados por las barras negras. N= extremo amino y C= extremo carboxilo.

y no fué posible hacer la caracterización de la proteína recombinante.

II.4.- Por último, otro dato que apoyaba la viabilidad de este proyecto fue la distribución del género *Centruroides* (Fig.# 3). Se encuentran en nuestro país 28 especies de este género, 8 son peligrosas al hombre incluyendo al *C. sculpturatus* Ewing., el cual es considerado por varios autores como de Arizona y Nuevo México pero hay reportes de su presencia en Sonora y hasta Sinaloa. Por lo tanto si el *C. noxius* se localiza en Nayarit y el *C. sculpturatus* Ewing de Sonora a Estados Unidos se puede pensar en que son especies cercanas, sobre todo por estar considerado México como el centro de radiación del género (Keegan 1980)

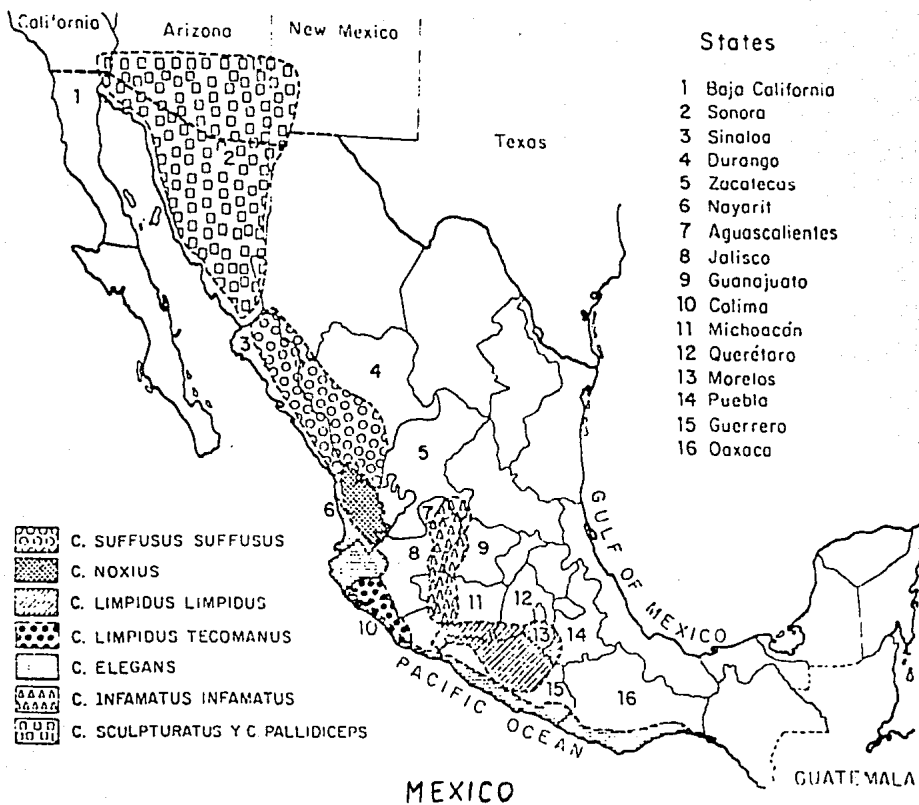


Fig.# 3 Mapa de la distribución geográfica del género *Centruroides*.

III OBJETIVO

Aislar y secuenciar un cDNA que codifique para una toxina semejante a la variante 3 del alacrán *Centruroides sculpturatus* Ewing (CsEv3) de un banco de cDNAs de *Centruroides noxius* Hoffmann.

IV PUBLICACIONES

VI.1.- Becerril, B., Vázquez A., García C., Corona M., Bolivar F. and Possani L. D.
"Cloning and characterization of cDNAs that code for Na⁺-channel-blocking toxins of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann". *Gene* (1993). En prensa.

Cloning and characterization of cDNAs that code for Na⁺-channel-blocking toxins of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann

(Recombinant DNA; λ gt11 cDNA library; Southern blot genomic analysis; nucleotide sequence; polymerase chain reaction; toxin gene evolution; introns)

Baltazar Becerril, Alejandra Vázquez, Consuelo García, Miguel Corona, Francisco Bolívar and Lourival D. Possani

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62271, México

Received by L.J. Miller; 23 September 1992; Revised/Accepted: 19 January/20 January 1993; Received at publishers: 1 March 1993

SUMMARY

With the purpose of studying the organization and characteristics of the genes that code for toxins present in the venom of the Mexican scorpion, *Centruroides noxius* Hoffmann (CnH), we prepared a λ gt11 cDNA library from the venom glands. Using specific oligodeoxyribonucleotides (oligos) designed according to known amino acid (aa) sequences of CnH toxins (STox), we detected several positive clones, determined their nucleotide (nt) sequences and deduced their aa sequences. A comparative analysis of these sequences with previously reported STox revealed that CnH cDNAs code for a family of very similar STox. The cDNA coding for a known STox, II-10, was cloned. Additionally, three other complete (new) nt sequences were obtained for cDNAs encoding peptides similar to STox 1 from CnH or variants 2 and 3 from *Centruroides sculpturatus* Ewing. Southern blot genomic DNA analysis showed a minimum size of approximately 600 bp as *Eco*RI fragments for elements of this family. PCR amplifications of CnH genomic DNA and hybridization of PCR products with specific probes indicated that the genomic structural regions that code for these genes do not contain introns, or at least not large introns.

INTRODUCTION

Of the 134 species and sub-species of Mexican scorpions, only eight are dangerous to man (Dehesa-Dávila, 1989). Species which cause the most frequent cases of scorpion poisoning in Mexico belong to the *Centruroides* genus. They represent a serious health problem with more than 200 000 people stung per year and a mortality rate

of 700–800 people per year (D. López-Acuña and A. Alagón, communicated during the technical session of the Sociedad Mexicana de Salud Pública, Mexico City, March 1979).

Scorpion venoms constitute a rich source of low-M_r peptides toxic to a variety of organisms including man (Miranda et al., 1970; reviews by Zlotkin et al., 1978; Possani, 1984). The most dangerous scorpion venoms so

Correspondence to: Dr. L.D. Possani, Instituto de Biotecnología, UNAM, Av. Universidad 2001, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271, Mexico. Tel. (52-73) 172799; Fax (52-73) 172388; e-mail: possani@pbr322.ceingeb.unam.mx

Abbreviations: aa, amino acid(s); bp, base pair(s); cDNA, DNA complementary to RNA; *Cli*, *Centruroides limpidus tecomanus*; *Cngt*, cDNA from *CnH* cloned into λ gt11; CnH, *Centruroides noxius* Hoffmann; C₃E,

Centruroides sculpturatus Ewing; C₂, *Centruroides suffusus suffusus*; cisd DNA, calf thymus sonicated and denatured DNA; Denhardt's solution, 0.02% each of bovine serum albumin/ficoll/polyvinylpyrrolidone; EtidBr, ethidium bromide; kb, kilobase(s) or 1000 bp; N, any nucleotide; nt, nucleotide(s); oligo, oligodeoxyribonucleotide; PCR, polymerase chain reaction; SDS, sodium dodecyl sulfate; SSC, 0.15 M NaCl/0.015 M Na₂citrate pH 7.6; SP, signal peptide(s); STox, scorpion toxin(s); T_m, melting temperature (temperature at which 50% of the hybrids formed between two nucleic acids are dissociated).

(right hand col. sheet)

far studied have been shown to contain two kinds of STox: long-chain polypeptides of 60–70 aa which block Na⁺-channels of excitable cells (Catterall, 1977; Couraud et al., 1982) and short-chain peptides of 37–39 aa affecting K⁺-channels (Carbone et al., 1982; Possani et al., 1982; Miller et al., 1985; Gimenez-Gallego et al., 1988; Strong et al., 1989). Recently, Valdivia et al. (1991) demonstrated the existence of another class of polypeptides in the scorpion venom that activates the Ca²⁺-release channel of the sarcoplasmic reticulum.

Nevertheless, the most thoroughly studied STox are those that modify Na⁺-channels and were classified as α - and β -STox (Couraud et al., 1982; Wheeler et al., 1983). This classification was proposed based on the existence of two different binding sites on the Na⁺-channels for the α - and β -toxins (Jover et al., 1980; Couraud et al., 1982). α -STox modify mainly the inactivation mechanism of the Na⁺-channels (Nonner, 1979), while β -STox preferentially alter the activation mechanism (reviewed by Meves et al., 1986; Strichartz et al., 1987; Thomsen and Catterall, 1989).

Our group has contributed during the last decade to the knowledge of the structure-function relationship of the toxins from the venom of Mexican scorpions (Possani, 1984; Zamudio et al., 1992). A few regions involved in toxicity or antigenicity have been mapped in these STox using synthetic peptide and monoclonal antibody approaches (Gurrola et al., 1989; Possani et al., 1991). The possibility of using modern molecular biology strategies for cloning, directed mutagenesis and expression of specific STox-encoding genes or gene fragments in order to use the purified products to verify their interactions with ion channels has greatly motivated our work.

The aim of the present study was the isolation and characterization of several cDNAs from the Mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann (CnH) and an initial characterization of the genomic region encoding these cDNAs.

RESULTS AND DISCUSSION

(a) Isolation of cDNA clones encoding STox peptides

A degenerate oligo probe coding for aa 42–48 of STox Cn2, which are well-conserved among *Centruroides* toxins, was used to screen a λ gt11 cDNA library prepared from CnH venom glands (legend to Fig. 1 and Fig. 2). From this screening we detected several positive signals with different intensities; we decided to characterize first the clone that gave the strongest signal. This clone was named *CngI1* and had an insert of approximately 230 bp. This insert was subcloned into the *EcoRI* sites of M13mp18 and M13mp19, and its nt sequence was deter-

mined. When the aa sequence from this cDNA was deduced, we found the target sequence (aa 42–48 of Cn2); however, the entire sequence did not correspond to Cn2. *CngI1* was a truncated clone that contained the sequence for a (new) Na⁺-channel-blocking STox cDNA coding from aa 25 through the polyadenylation site. A comparative analysis of the deduced aa sequence of clone *CngI1* with reported STox aa primary sequences revealed that from 41 aa encoded by this clone, 40 aa were identical with the STox variant 3 of *C. sculpturatus* (see Fig. 2), whose three-dimensional structure is known (Fontecilla-Camps et al., 1980). To explore the possibility of isolating a complete cDNA that encoded a STox closely related to CsE variant 3, we decided to use the *CngI1* insert as a probe to screen the cDNA library under conditions of high stringency in order to isolate clones highly homologous to the *CngI1* insert. From this second screening, we isolated several positive clones.

The next step consisted of probing Southern blots of digested DNA of the isolated positive clones with a variant 3-specific oligo (designed from aa 10–16; see Figs. 1 and 2). Two positive inserts with a size adequate to encode a complete STox sequence were subcloned into the *EcoRV* site of pBluescript (pKS, Stratagene, La Jolla, CA). They were called *CngII1* and *CngIII1*.

From this second screening, two less strongly positive clones were isolated, subcloned and sequenced. They were called *CngIV1* and *CngV1*. The nt sequences of clones *CngII1* through *CngV1* are shown in Fig. 1. These cDNAs are about 350 bp in length and encode STox precursors of 86–87 aa.

It has been proposed, based on the analysis of their cDNA sequences, that STox might be synthesized as precursors with a signal peptide (SP) of 18–19 aa (Bougis et al., 1989; Gurevitz et al., 1991). CnH SP sequences met all the requirements for eukaryotes as proposed by von Heijne (1986).

In the case of STox that affect mammalian Na⁺-channels (Bougis et al., 1989) and in the case of a STox that affects insect Na⁺-channels (Gurevitz et al., 1991), it has also been observed that they have extensions at their C-terminal ends: Arg, Gly-Arg or Arg-Lys. These basic residues are not present in the mature peptides and when Gly precedes a basic residue, the residue becomes amidated at the C terminus (Bougis et al., 1989).

Of the STox coded by the cDNAs shown in Fig. 1, only *CngIV1* was thoroughly studied. It corresponded to STox II-10 (Possani et al., 1981), a Na⁺-channel effector (Carbone et al., 1982; 1984), whose complete primary aa sequence has been determined (A.V., B.B., B. Martin, F. Zamudio, F.B. and L.D.P., manuscript in preparation). As shown in Fig. 2, the deduced aa sequences of these cDNAs are closely related to *Centruroides* STox that have

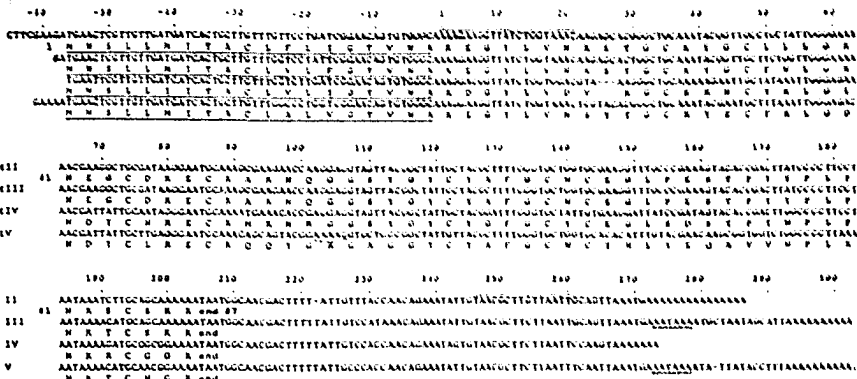


Fig. 1. Nucleotide sequences of clones *CngtII*–*CngtV* and their deduced aa sequences. SP sequences are underlined. The overlaid nt sequences [1–21 and 246–246 (complementary)] were used to synthesize PCR primers. Precursor peptides start at 1 (bold number) on the left side of *CngtIII* and Asah with aa residue 87 (bold number) to the right of the *CngtIII* sequence. Polyadenylation signals (AATAAA) are doubly underlined. *Methods*: The screening of the cDNA library was carried out in two steps. In the first step, we analyzed approximately 3000 plaques with a mixture of oligo probes designed from a conserved region of *CntI* Stx2 at 42–48 in Fig. 2 (5'-TA³G²CNT¹Y²G²CNTY¹Y²GGT²G, where N = A, C, G or T). Probes were synthesized on a Mycosyn 1450A DNA synthesizer by β-cyanoethyl phosphoramidite chemistry and ³²P-end-labeled by T4 polynucleotide kinase. Replica filters were prehybridized for 2–8 h at 37°C in 6 × SSC pH 7.6 containing 3 × Denhardt/0.1% SDS/100 µg per ml calf thymus azoxicated and denatured DNA (std DNA)/0.05% sodium pyrophosphate. Filters were then hybridized in 6 × SSC pH 7.6/1 × Denhardt/4/100 µg per ml std DNA/0.05% sodium pyrophosphate/³²P-end-labeled oligo probe for 12–16 h at 37°C. Successive washes were performed in 6 × SSC pH 7.6/0.05% Na-pyrophosphate/0.1% SDS at 37°C for 3 min and once at 42°C for 3 min before autoradiography using X-AM film with intensifying screens for 18 h at –70°C. The second step of library screening consisted in the isolation of clones similar to the positive clone *CngtI* identified in the first step (oligo screening). Positive clones were hybridized with an oligo probe designed from nt 10–16 of *C. aculeatus* variant 3 (*CtEv3*) from Fig. 2 (5'-GA⁵GG²CNTG⁵AA³T²GGNTG). Prehybridization and hybridization conditions for the double-stranded probe (*CngtI* insert) were similar to those just described except that incubation was at 42°C in the presence of 50% formamide. The pre- and hybridization conditions for *CtEv3* oligos were the same as in the first step of library screening. Positive clone inserts were amplified by PCR using *AgII* forward (5'-GGTGGCGACGACTCTGGAGGCCGG) and reverse (5'-TTGACACACAGACCAAC1GGTAATG) primers (New England Bio-Labs). These primers hybridize with the flanking regions of the *AgII* *EcoRI* cloning site. The annealing temperature depended on the T_m of the primers but typically was 50°C. The reactions were performed in a programmable heating chamber (Biozycler) using 30 rounds of temperature cycling (92°C for 1 min, 30°C for 1.5 min and 72°C for 3 min) followed by a final 10-min step at 72°C. As recommended by the manufacturer, we used 300 ng of each primer/300 ng of template DNA/2.5 units of Vent polymerase (New England Bio-Labs) in a final vol. of 100 µl reaction buffer. These PCR products were purified from gel, blunt-ended with T4 DNA polymerase and subcloned into the *EcoRV* site of phlebotomus phagemid (Stratagene, La Jolla, CA). The ligation reaction was used to transform competent *E. coli* DH5-α cells. The subcloned DNA was sequenced using the Sequenase kit (US Biochemical, Cleveland, OH) on both strands. The *AgII* forward and reverse oligo primers were used for sequencing. Since the PCR reaction is known to be associated with a relatively high rate of nt misincorporation, we performed the PCR amplification experiments with Vent polymerase instead of *Taq* polymerase, and several independent clones were sequenced. The *CngtII*–*CngtV* nt sequences were deposited with the GenBank Nucleotide Sequence Database under accession Nos. L05060–L05063, respectively.

been characterized. As can be seen in Figs. 1 and 2, the four final C-terminal residues for Stox II-10 (*CngtIV*) are Cys-Asn-Gly-Lys. It has been determined that the Asn residue is amidated at the C terminus in the mature II-10 Stox (A.V., B.B., B. Martin, E. Zamudio, F.B., and L.D.P., manuscript in preparation). Now that the cDNA sequences encoding both North African (Bougis et al., 1989; Gurevitz et al., 1991) and North American (this study) Stox are available, we can surmise that C-terminal Stox processing follows the rules previously proposed by Bougis et al. (1989). Additional processing consists of the removal of the SP.

Mature peptides encoded by the cDNAs shown in Fig. 1 would be 66 aa residues in length for *CngtII*, *CngtIII* and *CngtV* and 65 aa residues for *CngtIV*. Comparative analyses between these sequences reveal that *CngtII* and *CngtIII* are 92% similar at the nt level, and the peptides encoded by these cDNAs are 91% similar. Also, *CngtIV* shares 80% similarity with *CngtIII* at the nt level and 68% at the aa level. Similar results are obtained when *CngtV* is compared. In spite of a lower similarity at the nt level between the peptides encoded by *CngtII* (or *CngtIII*) and *CngtIV* (or *CngtV*), the similarity at the nt level (at least 80%) suggests that these

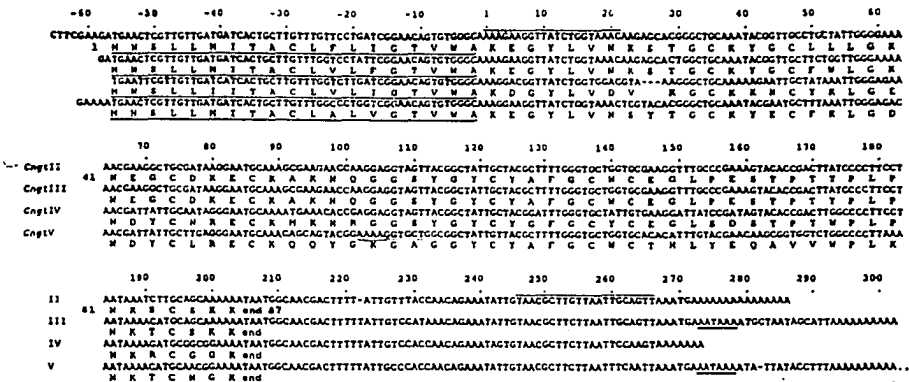


Fig. 1. Nucleotide sequences of clones *CngtII-CngtV* and their deduced aa sequences. SP sequences are underlined. The overlined nt sequences [1-21 and 246-266 (complementary)] were used to synthesize PCR primers. Precursor peptides start at 1 (bold number) on the left side of *CngtII* and finish with aa residue 87 (bold number) to the right of the *CngtII* sequence. Polyadenylation signals (AATAAA) are doubly underlined. **Methods:** The screening of the cDNA library was carried out in two steps. In the first step, we analyzed approximately 30 000 plaques with a mixture of oligo probes designed from a conserved region of *CnH1 Stox*; at 42-48 h in Fig. 2 [5'-TA³G²CNTT²GCNTGTGGTGG, where N = A, G, C or T]. Probes were synthesized on a Micosyn 1450A DNA synthesizer by *p*-cyanoethyl phosphoramidite chemistry and ³²P-end-labeled by T4 polynucleotide kinase. Replica filters were prehybridized for 2-8 h at 37°C in 6×SSC pH 7.6 containing 5×Denhardt's/0.1% SDS/100 µg/ml calf thymus sonicated and denatured DNA (cis DNA)/0.05% sodium pyrophosphate. Filters were then hybridized in 6×SSC pH 7.6/1×Denhardt's/100 µg/ml cis DNA/0.05% sodium pyrophosphate/³²P-end-labeled oligo probe for 12-16 h at 37°C. Successive washes were performed in 6×SSC pH 7.6/0.05% Na₂pyrophosphate/0.1% SDS at 37°C for 5 min and once at 42°C for 5 min before autoradiography using X-AK film with intensifying screens for 18 h at -70°C. The second step of library screening consisted in the isolation of clones similar to the positive clone *CngtI* identified in the first step (oligo screening). Positive clones were hybridized with an oligo probe designed from nt 10-16 of *C. sculpturatus* variant 3 (*CsEv3*) from Fig. 2 (5'-GAGCGNTG⁵AA²GTGGNTG). Prehybridization and hybridization conditions for the double-stranded probe (*CngtI* insert) were similar to those just described except that incubation was at 42°C in the presence of 50% formamide. The pre- and hybridization conditions for *CsEv3* oligos were the same as in the first step of library screening. Positive clone inserts were amplified by PCR using *Ag111* forward (5'-GGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCG) and reverse (5'-TTGACACCAGACCAACTGGTAATG) primers (New England Bio-Labs). These primers hybridize with the flanking regions of the *Ag111* EcoRI cloning site. The annealing temperature depended on the *T_m* of the primers but typically was 50°C. The reactions were performed in a programmable heating chamber (Biolycter) using 30 rounds of temperature cycling (92°C for 1 min, 50°C for 1.5 min and 72°C for 3 min) followed by a final 10-min step at 72°C. As recommended by the manufacturer, we used 300 µg of each primer/500 ng of template DNA/2.5 units of Vent polymerase (New England Bio-Labs) in a final vol. of 100 µl reaction buffer. These PCR products were purified from gel, blunt-ended with T4 DNA polymerase and subcloned into the EcoRV site of pBluescript phagemid (Stratagene, La Jolla, CA). The ligation reaction was used to transform competent *E. coli* DH3-α cells. The subcloned DNA was sequenced using the Sequencer kit (US Biochemical, Cleveland, OH) on both strands. The *Ag111* forward and reverse oligo primers were used for sequencing. Since the PCR reaction is known to be associated with a relatively high rate of nt misincorporation, we performed the PCR amplification experiments with Vent polymerase instead of *Taq* polymerase, and several independent clones were sequenced. The *CngtII-CngtV* nt sequences were deposited with the GenBank Nucleotide Sequence Database under accession Nos. L05060-L05063, respectively.

been characterized. As can be seen in Figs. 1 and 2, the four final C-terminal residues for *Stox II-10* (*CngtV*) are Cys-Asn-Gly-Lys. It has been determined that the Asn residue is amidated at the C terminus in the mature *II-10* *Stox* (A.V., B.B., B. Martin, F. Zamudio, F.B. and L.D.P., manuscript in preparation). Now that the cDNA sequences encoding both North African (Bougis et al., 1989; Gurevitz et al., 1991) and North American (this study) *Stox* are available, we can surmise that C-terminal *Stox* processing follows the rules previously proposed by Bougis et al. (1989). Additional processing consists of the removal of the SP.

Mature peptides encoded by the cDNAs shown in Fig. 1 would be 66 aa residues in length for *CngtII*, *CngtIII* and *CngtV* and 65 aa-residues for *CngtIV*. Comparative analyses between these sequences reveal that *CngtII* and *CngtIII* are 92% similar at the nt level, and the peptides encoded by these cDNAs are 91% similar. Also, *CngtIV* shares 80% similarity with *CngtIII* at the nt level and 68% at the aa level. Similar results are obtained when *CngtV* is compared. In spite of a lower similarity at the aa level between the peptides encoded by *CngtII* (or *CngtIII*) and *CngtIV* (or *CngtV*), the similarity at the nt level (at least 80%) suggests that these

Group	10	20	30	40	50	60
Cn7	KEGYLVNHS	TGCRTECLRLGDN	DFCLAECK	QDQTRGAGG	GTCTAFACN	CTHLYEQAVV
Csa11	KEGYLVNHS	TGCRTECLRLGDN	DFCLAECK	QDQTRGAGG	GTCTAFACN	CTHLYEQAVV
Csa111	KEGYLVNHS	TGCRTECLRLGDN	DFCLAECK	QDQTRGAGG	GTCTAFACN	CTHLYEQAVV
Ct1	KEGYLVNHS	TGCRTECLRLGDN	DFCLAECK	QDQTRGAGG	GTCTAFACN	CTHLYEQAVV
Cn2	KEGYLVNHS	TGCRTECLRLGDN	DFCLAECK	QDQTRGAGG	GTCTAFACN	CTHLYEQAVV
CngtV	KEGYLVNHS	TGCRTECLRLGDN	DFCLAECK	QDQTRGAGG	GTCTAFACN	CTHLYEQAVV
Cons.1	KEGYLVNHS	TGCRTECLRLGDN	DFCLAECK	QDQTRGAGG	GTCTAFACN	CTHLYEQAVV
G						
Cae1v	KEGYLVNHS	TGCRTECLRLGDN	DFCLAECK	QDQTRGAGG	GTCTAFACN	CTHLYEQAVV
Cngt1	KEGYLVNHS	TGCRTECLRLGDN	DFCLAECK	QDQTRGAGG	GTCTAFACN	CTHLYEQAVV
Cngt111	KEGYLVNHS	TGCRTECLRLGDN	DFCLAECK	QDQTRGAGG	GTCTAFACN	CTHLYEQAVV
Cae2v	KEGYLVNHS	TGCRTECLRLGDN	DFCLAECK	QDQTRGAGG	GTCTAFACN	CTHLYEQAVV
Cngt11	KEGYLVNHS	TGCRTECLRLGDN	DFCLAECK	QDQTRGAGG	GTCTAFACN	CTHLYEQAVV
Cae3	KEGYLVNHS	TGCRTECLRLGDN	DFCLAECK	QDQTRGAGG	GTCTAFACN	CTHLYEQAVV
Cons.2	KEGYLVNHS	TGCRTECLRLGDN	DFCLAECK	QDQTRGAGG	GTCTAFACN	CTHLYEQAVV
G						
Cae1	KDGYLVER	TGCRKNTYKLGEND	DFCMECR	NKHNGG	SYGTCTGFCG	CEGLSDSTPT
Cngt1V	KDGYLVDV	TGCRKNTYKLGEND	DFCMECR	NKHNGG	SYGTCTGFCG	CEGLSDSTPT
Cn1	KDGYLVDV	TGCRKNTYKLGEND	DFCMECR	NKHNGG	SYGTCTGFCG	CEGLSDSTPT
Cons.3	KDGYLVDV	TGCRKNTYKLGEND	DFCMECR	NKHNGG	SYGTCTGFCG	CEGLSDSTPT

Fig. 2. The aa sequence comparison of principal representatives of *Centruroides* STox. Toxin sequences were grouped according to their similarities. Gaps (-) were introduced to maximize similarities. Below each similarity group, the consensus sequence is shown in bold. The aa sequences deduced from cDNAs are included. The *CngtV* deduced primary sequence has been corroborated by direct aa sequence of the mature STox (A.V., B.B., B. Martin, F. Zamudio, F.B. and L.D.P. manuscript in preparation). Data are from this study, Meves et al. (1984) and Zamudio et al. (1992). In consensus sequences, X represents a variable residue. The aa are aligned with the last digits of the numerals.

cDNAs originate from mRNAs transcribed from closely related genes. Comparative studies with the North African *Androctonus australis* Hector STox cDNAs show that although the regions encoding mature peptides are more variable, the nucleotide sequences encoding SP and the 3' non-coding regions are relatively well-conserved (data not shown). The cDNAs encoding STox I, I', II and III of *A. australis* Hector (see Bougis et al., 1989) have a similar variation in the regions that code for the mature peptides, but those encoding the SP and the 3' non-coding regions are also well-conserved. These results indicate that both scorpion species (*A. australis* Hector and *CnH*) have followed a similar strategy to generate variation in their STox: gene duplications and independent evolution of the duplicated genes.

(b) Deduced aa sequences derived from cDNAs. Analysis and comparison with different *Centruroides* primary STox sequences

In order to compare the aa sequences derived from the cloned *CnH* cDNAs, different *Centruroides* STox were grouped according to their similarities. Gaps were introduced where necessary to maximize similarities. The STox can be clustered into three groups as shown in Fig. 2. The sequences were aligned with respect to Cys residues. Each main group was aligned, and a consensus sequence was proposed for each one of them. *CngtV*(II-10) is included in the first group, where *Cn2* can be considered representative. *Cngt11* and *Cngt111* are included in the second group, where Cse variants 2 and 3 are also presented. *Cngt1V* is included in the third group, where *Cn1* can be considered representative. Some specific differ-

ences among the three groups can be observed, especially several deletions of 1 aa residue in different positions. Examples of such deletions or insertions can be deduced from cDNA sequences. The aa residue number 9 that is a Ser in *Cngt11* and *Cngt111* is missing in *Cngt1V* (Figs. 1 and 2). It is interesting to note, however, that this region in *Centruroides* toxins is very variable (Zamudio et al., 1992), indicating that its encoding DNA could be a hot spot for mutation.

(c) Southern blot genomic analysis

To determine the size of the genomic DNA region containing the genes encoding the peptides shown in Fig. 1, Southern blot hybridization analysis was carried out. When using *Cngt1* or *Cngt11* inserts as probes (Fig. 3), only two DNA fragments are clearly observed: one of approximately 18 kb when the genomic DNA was digested with *Bam*HI, *Hind*III or *Bam*HI + *Hind*III and a second segment of approximately 0.6 kb when the digestions were performed with *Eco*RI, *Eco*RI + *Bam*HI or *Eco*RI + *Hind*III. These results and the fact that *Cngt11* and *Cngt111* share 92% similarity at the nt level suggest that at least two different 0.6-kb *Eco*RI DNA segments should contain the genomic DNA regions encoding these two cDNAs (mRNAs). Since *Cngt1V* (or *CngtV*) is 80% similar at the nt level to *Cngt11* (or *Cngt111*), and since the bands mentioned above are the only two bands present in the Southern blot experiment (18 kb and 0.6 kb), we propose that the genomic regions that specify these four cDNAs (mRNAs) are contained within these 0.6-kb *Eco*RI DNA fragments. The double digestions with *Eco*RI + *Bam*HI or *Eco*RI + *Hind*III suggest that the 18-

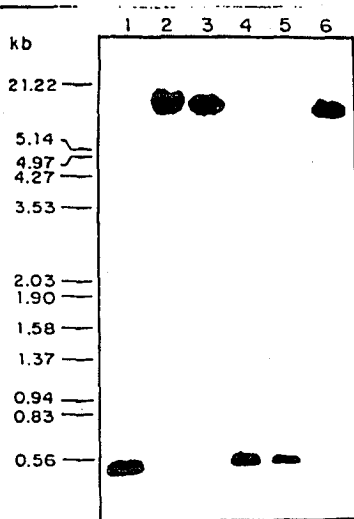


Fig. 3. Southern blot genomic analysis. CnH DNA digested with restriction endonucleases was blotted in lanes: 1, *EcoRI*; 2, *BamHI*; 3, *HindIII*; 4, *EcoRI*+*BamHI*; 5, *EcoRI*+*HindIII*; 6, *BamHI*+*HindIII*. **Methods:** High *M_w* genomic DNA was prepared from the whole body of CnH. After ethanol precipitation the DNA was resuspended in water and subjected to molecular filtration chromatography on an agarose A-50 (Bio-Rad, 0.7 x 28 cm) column equilibrated (and then eluted) with 0.01 M Tris pH 7.6/1 mM EDTA/0.75 M NaCl. Twenty fractions of 0.5 ml were collected, and the DNA profile was determined by absorbance at 260 nm. Fractions corresponding to the maximum of absorbance were pooled and ethanol-precipitated. This step was necessary in order to eliminate a pigment that coprecipitates with scorpion DNA. The colored material was shown to inhibit the enzymatic digestion of DNA. After digestion with the indicated endonucleases, 10-µg samples of DNA were electrophoresed in a 0.7% agarose gel, blotted onto a nitrocellulose membrane and probed independently with the inserts derived from clones *Cng11* or *Cng12*. The probes were ³²P-labeled using the random primer labeling kit from Dupont. The filters were prehybridized, hybridized and washed as described in the legend to Fig. 1 for double-stranded probes (second step screening), except that an additional wash at 65°C for 10 min was performed.

kb-band might contain at least these four 0.6-kb *EcoRI* segments. An alternative explanation is that each cDNA (mRNA) could be encoded by a different 18-kb band. Thus, their corresponding genes may also be encoded in the same or different 18-kb DNA bands, and consequently, they might have the same organization as the 0.6-kb *EcoRI* fragments in which a substantial part of the region transcribed into their respective mRNAs might be present. Furthermore, these results also suggest that the genes encoding these STox lack large introns.

(d) PCR genomic analysis

In order to understand the genomic organization of the structural DNA regions encoding CnH STox, a PCR amplification experiment using genomic DNA and specific primers was performed. The DNA sequences that were used for the synthesis of the PCR primers correspond to well-conserved sequences of CnH cDNA. They are shown overlined in Fig. 1 and flank a stretch of 263–266 bp of DNA that includes the mature part of the STox encoded by these cDNA. As can be seen in Fig. 4, while several DNA bands were visualized after staining with EtDbr, when using 0.5 µg of genomic DNA as the PCR substrate (Fig. 4A, lane 2), only one specific DNA band, of about 270 bp, was observed after hybridization (Fig. 4B, lane 2). This band corresponds to the smallest band stained with EtDbr. When ten times more genomic DNA (5 µg) was used as the substrate for PCR amplification, a second specific band of about 330 bp was detected

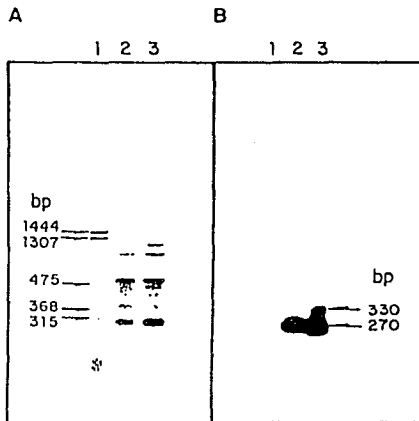


Fig. 4. PCR genomic analysis. Primers for genomic PCR amplifications were synthesized as described in the legend to Fig. 1. The forward primer (5'-AAAGAAGGTTATCTGGTAAAC), corresponds to a well-conserved DNA sequence that codes for the first 7 aa of mature *C. noxius* toxins (see Figs. 1 and 2). The reverse primer (5'-AACTGCAATTAAGAAGCGTTA) is complementary to a well-conserved at 246–266 sequence of cDNA (see Fig. 1). The source of the DNA was the same as for the Southern blot genomic analysis. PCR conditions were the same as described in the legend to Fig. 1, except that 0.5 µg or 5 µg of template DNA were used. (Panel A) Products of PCR amplification; lanes: 1, pBR322 (Bolivar et al., 1977) digested with *TaqI* as size marker; 2, PCR sample (1/20 of total reaction) using 0.5 µg of genomic DNA as template; 3, same as lane 2 but using 5 µg of template DNA. The gel was stained with EtDbr and photographed under ultraviolet light. (Panel B) Autoradiography of PCR products shown in panel A hybridized with *Cng12* insert. The pBR322 DNA was also transferred and hybridized as a negative control.

(Fig. 4B, lane 3). It is important to observe that the 330-bp band was detected only when high concentrations of genomic DNA were used as a substrate for PCR, suggesting that this band might correspond to a region that might have an at least tenfold lower copy number than the 270-bp band versions. Taking the cDNA sequences shown in Fig. 1 as prototypes of DNA sequences that encode CnH STox, these PCR results indicate that the 270-bp product should code for the mature part of CnH STox closely related to the ones encoded by the *CngtII-CngtV* cDNA. These results also indicate that those genomic regions do not contain introns. However, the results in Fig. 4B (lane 3) clearly show the presence of a 330-bp fragment which could accommodate an intron of about 60 bp in its genomic region. Another possibility is that the 330-bp band corresponds to a rare version of a closely related gene. Preliminary results aimed at verifying the existence of introns in the genomic regions encoding the 5' end of CnH STox cDNAs (including the SP) did not detect introns. We have sequenced some of the cloned PCR products, and we did not find introns at least between the regions coding for the SP and the C terminus (data not shown). An interpretive review of the results presented in this work, including detailed comparative analyses and recent data on the STox structure-function relationship, is now in preparation for publication (B.B., A.V., C.G., M.C., L.D.P. and F.B.).

(e) Conclusions

- (1) We have prepared and probed a λ gt11 cDNA library from the venom glands of the Mexican CnH scorpion. From this cDNA library we have isolated four cDNAs that code for different STox.
- (2) We have determined the nt sequence of these cDNAs and deduced their aa sequences. From these sequences we have shown that they are closely related to the STox CnI of CnH and to variants 2 and 3 of CnE. *CngtV* corresponded to STox II-10 of CnH, which has been purified and sequenced in our group.
- (3) From the nt sequence data, it seems that these CnH cDNAs derived from a common gene ancestor. We propose that this gene might have duplicated, and each duplication then evolved independently.
- (4) From Southern blot genomic analysis, it can be proposed that this family of closely related genes, including at least the genes coding for the four cDNAs reported here, shows a minimal size of about 600 bp when the genomic DNA is digested with *EcoRI*.
- (5) PCR genomic amplifications of CnH DNA with specific primers and hybridization with specific probes suggest that the region(s) encoding the mature part of

STox closely related to the ones reported here do not seem to contain large introns.

(6) Comparison of STox sequences deduced from CnH cDNAs provided background for their classification, in terms of their similarity, in three different groups.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by grants of the Universidad Nacional Autónoma de México project DGAPA No. IN202689 to L.D.P., CONACyT (México) project 0018-N9105 to L.D.P. and F.B. and Howard Hughes Medical Institute No. 75191-527104 to L.D.P. Training received by B.B. in the laboratories of Dr. Ki-Han Kim (Department of Biochemistry, Purdue University) and Dr. Edward Ginns (National Institute for Mental Health, Bethesda) is greatly appreciated. Dr. Fernando López Casillas and Dr. Brian Martín are acknowledged for helpful discussions. Oligos were synthesized at the 'Unidad de Síntesis de Oligonucleótidos' of the Instituto de Biotecnología, with the assistance of Paul Gaytán. The technical assistance of Fernando Zamudio is also recognized.

REFERENCES

- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Bellach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Cross, J.H. and Falkow, S.: Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2 (1977) 95-113.
- Bougis, P.E., Rochat, H. and Smith, L.A.: Precursors of *Androctonus australis* scorpion neurotoxins. *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 19259-19265.
- Carbone, E., Wankt, E., Prestipino, G., Possani, L.D. and Maclicke, A.: Selective blockage of voltage-dependent K⁺ channels by a novel scorpion toxin. *Nature* 296 (1982) 90-91.
- Carbone, E., Prestipino, G., Franciolini, F., Dent, M.A.R. and Possani, L.D.: Selective modification of the squid axon Na currents by *Centruroides noxius* toxin II-10. *J. Physiol. Paris* 79 (1984) 179-184.
- Catterall, W.A.: Activation of the action potential Na⁺ ionophore by neurotoxins. An allosteric model. *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 8669-8676.
- Couraud, F., Jover, E., Dubois, J.M. and Rochat, H.: Two types of scorpion toxin receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel. *Toxicon* 20 (1982) 9-16.
- Dehesa-Dávila, M.: Epidemiological characteristics of scorpion sting in León, Guanajuato, México. *Toxicon* 27 (1989) 281-286.
- Fontecilla-Camps, J.C., Almassay, R.J., Suddath, F.L., Watt, D.D. and Dugg, C.E.: Three dimensional structure of a protein from scorpion venom: a new structural class of neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 6496-6500.
- Gimenez-Gallego, G., Navis, M.A., Reuben, J.P., Katz, G.M., Kaczorowski, G.J. and Garcia, M.L.: Purification sequence, and model structure of charybotoxin, a potent selective inhibitor of calcium-activated potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 3329-3333.

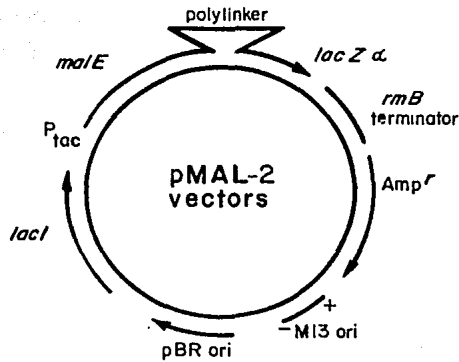
- Gurevitz, M., Urbeck, D., Zlotkin, E. and Zilberberg, N.: Nucleotide sequence and structure analysis of a cDNA encoding an alpha insect toxin from the scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. *Toxicol* 29 (1991) 1270-1272.
- Gurrola, G.B., Molinar-Rodr, R., Sitges, M., Bayon, A. and Possani, L.D.: Synthetic peptide corresponding to the sequence of Noxiustoxin indicate that the active site of this K⁺ channel blocker is located on its N-terminal portion. *J. Neural Transm.* 77 (1989) 11-20.
- Jover, E., Couraud, F. and Rochat, H.: Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95 (1980) 1607-1614.
- Meves, H., Simard, M.J. and Watt, D.D.: Biochemical and electrophysiological characteristics of toxins isolated from the venom of the scorpion *Centruroides sculpturatus*. *J. Physiol. Paris* 79 (1984) 185-191.
- Meves, H., Simard, M.J. and Watt, D.D.: Interactions of scorpion toxins with the sodium channel. In: Kao, C.Y. and Levinson, S.R. (Eds.), *Tetrodotoxin, Saxitoxin and the Molecular Biology of the Sodium Channel*. Ann. NY Acad. Sci. 479 (1986) 113-132.
- Milkr, C., Moczydlowski, E., Latorre, R. and Phillips, M.: Charybotoxin, a protein inhibitor of single Ca²⁺-activated K⁺ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature* 313 (1985) 316-318.
- Miranda, F., Kopeyan, C., Rochat, H., Rochat, C. and Lissitzky, S.: Purification of animal neurotoxins. Isolation and characterization of eleven neurotoxins from the venom of the scorpions *Androctonus australis Hector*, *Buthus occitanus tunetanus* and *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. *Eur. J. Biochem.* 16 (1970) 514-523.
- Nonner, W.: Effects of *Leiurus* scorpion venom on the 'gating' current in myelinated nerve. In: Ceccarelli, B. and Clementi, F. (Eds.), *Advances in Cytopharmacology*, Vol. 3. Raven Press, New York, 1979, pp. 345-351.
- Possani, L.D.: Structure of scorpion toxins. In: Tu, A.T. (Ed.), *Handbook of Natural Toxins*, Vol. 2. Marcel Dekker, New York, 1984, pp. 513-550.
- Possani, L.D., Dent, M.A.R., Martin, B.M., Maclicke, A. and Svendsen, I.: The N-terminal sequence of several toxins from the venom of the Mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Carlsberg Res. Commun.* 46 (1981) 207-214.
- Possani, L.D., Martin, B.M. and Svendsen, I.: The primary structure of Noxiustoxin: a K⁺ channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Carlsberg Res. Commun.* 47 (1982) 285-289.
- Possani, L.D., Gurrola, G.B., Portugal, T.O., Zamudio, F.Z., Vaca, L.D., Calderon, E.S.A. and Kirisch, G.E.: Scorpion toxins: a model for peptide synthesis of new drugs. In: Oliveira, B. and Sgarbieri, V. (Eds.), *Proceedings of the First Brazilian Congress on Proteins*. Editora da UNICAMP, Campinas, Brazil, 1991, pp. 352-367.
- Strichartz, G., Rando, T. and Wang, G.K.: An integrated view of the molecular toxicology of sodium channel gating in excitable cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 10 (1987) 237-267.
- Strong, P.N., Weir, S.W., Beoch, D.J., Hicstead, P. and Kocher, H.P.: Effects of potassium channel toxins from *Leiurus quinquestriatus hebraeus* venom on responses to cromakalim in rabbit blood vessels. *Br. J. Pharmacol.* 98 (1989) 817-826.
- Thomsen, W.J. and Catterall, W.A.: Localization of the receptor site for α -scorpion toxins by antibody mapping: implications for sodium channel topology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 10161-10165.
- Valdivia, H.H., Fuentes, O., El-Hayek, R., Morrisette, J. and Coronado, R.: Activation of the ryanodine receptor Ca²⁺ release channel of sarcoplasmic reticulum by a novel scorpion venom. *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 19135-19138.
- von Heijne, G.: A new method for predicting sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* 14 (1986) 4683-4690.
- Wheeler, P.K., Watt, D.D. and Laszinski, M.: Classification of Na channel receptors specific for various scorpion toxins. *Pflügers Arch.* 397 (1983) 164-165.
- Zamudio, F., Saavedra, R., Martin, B.M., Gurrola-Briones, G., Herion, P. and Possani, L.D.: Amino acid sequences and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Eur. J. Biochem.* 204 (1992) 281-292.
- Zlotkin, E., Miranda, F. and Rochat, C.: Chemistry and pharmacology of Butihine scorpion venoms. In: Bettini, S. (Ed.), *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 48. Springer-Verlag, Berlin, 1978, pp. 317-369.

V METODOLOGIA

V.1.- Expresión del gene *CngtII*: para este ensayo se utilizó un "kit" comercial (Biolabs) para expresión y purificación de proteínas de fusión. El kit cuenta con dos vehículos de expresión uno citoplásmica (pMAL-C) y el otro periplásmica (pMAL-P). Ambos vehículos presentan el mismo "polylinker" (Fig.# 4) . Como proteína acarreadora se usa una proteína de unión a la maltosa. La purificación de los productos se hace por cromatografía de afinidad utilizando una resina de amilosa, también nos proporciona anticuerpos contra la proteína de unión a la maltosa. Para el corte de la proteína de fusión el "kit" cuenta con el factor Xa el cual corta en la secuencia Ile-Glu-Gli-Arg-Pro codificada por una región en cuyo borde existe un sitio para la enzima de restricción *XmnI*, por lo que al clonar en este sitio se puede tener una separación exacta de la proteína de interés.

V.1.1 - Edición: se llevó a cabo mediante PCR usando como templado el DNA de la clona en *gt11* . Para este paso se diseñaron dos oligos: #1N (5' ATG AAA GAA GGT TAT CTG GTA AAC 3') para el extremo amino, el cual nos permite deletar el péptido señal completo y agregar una metionina al inicio del gene para separar la proteína de fusión mediante un corte con CNBr. #1C (5' TTA GCT GCA AGA TTT ATT AGG AAG 3') para el extremo carboxilo y el cual nos permite deletar las dos lisinas que preceden al codón de terminación.

V.1.2 - Clonación: el producto de PCR (0.2 kb) fué rasurado con *PstI*/T4 y ya purificado



pMAL-c2,-p2 polylinker

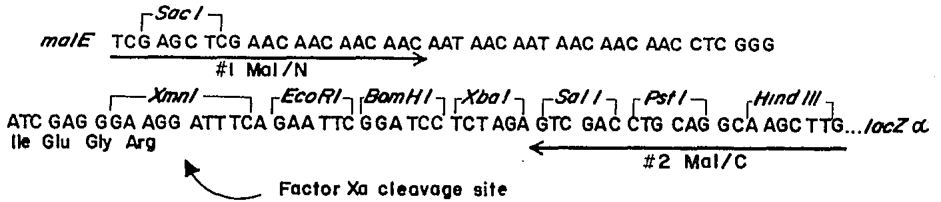


Fig.# 4 Diagrama de los vectores pMAL: La región del polilinker se encuentra amplificada, se pueden observar los sitios de restricción únicos. Las regiones subrayadas corresponden a los sitios de unión de los oligos #1Mal/N y #2Mal/C. La flecha marca el sitio de corte del factor Xa.

se subclonó en pMAL-C en el sitio de XmnI (Fig.# 4). El producto de la ligación se utilizó para transformar la cepa TB1 de *E. coli*, la cual permite α complementación, por lo que las colonias recombinantes fueron seleccionadas en cajas con medio de cultivo conteniendo X-gal e IPTG.

La presencia y tamaño del inserto se determinó en un gel de agarosa, previa purificación del DNA del plásmido el cual fué digerido con las enzimas *SacI* y *Eco RI*.

V.1.3 - Expresión: para probar la expresión del gene *CngtII*, se prepararon varios cultivos utilizando 5 ml de LB-Amp, tomando como inóculo algunas de las colonias que presentaron un inserto del tamaño correcto. Se incubaron a 37°C con agitación hasta que los cultivos alcanzaron una densidad de 2×10^8 células/ml. Se agregó el inductor (IPTG 0.3 mM) y se incubó 2 h más. Una alícuota de cada uno de los cultivos, antes y después de la inducción, se sometió a electroforesis (SDS-PAGE).

A las colonias que mostraron expresión de una proteína del tamaño esperado (49,260 Da = 42,000 de MBP + 7,260 Cngt II) se les determinó su secuencia de nucleótidos para comprobar la orientación del inserto así como la edición del gene. Para este fin se diseñaron los oligos #1 Mal/N y #2Mal/C (Fig.# 4).

Tomando como inóculo una colonia, cuya secuencia nucleotídica mostró la orientación correcta del inserto, se iniciaron los ensayos de expresión. En el primero se prepararon dos extractos diferentes para verificar si la proteína de fusión se encontraba en forma soluble o si formaba cuerpos de inclusión.

Para determinar la cantidad óptima de inductor y el mejor tiempo de cosecha se hicieron varios cultivos en 80 ml de medio rico adicionado con glucosa y ampicilina a 37°C .

VI RESULTADOS Y DISCUSION

VI.1. Análisis de la estructura de los cDNAs (*CngtII* y *CngtIII*). Ambas secuencias mostraron un marco abierto de lectura capaz de codificar para precursores completos de una toxina de alacrán. Se observa una región que codifica para un péptido señal de 19 aa. Sigue la región encargada de codificar para la parte estructural de una proteína de 66 aa más el codón de terminación (Fig # 1 del artículo, página 3). Sólo en uno de los cDNAs (*CngtII*) se encuentra presente una señal de poliadenilación típica aunque ambos presentan la región del poli A. Esto se debe, probablemente, a que la clona *CngtII* se encuentra truncada antes de dicha señal y que lo que parece ser el poli A bien pudiera ser el complementario de el oligo dT que pudiera haber servido como primer para la síntesis de la primera cadena de cDNA. Este efecto se puede observar en otras clonas aisladas por nuestro grupo. La region 5' no codificadora es en un caso de 8 nucleótidos mientras que en el otro sólo hay 1. La region 3' no codificadora es en ambos casos mayor de 70 nucleótidos.

La homología que existe entre las dos clonas es tan alta (92%) que podemos suponer que ambos genes pertenecen a una misma familia. Además la secuencia primaria para la que codifican presentan homología aun mayores con otras proteínas del grupo de las variantes (Fig.# 5) por lo que podemos afirmar que se trata de dos grupos de genes homólogos (uno en *C. noxius* y el otro en *C. sculpturatus*). Se pueden observar regiones altamente conservadas y otras regiones donde se encuentran todas las variaciones, las cuales estructuralmente representan las asas o vueltas de la molécula.

Asimismo los péptidos señales de ambas clonas son altamente similares y presentan

	1	10	20	30	40	50	60				
	ββββ			αααααααα	βββββ	βββββ	*****				
CsEv1	KEGYLVKKS	SDGCKYD	CFWLK	GKNEHC	NTECKAK	NQGGSY	GCYAFAC	WCEGLPE	STPTYPL	PNK-CS	- 65 aa
CsEv2	KEGYLVNK	STGCKY	GCLKLG	ENEGCD	KECKAK	NQGGSY	GCYAFAC	WCEGLPE	STPTYPL	PNK-CSS	- 66 aa
CsEv3	KEGYLVKKS	SDGCKY	GCLKLG	ENEGCD	TECKAK	NQGGSY	GCYAFAC	WCEGLPE	STPTYPL	PNKSC	- 65 aa
Cngt II	KEGYLVNK	STGCKY	GCLLLG	KNEGCD	KECKAK	NQGGSY	GCYAFAC	WCEGLPE	STPTYPL	PNKSCS	- 66 aa
Cngt III	KEGYLVNK	STGCKY	GCFWLG	KNEGCD	KECKAK	NQGGSY	GCYAFAC	WCEGLPE	STPTYPL	PNKTC	- 66 aa
		.	*	+	ç	*	+	ç		.	
		12	16	25	29	41	46	48		65	

GRADO DE HOMOLOGIA

CngtII-CngtIII = 95.4 %

CsEv1-CngtII = 83.3 %

CsEv1-CngtIII= 86.4 %

CsEv1-CsEv2 = 84.8 %

CsEv1-CsEv3 = 86.4 %

CsEv2-CsEv3 = 90.9 %

CsEv2-CngtII = 92.4 %

CsEv2-CngtIII= 90.9 %

CsEv3-CngtII = 87.9 %

CsEv3-CngtIII= 84.8 %

Fig.# 5 Comparación de la secuencia de aminoácidos de las toxinas denominadas variantes (1, 2 y 3) de *C. sculpturatus* E., con las secuencias primarias deducidas a partir de las clonas *CngtII* y *CngtIII* de *C. noxius* Hoffmann. Se muestra el grado de homología que existe entre estas secuencias primarias. Los símbolos corresponden a los datos estructurales de CsEv3. β= región β plegada, α= hélice α, ***= región altamente contorsionada. Los símbolos y números de la parte inferior corresponden a las cisteínas que se encuentran formando puentes disulfuro: 12 con 65, 16 con 41, 25 con 46 y 29 con 48.

diferentes grados de homología con el resto de los péptidos señal conocidos de toxinas de alacrán (Fig.# 6). Estos péptidos señal presentan una región que cumple con la regla (-3,-1) que nos permite predecir la posible región de corte del péptido señal (von Heijne 1986). Se puede observar que en todos los casos la posición -3 es ocupada por una valina mientras que en la posición -1 se encuentra un aminoácido pequeño.

La estructura de los cDNAs nos muestra que estos genes codifican para un precursor de toxinas y que el proceso de maduración de estos péptidos es el propuesto para otras toxinas de alacrán (Bougis *et al.*, 1989, Martin-Eauclaire *et al.*, 1992) y para péptidos neuroactivos (Fricker 1988): separación del péptido señal mediante una peptidasa señal y remoción de las dos lisinas del extremo carboxilo por una carboxipeptidasa específica para residuos básicos.

VI.2.-Expresión: en la Fig.# 7 se observa el resultado de la edición y clonación del gene *CngII*. El péptido señal no está presente y en cambio sí aparece una metionina inicial que no existía. Se puede ver que la orientación fue correcta, esto es que se encuentra en el sentido de *LacZ α* pues se puede leer la región final de *Mal E*, el polilinker y por último la región amino de *CngII*. La edición correcta del extremo carboxilo se comprobó mediante secuenciación de nucleótidos en una clona que presenta la orientación contraria pudiéndose observar que las dos lisinas fueron deletadas.

Los ensayos de expresión se pueden resumir en la Fig.# 8. Se observó claramente la aparición de una banda, después de la inducción, de aproximadamente 50,000 Da que es el tamaño esperado. En cuanto al tiempo de cosecha se observa que 3 1/2 h después de la inducción la concentración de proteína es máxima y no hay una degradación aparente de la proteína. Para determinar la cantidad óptima de inductor se probaron

	-20	-15	-10	-5	-1	Ref.
CngtII	M N S L L M I T A C L F L I G T - - V W A	1				
CngtIII	M N S L L M I T A C L V L F G T - - V W A	1				
CngtIV	M N S L L I I T A C L V L I G T - - V W A	1				
CngtV	M N S L L M I T A C L A L V G T - - V W A	1				
TsVII	M K G M I L F I S C L L L I G I - V V E C	2				
Cons. 1	M N S L L M I T A C L V L I G T - - V W A					
AaHI	M N Y L V M I S L A L - L L M I G - V E S	3				
AaHIII	M N Y L V M I S L A L - L L M I G - V E S	3				
AaHII	M N Y L V M I S L A L - L L M T G - V E S	3				
Lqh α IT	M N H L V M I S L A L - L L L T G - V E S	4				
Cons. 2	M N Y L V M I S L A L - L L M T G - V E S					
AaHIT	M K F L L L F L V V L P I M - - G - V L G	3				
AaHIT1	M K F L L L F L V V L P I M - - G - V F G	3				
AaHIT2	M K F L L L F L V V L P I M - - G - V L G	3				
BjIT2	M K L L L L V I S A S M L L E C L V N A	5				
Cons. 3	M K F L L L F L V V L P I M - - G - V L G					
Cons. 1-3	M N X L L M I X h X L X L h X X G h V X X K a M V L F h A I M T					

Fig.# 6 Comparación de los péptidos señal de toxinas de alcranes de diferentes géneros. En el primer grupo se encuentran las de alcranes de América. En el segundo grupo se encuentran toxinas contra mamíferos de alcranes del viejo mundo. Por último están las toxinas contra insectos de alcranes del viejo mundo. En cada caso se obtiene una secuencia consenso. Nótese la valina en posición -3 en todos los casos y en la posición -1 un residuo pequeño (Ala, Gli, Ser ó Cis). Referencias; 1: Becerril et al., (1993), 2: Martin-Eauclair et al., (1992), 3: Bougis et al., (1989), 4: Gurevitz et al., (1991) y 5: Zilberberg et al., (1991).

SECUENCIA NUCLEOTIDICA DE LA CLONA Cngt II / pMal C

```

          10          20          30          40
          |          |          |          |
TCG AGC TCG AAC AAC AAC AAC AAT AAC AAT AAC AAC AAC CTC GGG
mal E -----adaptor-----

          50          60          70          80          90
          |          |          |          |          |
ATC GAG GGA AGG ATG AAA GAA GGT TAT CTG GTA AAC AAG AGC ACG
----- M K E G Y L V N K S T

          100          110          120          130
          |          |          |          |          |
GGC TGC AAA TAC GGT TGC CTG CTA TTG GGG AAA AAC GAA GGC TGC
G C K Y G C L L G K N E G C

          140          150          160          170          180
          |          |          |          |          |
GAT AAG GAA TGC AAA GCG AAG AAC CAA GGA GGT AGT TAC GGC TAT
D K E C K A K N Q G G S Y G Y

          190          200
          |          |
TGC TAC GCT TTT GGG TGC TGG TGC
C Y A F G C W C
* residuo no. 48

```

Fig.# 7 Secuencia nucleotídica de la clona pMAL/CngtII. Los primeros dos codones corresponden a mal E, la región subrayada corresponde al polilinker de pMAL. Sigue la metionina que se insertó por medio de PCR y no se encuentra el péptido señal que fue deletado usando la misma técnica. La región que sigue corresponde a la toxina ya procesada.

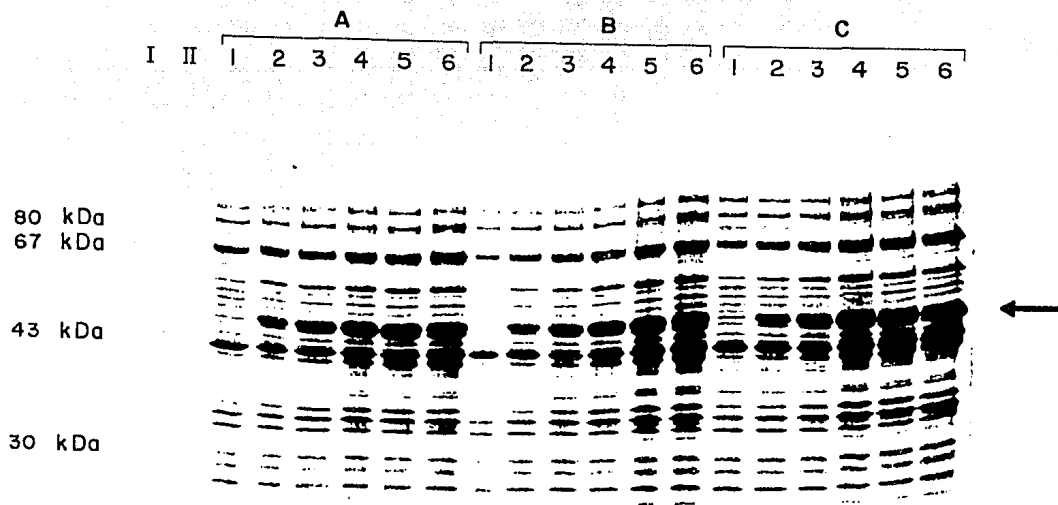


Fig.# 8 Gel de proteínas que muestra los resultados de los ensayos de expresión. En el carril I se muestra el marcador de peso molecular. En el carril II se muestra el perfil electroforético de la cepa sin transformar. Los tres grupos de carriles siguientes: A, B y C corresponden al perfil electroforético de diferentes ensayos en los que la variable fue el inductor (IPTG; 0.5, 0.7 y 1.0 mM, respectivamente). A su vez en cada uno de los ensayos se varía el tiempo de muestreo. Se tomaron alícuotas que corresponden a: 0.75 h., 1.5 h., 2.25 h., 3.25 h. y 4.25 h., que se muestran en los carriles 2 a 6, respectivamente. En los carriles 1, de los tres ensayos, se muestra la cepa sin inducir. La flecha marca la posición de la proteína de fusión.

varías concentraciones desde 0.1 mM hasta 1 mM, siendo 0.5 mM la concentración elegida dado, que no se vé un claro aumento en la concentración de la proteína cuando se induce con una cantidad mayor a 0.5 mM.

Aunque se observó una pequeña cantidad de proteína en la fracción insoluble la mayor parte de la proteína se encuentra en forma soluble. Pensamos que esto puede deberse a que la proteína está formando los puentes disulfuro adecuados y por lo tanto no quedan cisteínas libres para formar los enlaces intermoleculares que le permitan formar agregados. O bien que por encontrarse en un ambiente reductor, no se dé la formación de ningún puente disulfuro y por lo tanto tampoco haya agregados.

VII CONCLUSIONES

1.- Dado que las dos clonas obtenidas durante el desarrollo de esta tesis codifican para un péptido que presenta una alta homología con la toxina CsEv3 podemos afirmar que se cumplió el objetivo del trabajo: aislar un cDNA que codifique para una proteína semejante a CsEv3, a partir de un banco de cDNAs del alacrán *C. noxius* Hoffmann.

2.- Podemos decir que nuestro trabajo permite confirmar las propuestas sobre la existencia de un precursor y un procesamiento para maduración de estas toxinas. Sin embargo existen pequeñas diferencias. Mientras que en el trabajo de Bougis *et al* (1989) el procesamiento del extremo carboxilo se presenta sólo en las toxinas contra mamíferos, en nuestro caso, ambos genes muestran la región de procesamiento del extremo carboxilo y no son toxinas contra mamíferos. Esto ha quedado demostrado con la reciente secuenciación de la toxina correspondiente al gene *CngtII*, toxina Cn 5, por nuestro grupo (datos no publicados). Dicha toxina no presenta el péptido señal ni las dos lisinas del carboxilo terminal y no afecta a mamíferos (datos no publicados).

3.- Respecto a la expresión, aunque no tenemos la toxina caracterizada los resultados preliminares apuntan a que se está expresando. Si acaso no tuviera la estructuración de la toxina nativa se intentará renaturalización *in vitro* ó expresión en periplasma antes de cambiar a un sistema eucariote. Esto es porque un sistema procariote ofrece muchas ventajas para su cultivo y los rendimientos que se pueden lograr son muy altos. Sin

embargo, existen algunas toxinas en el veneno del alacrán que requieren un procesamiento que no se puede lograr en sistemas procariotes (α -amidación, además del corte de los residuos básicos) y para éstas el sistema de expresión deberá ser eucariote, en el caso de la toxina que trabajamos no es así.

VII REFERENCIAS

- 1.- Almassy R. J., Fontecilla-Camps J. C., Suddath F. L. and Bugg Ch. E. (1983). Structure of Variant-3 Scorpion Neurotoxin from *Centruroides sculpturatus* Ewing, Refined at 1.8 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* 170: 497-527.
- 2.- Babin D. R., Watt D. D., Goos S. M. and Mlejnek R. V. (1974). Amino Acid Sequences of Neurotoxic Protein Variants from the Venom of *Centruroides sculpturatus* Ewing. *Arch. Biochem. and Biophys* 164: 694-706.
- 3.- Becerril B., Vázquez A., García C., Corona M., Bolívar F. and Possani L. D. (1993). Cloning and Characterization of cDNAs that Code for Na⁺-channel-blocking Toxins of the Scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Gene* (en prensa).
- 4.- Blaustein M. F., Rogowski R. S., Schneider M. J. and Krueger B. K. (1991). Polypeptide Toxins from the Venom of the Old World and New World Scorpions Preferentially Block Different Potassium Channels. *Mol. Pharm.* 40: 932-942.
- 5.- Bontems F., Roumestand Ch., Boyot Ph., Gilquin B., Doljansky Y., Ménez A. and Toma F. (1991). Three-dimensional Structure of Natural Charybdotoxin in Aqueous Solution by H-NMR. *Eur. J. Biochem.* 196: 19-28.
- 6.- Bougis P. E., Rochat H. and Smith L. A. (1989). Precursors of *Androctonus australis* Scorpion Neurotoxins. *J. Biol. Chem.* 264: 19259-19265.
- 7.- Couraud F., Jover E., Dubois J. M. and Rochat H. (1982). Two Types of Scorpion Toxin Receptor Sites, One Related to the Activation, the Other to the Inactivation of the Action Potential Sodium Channel. *Toxicol.* 20: 9-16.
- 8.- Couraud F. and Jover E. (1984). Mechanism of Action of Scorpion Toxins. En: *Handbook of Natural Toxins*. 2: 659-673. Tu A. T. ed. Marcel Dekker, Inc., New York.
- 9.- Fontecilla-Camps J. C., Almassy R. J., Suddath F. L., Watt D. D. and Bugg Ch. E. (1980). Three-dimensional Structure of a Protein from Scorpion Venom: A New Structural Class of Neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 6496-6500.
- 10.- Fontecilla-Camps J. C. (1989). Three-Dimensional Model of the Insect-Directed Scorpion Toxin from *Androctonus australis* Hector and Its Implication for the Evolution of Scorpion Toxins in General. *J. Mol. Evol.* 29: 63-67.
- 11.- Fricker L. D. (1988). Carboxypeptidase E. *Ann. Rev. Physiol.* 50: 309-321.
- 12.- Gurevitz M., Urbach D., Zlotkin E. and Zilberberg N. (1991). Nucleotide Sequence and Structure Analysis of a cDNA Encoding an Alpha Insect Toxin from the Scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. *Toxicol.* 29: 1270-1272.

- 13.- Jover E., Couraud F. and Rochat H. (1980). Two Types of Scorpion Neurotoxins Characterized by Their Binding to Two Separate Receptor Sites on Rat Brain Synaptosomes. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 95: 1607- 1614.
- 14.- Keegan H. L. (1980). *Scorpions of Medical Importance*. University Press of Mississippi. USA. pp. 140.
- 15.- Loret E. P., Sampieri F., Roussel A., Granier C. and Rochat H. (1990). Conformational Flexibility of a Scorpion Toxin Active on Mammals and Insects: A Circular Dichroism Study. *Proteins* 8: 164-172.
- 16.- Martin-Eauclaire M. F., Céard B., Ribeiro A. M., Diniz C. R., Rochat H. and Bougis P. E. (1992). Molecular Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of a cDNA Encoding the Main β -Neurotoxin from the Venom of the South American Scorpion *Tityus serrulatus*. *FEBS.* 302: 220-222.
- 17.- Ménez A., Bontems F., Roumestand C., Gilquin B., and Toma F. (1992). Structural Basis for Functional Diversity of Animal Toxins. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*, 99B (1/2), 83-103.
- 18.- Meves H., Simard J. M. and Watt D. D. (1984). Biochemical and Electrophysiological Characteristics of Toxins Isolated from the Venom of the Scorpion *Centruroides sculpturatus*. *J. Physiol., Paris*,79: 185-191.
- 19.- Possani L. D., Dent M. A. R., Martin B. M., Maelicke A. and Svendsen I. (1981). The Amino Terminal Sequences of Several Toxins From the Venom of the Mexican Scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Carlsberg Res. Commun.* 46: 207-214.
- 20.- Possani L. D. (1984). Structure of Scorpion Toxins. En: *Handbook of Natural Toxins*. Vol. 2: 513-550. Tu A. T. ed. Marcel Dekker, Inc., New York.
- 21.- von Heijne G. (1980). A New Method for Predicting Signal Sequence Cleavage Sites. *Nucleic Acids Research.* 14: 4683-4690.
- 22.- Zamudio F., Saavedra R., Martin B. M., Gurrola-Briones G., Hérlion P. and Possani L. D. (1992). Amino Acid Sequence and Immunological Characterization with Monoclonal Antibodies of Two Toxins from the Venom of the Scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Eur. J. Biochem.* 204: 281-292.
- 23.- Zilberberg N., Zlotkin E. and Gurevitz M. (1991). The cDNA sequence of a Depressant Insect Selective Neurotoxin from the Scorpion *Buthotus judaicus*. *Toxicon.* 29: 1155-1158.
- 24.- Zlotkin E., Miranda F. and Rochat H. (1978). Chemistry and Pharmacology of *Buthinae* Scorpion Venoms. En: *Arthropod Venoms*. Vol. 48, chapter 13.C: 317-369. Bettini S. ed. Springer-Verlag, Berlin.