

03088

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE RECONOCIMIENTO MOLECULAR Y BIOESTRUCTURA**



**SINTESIS DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA NOXIUSTOXINA BLOQUEADORA
DE CANALES DE POTASIO Y GENERACION DE VARIANTES PARA
EL ESTUDIO DE LA RELACION ESTRUCTURA-FUNCION**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA
P R E S E N T A
EL M. EN C. FERNANDO MARTINEZ MORALES

MEXICO, D. F.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

Las toxinas de alacrán han permitido estudiar distintos canales iónicos presentes en las células. La especificidad de las toxinas está definida por residuos de aminoácidos, organizados alrededor de un motivo estructural conservado entre las toxinas de alacrán, tanto en toxinas de cadena larga como en toxinas de cadena corta. En el caso de las toxinas cortas, que afectan canales de potasio, la identificación de estos residuos ha permitido establecer cómo es la interacción de éstas con residuos de los canales de potasio, en la región del vestíbulo del poro y del poro propiamente dicho.


En el presente trabajo se analiza la relación estructura-función de la noxiustoxina (NTX) del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann, en su interacción con canales de potasio. Mediante el uso de técnicas de biología molecular, se sintetizó el gen de la NTX para ser expresado en un sistema de expresión heterólogo en *Escherichia coli*. La NTXr, como se le denominó a la forma recombinante de NTX, se expresó de manera funcional aunque no se encuentra amidada en el extremo carboxilo como la NTX nativa.

La NTXr presenta propiedades bioactivas similares a NTX en cuanto a su toxicidad, unión a sinaptosomas de cerebro de rata y bloqueo de canales de potasio Kv1.1, expresados en ovocitos de la rana *Xenopus laevis*.

La síntesis del gen NTXr permitió obtener mutantes sitio-dirigidas mediante PCR, y el empleo de oligonucleótidos específicos. La generación de variantes de NTXr permitió identificar residuos en las regiones amino terminal y carboxilo terminal que tienen un papel funcional en las propiedades de NTX en cuanto a su unión a canales de potasio en membranas de cerebro de rata y en el bloqueo de canales de potasio Kv1.1. Específicamente, se analizaron los residuos 1 a 9 de la región amino terminal, el residuo de lisina 28 y los tres últimos residuos de la porción carboxilo terminal.

El análisis de estos resultados, relacionados con la estructura tridimensional de NTX, permite proponer el papel funcional de los residuos identificados en este estudio, así como la propuesta de otras variantes de NTXr para identificar más residuos que pudiesen tener un papel funcional para NTX.

Vo. Bo.


Dr. Lourival D. Possani Postay

Summary

Scorpion toxins are excellent tools to study various cellular ion-channels. The specificity of both, large and short chain scorpion toxins, is defined by a particular three-dimensional arrangement of amino acid residues on a common and well-conserved structural motif. In the case of the short chain peptides that affect potassium (K^+) channel function; the identification of these residues permitted to establish the way by which these toxins interact with the K^+ channels, in the vestibule of the pore of the channel and the pore itself, where amino acid residues of the channel capable of interacting with the toxin were also identified.

This thesis reports the results of studies aimed at elucidating the structure-function relationship of Noxiustoxin (NTX) isolated from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann, with K^+ channels. By means of techniques of molecular biology, the gen coding for NTX was synthesized and expressed in a heterologous system, using *Escherichia coli*. The recombinant NTX (abbreviated NTXr) produced by *E. coli* was shown to be functional, although it does not contain an amidated C-terminal residue, as in the case for the native NTX. NTXr shows biological properties indistinguishable from those of native NTX, by way of three distinct assays: lethality test in mice, binding and displacement experiments to rat brain synaptosomal membranes, and blockade of the Kv1.1 K^+ channels expressed in oocytes of the frog *Xenopus laevis*.

The synthetic gen of NTX allowed the production of site-directed specific mutants, by means of the polymerase chain reaction technique (PCR) in conjunction with the use of specifically designed synthetic oligonucleotides. The various NTXr mutants obtained, permitted the identification of amino acid residues at the N- and C-terminal part of NTX, that play an important role in the functional properties of NTX, using both: the binding assays to rat brain synaptosomes and the blockade of the Kv1.1 K^+ channels, expressed in oocytes. Analysis of these results in relation with the three-dimensional structure of NTX, allowed the proposal of the functional role of certain amino acid residues identified in this study, as well as to propose the preparation of additional NTXr mutants, that might be functionally important.

Vo. Bo.


Dr. Lourival D. Possari Postay

**U.N.A.M.
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE RECONOCIMIENTO MOLECULAR Y BIOESTRUCTURA**

**SINTESIS DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA NOXIUSTOXINA
BLOQUEADORA DE CANALES DE POTASIO Y GENERACION DE
VARIANTES PARA EL ESTUDIO DE LA RELACION
ESTRUCTURA-FUNCION.**

M. en C. Fernando Martínez Morales

Esta tesis fue realizada en el laboratorio del Dr. Lourival Domingos Possani Postay, bajo la tutoría principal del Dr. Baltazar Becerril Luján y contó con la ayuda financiera de las siguientes entidades:

Howard Hughes Medical Institute, donativos No. 75191-527104 y 75197-527107;

Comunidad Europea (No. CI-CT94-0045); CONACyT (4734-N9406); y DGAPA-UNAM (IN 21199b), concedidos al laboratorio del Dr. L. Possani.

CONACyT Beca Crédito para estudios de Doctorado con No. de registro 87814

PADEP, UNAM con clave de proyecto No. 030317

COMITE TUTORAL

Dr. Baltazar Becerril Luján
Dr. Lourival D. Possani P.
Dr. Xavier Soberón M.
Dr. Arturo Liévano M.

JURADO DE EXAMEN

Presidente	Dr. Edmundo Calva Mercado
Secretario	Dr. Lourival Domingos Possani Postay
Vocal	Dr. Mario Calcagno Montans
Vocal	Dr. Luis Vaca Domínguez
Vocal	Dr. Eduardo Horjales Reboredo
Suplente	Dr. Federico Sánchez Rodríguez
Suplente	Dra. Ma. del Carmen Beltrán Nuñez

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio del Dr. Alberto Darszon por las facilidades otorgadas para la realización de los experimentos de electrofisiología. En particular al M. en C. Carlos Muñoz Garay.

Al M. en C. Timoteo Olamendi P. y al M. en C. Fernando Zamudio por la secuenciación de las proteínas de este trabajo.

Al dibujante Pedro Saucedo Ramírez y al fotógrafo Sergio Trujillo

Al M. en C. Eugenio López B. de la Unidad de Síntesis de Macromoléculas del IBT.

INDICE

	pág.
PRESENTACION	VII
RESUMEN	1
SUMMARY	2
LISTA DE ABREVIATURAS	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	4
INTRODUCCION	5
I TOXINAS DE ALACRANES	
II CANALES DE POTASIO	
III INTERACCION DE LAS TOXINAS DE ALACRAN CON CANALES DE POTASIO	
ANTECEDENTES	14
OBJETIVOS	16
MATERIAL Y METODOS	17
Síntesis, clonación y secuenciación del gene Xa-NTXr.....	17
Expresión e identificación del producto del gene p9-Xa-NTXr	18
Actividad de NTXr.....	19
a) Prueba de toxicidad de NTXr.....	19
b) Ensayos de desplazamiento de [¹²⁵ I]-NTX] de membranas sinaptosomales de cerebro de rata.....	19
c) Ensayos electrofisiológicos.....	19
Generación de variantes de NTXr.....	20
RESULTADOS	21
Diseño, síntesis, clonación y secuenciación del gene Xa-NTXr	21
Expresión e identificación del gene p9-Xa-NTXr.....	21
Actividad biológica de NTXr.....	33
a) Prueba de toxicidad de NTXr.....	33
b) Ensayos del desplazamiento de [¹²⁵ I]-NTX de membranas sinaptosomales de cerebro de ratón por parte de NTXr....	33
c) Ensayos electrofisiológicos.....	33
Generación de variantes de NTXr.....	35
Ensayos del desplazamiento de [¹²⁵ I]NTXr de membranas	

Ensayos electrofisiológicos de las variantes de NTXr.....	36
DISCUSION	40
CONCLUSIONES	59
PERSPECTIVAS	60
BIBLIOGRAFIA	61
ANEXOS	71

1.- ARTICULO PUBLICADO:

Martínez, F., Becerril, B., Gurrola, G. B., Martín, B.M., and Possani, L.P. 1996. SYNTHESIS AND EXPRESSION OF THE GENE CODING FOR NOXIUSTOXIN A K⁺ CHANNEL-BLOCKING PEPTIDE FROM THE VENOM OF THE SCORPION *CENTRUROIDES NOXIUS*. *Toxicon* **34: 1413-1419.**

- 2.- Condiciones de PCR para la síntesis por PCR recursiva del gene NTXr**
- 3.- Diseño de los oligonucleótidos para la generación de variantes de NTXr**
- 4.- Condiciones de PCR para generar variantes de NTXr**

PRESENTACION

El presente trabajo, aborda el análisis de la relación estructura-función de la noxiustoxina del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann. Este trabajo se divide en cuatro partes. En la primera parte, se introduce al tema de la interacción de las toxinas de alacrán con los canales iónicos, para enseguida exponer los Antecedentes, que sirvieron de base para proponer los Objetivos de este trabajo. La segunda parte es una serie Metodologías y de Resultados Experimentales, parte de ellos aún no son publicados, mientras que, se hace referencia de datos publicados, que son expuestos a manera de Anexo en la cuarta parte de este trabajo y, en donde participo como primer autor. En la tercera parte, se discuten y analizan los resultados y se presentan las Conclusiones y las Perspectivas derivadas de éstos.

RESUMEN

Las toxinas de alacrán han permitido estudiar distintos canales iónicos presentes en las células. La especificidad de las toxinas está definida por residuos de aminoácidos, organizados alrededor de un motivo estructural conservado entre las toxinas de alacrán, tanto en toxinas de cadena larga como en toxinas de cadena corta. En el caso de las toxinas cortas, que afectan canales de potasio, la identificación de estos residuos ha permitido establecer cómo es la interacción de éstas con residuos de los canales de potasio, en la región del vestíbulo del poro y del poro propiamente dicho.

En el presente trabajo se analiza la relación estructura-función de la noxiustoxina (NTX) del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann, en su interacción con canales de potasio. Mediante el uso de técnicas de biología molecular, se sintetizó el gen de la NTX para ser expresado en un sistema de expresión heterólogo en *Escherichia coli*. La NTXr, como se le denominó a la forma recombinante de NTX, se expresó de manera funcional aunque no se encuentra amidada en el extremo carboxilo como la NTX nativa.

La NTXr presenta propiedades bioactivas similares a NTX en cuanto a su toxicidad, unión a sinaptosomas de cerebro de rata y bloqueo de canales de potasio Kv1.1, expresados en ovocitos de la rana *Xenopus laevis*.

La síntesis del gen NTXr permitió obtener mutantes sitio-dirigidas mediante PCR, y el empleo de oligonucleótidos específicos. La generación de variantes de NTXr permitió identificar residuos en las regiones amino terminal y carboxilo terminal que tienen un papel funcional en las propiedades de NTX en cuanto a su unión a canales de potasio en membranas de cerebro de rata y en el bloqueo de canales de potasio Kv1.1. Específicamente, se analizaron los residuos 1 a 9 de la región amino terminal, el residuo de lisina 28 y los tres últimos residuos de la porción carboxilo terminal.

El análisis de estos resultados, relacionados con la estructura tridimensional de NTX, permite proponer el papel funcional de los residuos identificados en este estudio, así como la propuesta de otras variantes de NTXr para identificar más residuos que pudiesen tener un papel funcional para NTX.

Summary

Scorpion toxins are excellent tools to study various cellular ion-channels. The specificity of both, large and short chain scorpion toxins, is defined by a particular three-dimensional arrangement of amino acid residues on a common and well-conserved structural motif. In the case of the short chain peptides that affect potassium (K⁺) channel function; the identification of these residues permitted to establish the way by which these toxins interact with the K⁺-channels, in the vestibule of the pore of the channel and the pore itself, where amino acid residues of the channel capable of interacting with the toxin were also identified.

This thesis reports the results of studies aimed at elucidating the structure-function relationship of Noxiustoxin (NTX) isolated from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann, with K⁺-channels. By means of techniques of molecular biology, the gen coding for NTX was synthesized and expressed in a heterologous system, using *Escherichia coli*. The recombinant NTX (abbreviated NTXr) produced by *E. coli* was shown to be functional, although it does not contain an amidated C-terminal residue, as in the case for the native NTX. NTXr shows biological properties indistinguishable from those of native NTX, by way of three distinct assays: lethality test in mice, binding and displacement experiments to rat brain synaptosomal membranes, and blockade of the Kv1.1 K⁺-channels expressed in oocytes of the frog *Xenopus laevis*.

The synthetic gen of NTX allowed the production of site-directed specific mutants, by means of the polymerase chain reaction technique (PCR) in conjunction with the use of specifically designed synthetic oligonucleotides. The various NTXr mutants obtained, permitted the identification of amino acid residues at the N- and C-terminal part of NTX, that play an important role in the functional properties of NTX, using both: the binding assays to rat brain synaptosomes and the blockade of the Kv1.1 K⁺-channels, expressed in oocytes.

Analysis of these results in relation with the three-dimensional structure of NTX, allowed the proposal of the functional role of certain amino acid residues identified in this study, as well as to propose the preparation of additional NTXr mutants, that might be functionally important.

LISTA DE ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO

AgTX2	Agitoxina 2
ChTX	Caribdotoxina
KTX	Kaliotoxina
Lq2	Leiurottoxina 2
MgTX	Margattoxina
NTX	Noxiustoxina
NTXr	Noxiustoxina recombinante
PI	Toxina de <i>Pandinus imperator</i> 1
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Ap	Ampicilina
Cb	Carbenicilina
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Presión
TFA	Acido Trifluoroacético
IPTG	Isopropil β -D-Tiogalactopiranosido
β -ME	β Mercapto-etanol
ADN	Acido desoxirribonucleico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
dNTP's	Desoxinucleótidos (Adenina, Guanina, Citosina, Timina)
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
PAGE	Electroforésis en Gel de Poliacrilamida
PCB	PROTEIN DATA BANK (Banco de Datos de Proteínas)
LB	Medio de Luria Bertani
min	minuto(s)
rpm	revoluciones por minuto
CNBr	Bromuro de cianógeno
IC ₅₀	Concentración Inhibitoria media
[¹²⁵ I]-NTX	NTX marcada radioactivamente con Iodo ¹²⁵
A	Absorbancia
Å	Ángström
nm	nanómetros

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

- Figura 1.- Comparación de toxinas cortas que bloquean canales de potasio**
- Figura 2.- Estructura tridimensional de una toxina corta de alacrán**
- Figura 3.- Morfología de la subunidad α de los canales de potasio**
- Figura 4.- Interacción de las toxinas de alacrán con los canales de potasio**
- Figura 5.- PCR recursivo**
- Figura 6.- Síntesis del fragmento de ADN de NTXr**
- Figura 7.- Clonación del fragmento de NTXr**
- Figura 8.- Identificación de clonas positivas**
- Figura 9.- Inducción de la proteína p9-Xa-NTXr**
- Figura 10.- Purificación de la proteína p9-Xa-NTXr**
- Figura 11.- HPLC de la digestión enzimática de p9-Xa-NTXr**
- Figura 12.- Reconocimiento de NTXr por anticuerpos policlonales**
- Figura 13.- Purificación por intercambio iónico de NTXr**
- Figura 14.- Bloqueo de canales de potasio Kv 1.1 por NTXr**
- Figura 15.- Ensayo de unión a sinaptosomas por las variantes de NTXr**
- Figura 16.- Bloqueo de canales de potasio Kv 1.1 por las variantes de NTXr**
- Figura 17.- Residuos de aminoácidos en el vestíbulo del poro de Kv_v1.1**
- Figura 18.- Modelos estructurales de algunas toxinas cortas de alacrán**
- Figura 19.- Residuos identificados como importantes en la NTX**
- Figura 20.- Región amino terminal de NTX**
- Figura 21.- Modelo hipotético de interacción de NTX con el canal de potasio**
- Figura 22.- Estructura tridimensional de BgK**
- Tabla 1.- Composición de aminoácidos de NTXr**
- Tabla 2.- Generación de mutantes de NTX por mutagénesis dirigida**

INTRODUCCION

El análisis de la relación estructura-función de las moléculas permite hacer inferencias mecanísticas que expliquen las propiedades físicas y biológicas de éstas, así como la proposición de hipótesis que permitan explicar el papel funcional de regiones específicas de las mismas.

I

TOXINAS DE ALACRAN

En nuestro grupo se estudia la relación estructura-función de los componentes activos del veneno de los alacranes. Estos componentes activos pueden ser enzimas o toxinas con actividades biológicas diversas.

Entre las toxinas que constituyen el veneno de los alacranes, se encuentran aquellas que afectan a los canales de sodio, potasio, calcio y cloruro. Su especificidad es variable así como su modo de acción, por lo que se han caracterizado toxinas que afectan a canales iónicos de diversos organismos, así como de distintos tejidos (Adams *et al.*, 1993; Cai y Douglass, 1993). La purificación y caracterización de las toxinas de alacranes por diferentes grupos, ha revelado que se puede distinguir entre toxinas de cadena larga, de 60 a 70 residuos, y toxinas de cadena corta, de 31 a 39 residuos de aminoácidos. Entre las toxinas de cadena corta se encuentran aquellas que afectan a los canales de potasio. Estas toxinas constituyen una familia de péptidos homólogos de carácter básico, pudiéndose encontrar en el mismo veneno más de una isoforma (García-Calvo *et al.*, 1993; Nieto *et al.*, 1996; Olamendi-Portugal *et al.*, 1996). La diversidad de las toxinas de potasio refleja a su vez la diversidad de los canales, lo que ha permitido identificar y caracterizar clases específicas de canales. (Adams *et al.*, 1993; García-Calvo *et al.*, 1993; Knaus *et al.*, 1995).

Los péptidos que afectan a los canales de potasio tienen de 31 a 39 residuos de aminoácidos (Miller, 1995). En la Figura 1 se presenta una comparación de algunas toxinas cortas, basada en la homología de su estructura primaria. Entre las toxinas de distintas especies de alacrán y de defensinas de insectos (péptidos antibacterianos presentes en la hemolinfa) se encuentra conservado un grupo de cisteínas, en una

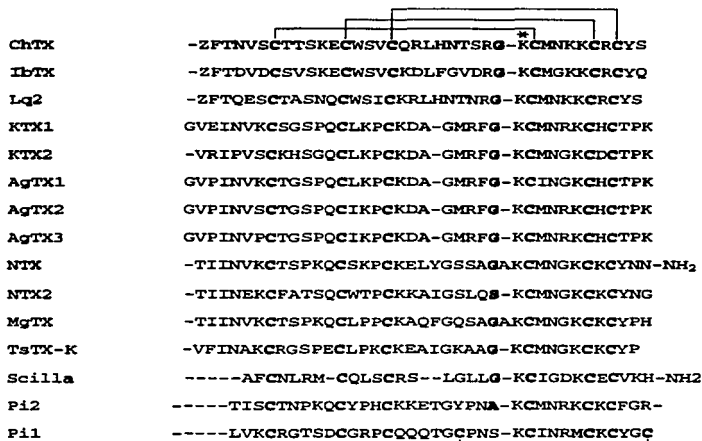


Fig.1 Comparación de las secuencias de aminoácidos de algunas toxinas cortas de alacrán. Los residuos conservados se indican en negritas. Las líneas que conectan los distintos residuos de cisteínas indican puentes disulfuros. El cuarto puente disulfuro determinado para P11 se indica explícitamente sobre su secuencia. Z=piroglutamato; NH₂=Amidación.

disposición definida por -C-[...]-C-aa-aa-aa-C[...]-G.C-[...]-C-aa-C-[...], las cuales forman los tres puentes disulfuro característicos de estas toxinas; **aa** representa residuos de aminoácidos cuyo número puede ser variable en esta región; además también se observa la conservación de una glicina, exceptuando en NTX2 y Pi2, (Bontems *et al.*, 1991).

Actualmente se han determinado las estructuras tridimensionales completas de distintas toxinas bloqueadoras de canales de potasio (Bontems *et al.*, 1992; Johnson y Sugg, 1992; Fernández *et al.*, 1994; Krezel *et al.*, 1995; Dauplais *et al.*, 1995; Delepierre *et al.*, 1997). En general, estos péptidos comparten un plegamiento común, definida por una hélice alfa corta y dos ó tres hebras beta, que forman una hoja de beta-antiparalela. En la Figura 2 se muestra la estructura de NTX, en donde se pueden observar la α -hélice y tres hebras de estructura β -antiparalela. La estructura tridimensional está estabilizada por tres puentes disulfuro, los cuales también están conservados en todas las toxinas de canales de potasio y que, junto a otros aminoácidos, constituyen un núcleo compacto (Bontems, *et al.*, 1991; Fernández *et al.*, 1994; Vita *et al.*, 1995). Durante el desarrollo de esta tesis, se describieron por vez primera toxinas cortas de alacrán con cuatro puentes disulfuro (Olamendi-Portugal *et al.*, 1996; Gómez-Lagunas *et al.*, 1996; Delepierre *et al.*, 1997), ver Figura 1.

Además del impacto que la picadura del alacrán representa, como problema de salud en las regiones donde las especies de alacrán cohabitan con el hombre, actualmente los usos potenciales de estas proteínas incluyen: su utilización como antiarrítmico, inmunodepresor, para el tratamiento de las enfermedades asociadas con la deficiencia de canales de potasio, y como herramientas en modelos de ingeniería de proteínas y caracterización funcional y estructural de los canales de potasio (Bouhaoula-Zahar *et al.*, 1996, Zinn-Justin *et al.*, 1996, Vita *et al.*, 1995).

II

CANALES DE POTASIO

Los canales de potasio son proteínas integrales de membrana y están presentes en casi todas las células eucariotas. En los tejidos excitables, regulan el ritmo cardiaco, los potenciales de acción y la liberación de neurotransmisores; en las células no excitables juegan papel



Figura 2 Estructura tridimensional de NTX. La estructura se basa en las coordenadas generadas por NMR por Dauplais *et al.*, 1995. NTX es una proteína básica, globular de 37 residuos de aminoácidos, amidada en su extremo carboxilo y está estabilizada por tres puentes disulfuro (líneas amarillas). Los elementos de estructura secundaria, son una helice corta (azul) y una hoja β plegada (rojo). N y C indican los extremos amino terminal y carboxilo terminal.

importantes en la secreción de hormonas, la proliferación celular, la regulación del volumen celular y en procesos como la fecundación (Latorre 1986; Leonard *et al.*, 1992; Heinemann *et al.*, 1995; Hille, 1992). Estas proteínas constituyen una familia homóloga, cuya distribución en los tejidos y células es variable; pueden ser divididas en diferentes categorías basadas en sus propiedades biofísicas y farmacológicas. Así, se pueden distinguir dos clases amplias de canales de potasio con base a los estímulos que causan su apertura: canales dependientes de voltaje y canales dependientes de ligandos.

Estructuralmente, los canales de potasio dependientes de voltaje se organizan en la membrana como tetrámeros. Cada monómero, denominado subunidad α , tiene seis hélices transmembranales, denominadas S1 a S6, las cuales están conectadas entre sí por asas de longitud variable que pueden encontrarse orientadas hacia la parte extracelular o intracelular (ver Figura 3a). Se sabe además que algunos elementos transmembranales de los canales son importantes en las propiedades de apertura y cierre del canal; pueden, además, estar glicosiladas y tener subunidades (β) accesorias (García-Calvo *et al.*, 1994; Adelman, 1995). Presentan una región conservada denominada Poro (P), formada por el asa, denominada H5 ó SS5-SS6, que une las regiones transmembranales S5 y S6 en la región extracelular. El poro es el responsable directo de la selectividad de los iones potasio y es a través del que se transportan los iones al interior de la célula (Heginbotham y McKinnon, 1992; McKinnon, 1995; Aiyar *et al.*, 1996).

La estructura tridimensional de la región del poro no se conoce, aunque hay evidencias indirectas de ésta y existen distintas propuestas acerca de su posible estructura (Hidalgo y McKinnon, 1995; Lipkind *et al.*, 1995; Lü y Millar, 1995; Soman *et al.*, 1995). Sin embargo, se puede decir que la región del poro está delimitada por cuatro asas, provenientes cada una de las cuatro subunidades (Figura 3b). Las cuatro asas forman un espacio denominado vestíbulo del poro. En el centro de este vestíbulo se sitúa un poro acuoso, por el que atraviesan los iones hacia y desde el interior de la célula (McKinnon, 1995).

A falta de la evidencia directa de la estructura tridimensional de los canales de potasio, el empleo de técnicas electrofisiológicas y de biología molecular, para estudiar los canales de potasio, ha permitido obtener un

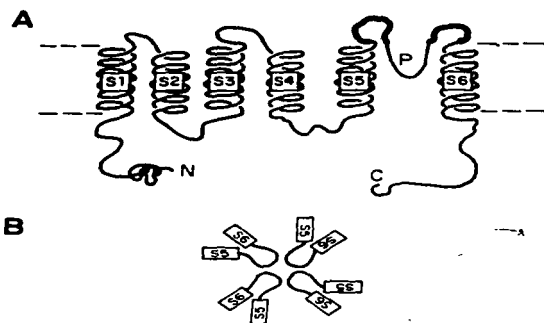


Figura 3 Morfología de la subunidad α de un canal de potasio. A Los segmentos transmembranales se indican como S1-S6. La parte del asa H5 que es responsable de formar el poro de selectividad a los iones potasio se indica como P. Las porciones amino y carboxilo terminales son citoplásmicas. B La asociación de cuatro subunidades α constituyen un canal de potasio funcional, en donde las asas H5 de cada subunidad contribuye para formar el vestíbulo y el poro del canal. Tomado de Miller, 1991 (A) y Ranganathan *et al.*, 1996 (B).

esquema tentativo de la estructura de la región del poro y, en algunos casos, se han podido identificar los residuos importantes en su selectividad hacia los iones. Adicionalmente, el empleo de bloqueadores específicos como el tetraetilamonio, las toxinas de alacrán, y las toxinas de otros organismos, han permitido contribuir a definir las posiciones relativas de estos residuos dentro del esquema estructural de la región del poro del canal (Sun *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1995; Hidaigo y McKinnon, 1995; Aiyar *et al.*, 1996; Ranganathan *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 1997).

III

INTERACCION DE LAS TOXINAS DE ALACRAN CON LOS CANALES DE POTASIO

El conocimiento de las toxinas que modifican la actividad de algunos canales de potasio se inició en la década de los ochenta, con la caracterización de la Noxiustoxina (NTX) aislada del veneno del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann, y de la Caribdotoxina (ChTX) proveniente del alacrán *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* (Possani *et al.*, 1982; Carbone *et al.*, 1982; Miller *et al.*, 1985). Estas proteínas resultaron ser adecuadas para realizar un análisis mecanístico del funcionamiento, y de las dimensiones relativas del vestíbulo del poro de los canales de potasio. Posteriormente, se caracterizaron otras toxinas que también afectan a canales de potasio y que son producidas por otros organismos. La heterogenidad de las toxinas de alacrán ha permitido aislar y caracterizar distintos canales de potasio (Bontems *et al.*, 1992; García *et al.*, 1994; Giangiacomo *et al.*, 1992; Gómez *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1991).

Actualmente se han estudiado extensivamente la ChTX y la agitoxina2 (AgTX2), proveniente del veneno del alacrán *L. quinquestriatus quinquestriatus*, tanto en su estructura como en su interacción con el canal de potasio tipo *Shaker* (Bontems *et al.*, 1992; Stampe *et al.*, 1994; Hidaigo y McKinnon, 1995; Krezel *et al.*, 1995).

La unión de las toxinas de alacrán, con los canales de potasio, modifica las propiedades de estos últimos para conducir al ion potasio. El mecanismo propuesto actualmente para explicar el bloqueo, es que hay una

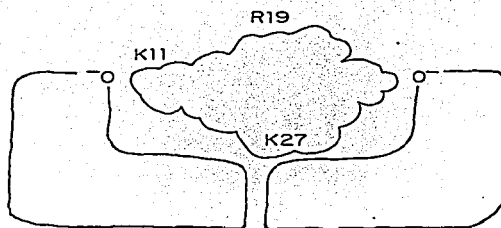


Figura 4 Interacción de una toxina bloqueadora de canal de potasio. La figura muestra un corte transversal, de la región del vestíbulo del poro de un canal de potasio interaccionando con la ChTX. Se propone que un residuo conservado de lisina bloquea el transporte a través del poro del canal (Park y Miller, 1992).

oclusión física de la región del poro por parte de la toxina. La interacción presenta una estequiometría 1:1 (Giangiacomo *et al.*, 1992; Goldstein y Miller, 1993). Existen evidencias de que las cuatro subunidades de un canal de potasio, contribuyen con elementos que interaccionan con las toxinas (Tytgat *et al.*, 1995).

En la interacción toxina-canal, algunos de los aminoácidos de la toxina que se encuentran en la región de la hoja β plegada ayudan a estabilizar la unión de la toxina con la región del poro (Krezel *et al.*, 1995) (ver Figura 4). Sin embargo, la contribución energética en la estabilización de la unión, por parte de estos aminoácidos, es distinta, pudiéndose distinguir entre aquellos aminoácidos que son relevantes y cruciales, así como irrelevantes, en la unión de estas toxinas con la región del poro (Stampe *et al.*, 1994).

Una vez que se une la toxina en la región del vestíbulo del canal, la presencia de residuos específicos mantienen a la toxina unida al canal, mientras que un residuo conservado de lisina en la posición 27 (para el caso de ChTX y de la AgTX), penetra en el poro y bloquea la conducción del ion potasio (Krezel *et al.*, 1995).

En la caracterización de las diferentes fuerzas que mantienen unida a ChTX y AgTX2 al canal de potasio tipo *Shaker*, se han descrito fuerzas electrostáticas, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de van der Waals (Park y Miller 1992; Naini y Miller, 1996; Naranjo y Miller, 1996; Stampe *et al.*, 1994; Stocker y Miller, 1994). También se ha caracterizado, termodinámicamente, la magnitud de las fuerzas de interacción en la interfase del canal con la toxina, que demuestran que es un grupo de residuos específicos los que tienen una interacción directa con ciertos residuos de aminoácidos, sobre la región del vestíbulo del poro del canal de potasio (Hidalgo y McKinnon, 1995; Aiyar *et al.*, 1996).

El conocimiento de las toxinas que bloquean a los canales de potasio, su especificidad, y su mecanismo de interacción, ha permitido conocer la distribución de estos canales y su papel en la fisiología celular.

ANTECEDENTES

En el presente trabajo se aborda el estudio de la relación estructura- función de la Noxiustoxina (NTX) aislada del veneno del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann que afecta a canales de potasio.

En el laboratorio del Dr. Possani se estudia la composición y actividad del veneno de distintos alacranes. La caracterización de estos venenos ha demostrado la presencia de sales, componentes proteicos con actividad enzimática, y aquéllos con propiedades bloqueadoras o modificadoras de la actividad de diversos canales iónicos.

La NTX fue caracterizada por Possani *et al.* (1982) y Carbone *et al.* (1982), como la primera toxina de alacrán bloqueadora de canales de potasio.

En nuestro grupo, los esfuerzos encaminados a caracterizar las regiones de la NTX que interaccionan con los canales de potasio, incluyen la caracterización bioquímica y estructural de la noxiustoxina, así como la síntesis química de NTX y de péptidos que abarcan distintas porciones de la NTX, y el ensayo de la actividad de estos péptidos en canales de potasio (Drakopoulou; *et al.*, 1995; Dauplais *et al.*, 1995; Gurrola *et al.*, 1989 y 1995). Con el empleo de péptidos, Gurrola y Possani (1995) presentan evidencias de que la porción N-terminal de la noxiustoxina es importante en su interacción con canales de potasio y que la porción carboxilo terminal no tiene relevancia en la actividad de la misma.

Los datos de Gurrola *et al.* (1989); Vaca *et al.* (1993) y Gurrola y Possani (1995), muestran que péptidos sintéticos de diferente longitud, que comprenden la región amino terminal, conservan elementos con actividad tóxica, de bloqueo de canales de potasio, y de desplazamiento de [¹²⁵I]-NTX de membranas sinaptosomales de cerebro de rata. Así, la secuencia mínima requerida para observar el bloqueo es aquella que comprende los residuos 1-6, y que la actividad aumenta conforme la secuencia se alarga de 1-10, y de 1-20; mientras que un péptido de NTX, que comprende la posición 30-39, no es capaz de desplazar [¹²⁵I]-NTX aún a concentraciones de 100 µM.

Por otra parte, en este mismo trabajo, se ensayó la actividad de desplazamiento de NTX nativa digerida con dos endoproteinasas por separado: La endoproteinasa V8 corta en el residuo del ácido glutámico 19,

y la endoproteinasa Lys-C permite eliminar los primeros seis residuos de la secuencia de NTX. Los resultados sugieren que, al cortar en la posición 19, disminuye la capacidad de desplazamiento de NTX. Por otra parte, el corte con Lys-C demuestra que la secuencia 1-6 puede participar en la capacidad de desplazamiento de NTX. La digestión con CNBr provoca un corte en la metionina 30 y no se observa modificación en la capacidad de desplazamiento de esta forma de NTX.

Los resultados anteriores, en su conjunto, y otros con péptidos de ChTX, llevaron a la proposición de que en la porción N-terminal y, la porción de hélice de NTX, existen elementos estructurales y de aminoácidos implicados en la capacidad de NTX de unirse a los canales de potasio presentes en las fracciones sinaptosomales de cerebro de rata, y a canales de potasio en experimentos de fijación de voltaje, mientras que la porción 30-39 del carboxilo terminal de NTX no participaría de manera importante con esta unión.

Este trabajo aborda la caracterización de la NTX, empleando herramientas de biología molecular y técnicas electrofisiológicas, para realizar un estudio detallado de la participación de residuos de aminoácidos en las porciones amino y carboxilo terminales.

OBJETIVO GENERAL

En el presente proyecto se propuso: diseñar, sintetizar, clonar y expresar un gen sintético de la Noxiustoxina (NTX), empleando un sistema de expresión heterólogo en *Escherichia coli*, con la finalidad de realizar estudios de la relación estructura-función de esta proteína.

OBJETIVOS PARTICULARES

Para abordar nuestro estudio, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- 1.0 Diseñar y sintetizar el gen de NTX mediante el empleo de oligonucleótidos específicos y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- 1.1 Clonar y expresar el gen de NTX en *Escherichia coli*.
- 1.2 Demostrar la actividad biológica de esta NTX recombinante, mediante los siguientes ensayos:
 - i Toxicidad en ratones
 - ii Desplazamiento de [¹²⁵I]-NTX de membranas sinaptosomales de rata
 - iii Bloqueo de canales de potasio Kv 1.1
- 2.0 Generación de variantes sencillas de NTX por mutagénesis sitio-específica.
- 2.1 Ensayo de la actividad biológica de cada una de las variantes en el sistema de membranas sinaptosomales de cerebro de rata, y propiedades de bloqueo de canales de potasio.
- 3.0 Análisis de la relación estructura-función de NTX.

MATERIAL Y METODOS

Para los experimentos de PCR se empleó la Vent® polimerasa, en las condiciones de reacción indicadas por Podromou y Pearl (1992)(Ver Anexo).

Las proteasas y enzimas de restricción y ligación empleadas, fueron utilizadas de acuerdo a las especificaciones de Boehringer-Mannheim.

En los experimentos de secuenciación, se empleó el método de Sanger, utilizando el estuche de secuencia de la SEQUENASA® de U.S. Biochemicals, (Cleveland, OH, U.S.A).

Los oligonucleótidos fueron sintetizados en el sistema de síntesis de ácidos nucleicos Modelo 8905 de PerSeptive Biosystems Expedite, que emplea condiciones estándares de cianocetil-fosoramidito.

Para la determinación del peso molecular de la NTXr, se empleó la técnica de espectroscopía de masas.

En los experimentos de HPLC, se usaron columnas semipreparativas y/o analíticas de fase reversa C₁₈ (Vydac, Hesperia, CA., U.S.A.).

Diseño, síntesis, clonación y secuenciación del gen Xa-NTXr. Con base a la secuencia primaria de NTX y con el uso del programa traducción reversa (backtranslate) del paquete de "software" (Genetics Computer Group, GCG) de la Universidad de Wisconsin (Madison, WI, U.S.A.) de análisis de secuencias, se obtuvo la secuencia nucleotídica del segmento de ADN que codifica para esta proteína. Se consideró el uso más probable de codones de *E. coli.*, a la cual se le agregaron las secuencias adaptadoras, para permitir una manipulación posterior. A esta secuencia, que se muestra en la Figura 2 del artículo publicado, se le denominó Xa-NTXr (ver Anexo 1, Martínez *et al.*, 1996), donde Xa codifica para el sitio de reconocimiento de la proteasa Xa definido por la secuencia:

-Ile-Glu-Gly-Arg-Δ

la cual sirve como sitio de corte para el procesamiento de proteínas recombinantes de fusión (Nagai y Thogersen, 1984). El triángulo indica el sitio de corte.

A partir de la secuencia anterior, se sintetizaron seis oligonucleótidos que comprendían la secuencia de Xa-NTXr. La secuencia de estos oligonucleótidos se indica en la Figura 1 del Anexo 1.

El gen Xa-NTXr se sintetizó a partir de seis oligonucleótidos que se emplearon en la PCR recurrente para generar el gen completo, junto con las secuencias de corte para el factor Xa y las enzimas de restricción *Sal I* y *Hind III*.

Para clonar el gen Xa-NTXr, este se digirió con las enzimas *Sal I* y *Hind III* para ser ligado con el vector PCSP105, el cual fue amablemente donado por C. Miller (Brandeis, University). La construcción se transformó en células de *E. coli* DH5α.

La selección de clones con el vector y el inserto de NTXr se realizó por PCR; a partir de una muestra de 1 μL de cultivo líquido LB (cuatro horas a 37 °C y 250 rpm) de cada clona seleccionada después de la transformación. Se emplearon los oligonucleótidos #1 y #8 para reamplificar el fragmento NTXr. Una clona se consideraba positiva cuando la intensidad de la banda de PCR fuese igual a la generada por el fragmento PCR de NTXr, que se obtuvo de la PCR recursiva.

De las clones que resultaron positivas se preparó plásmido por la técnica de lisis alcalina (Maniatis *et al.*, 1982), para determinar la secuencia nucleotídica de ambas cadenas.

Expresión e identificación del gen p9-Xa-NTXr. En el sistema de expresión que se usó, el gen NTXr se expresa como proteína de fusión a la que se denominó, p9-Xa-NTXr, donde p9 es la proteína 9 del fago T7. En la expresión se empleó la cepa de *E. coli* BL21 (DE3), la cual fue transformada con el plásmido pCSP106. La inducción y la purificación se efectuó como se indica en Park *et al.* (1991).

Identificación de la proteína. Después de la expresión y purificación del producto del gen p9-Xa-NTXr, se procedió a dializar la fracción correspondiente en las condiciones reportadas para llevar a cabo el plegamiento de NTXr. Posteriormente, se digirió con tripsina o con el factor Xa para separar a NTXr de la proteína acarreadora en las condiciones que indica Park *et al.* (1991).

Una muestra de la digestión triptica o con el factor Xa se pasó a través de una columna de HPLC C₁₈ semipreparativa de fase reversa, aplicando un gradiente de acetonitrilo de 0-80%. Se aislaron las fracciones alrededor del tiempo de retención que se conoce en nuestro laboratorio para la NTX nativa (27-28 minutos).

Los picos resultantes se identificaron mediante un ensayo de ELISA, empleando anticuerpos policlonales anti-NTX generados en este laboratorio.

Estructura primaria y composición de aminoácidos de NTXr. A los picos que se identificaron por HPLC y por reconocimiento de los anticuerpos policlonales, se les determinó su estructura primaria por el método automatizado de Edman. La composición de aminoácidos se efectuó por hidrólisis ácida en condiciones reductoras a 120 °C.

Para la purificación preparativa de NTXr, se empleó una columna de intercambio iónico CMC 32 equilibrada con fosfato de sodio 50 mM y pH 6.0 y se cargaron 70 mg de la digestión triptica, para aplicar un gradiente salino de 0 a 0.3 M de NaCl.

Para separar el exceso de NaCl en la muestra, se cargo la fracción de NTXr en una columna de Biogel G-10 equilibrada con una solución de ácido acético 10%. Las muestras de NTXr se pasaron posteriormente por una columna analítica de HPLC C-18 de fase reversa, empleando un gradiente de 0-60 % de acetonitrilo. Las muestras de NTXr así purificadas se cuantificaron por su absorción a 280 nm, considerando el coeficiente de extinción de 1.14 de la NTX nativa, y finalmente se guardaron secas a -20 °C.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE NTXr

Prueba de toxicidad de NTXr. Para verificar la capacidad tóxica de NTXr, se inyectaron ratones machos CD1 por vía intraperitoneal con distintas concentraciones NTX.

Ensayos de desplazamiento de [125I]-NTX de membranas sinaptosomales de cerebro de rata (fracción P₃). La toxina nativa (2µg) NTX se marcó radioactivamente con [125I] por el método de la lactoperoxidasa, como describe Valdivia *et al.*, (1992). Cada concentración se ensayó por duplicado y los resultados son el promedio de tres experimentos independientes.

Ensayos electrofisiológicos. Se empleó la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos, para medir el efecto de las isoformas de NTX sobre las corrientes de potasio. Se emplearon ovocitos de rana *X. laevis* a

los cuales se les inyectó 10 ng/célula de ARNm, que codifica para el canal de potasio subtipo Kv1.1, según el protocolo de Ferrer-Montiel y Montal (1994), quién donó amablemente la clona que codifica para el canal K_v1.1.

El experimento consistió en medir la corriente de los canales K_v1.1 expresados en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de las toxinas. Para esto se fijó el voltaje del ovocito a -80 mV y se aplicaron tres pulsos depolarizantes a 0, 15 y 30 mV durante -50 ms, para abrir los canales de potasio, y se registró la corriente, posteriormente se agregó la toxina a la concentración deseada, se dejó incubar por tres minutos y se repitió el protocolo depolarizante. La toxina unida, fue lavada del ovocito pasando 40 ml de solución sobre la cámara de registro la cual tiene un volumen de 500 µl, se indujeron de nuevo las corrientes de potasio mediante el protocolo, con la finalidad de ver la recuperación de la corriente.

Los experimentos electrofisiológicos fueron llevados a cabo en el laboratorio del Dr. Alberto Darzon, por el M. en C. R. Carlos Muñoz Garay, a quienes se les agradece su contribución a este trabajo.

Generación de variantes de NTXr. El gen NTXr se empleó para efectuar sobre éste mutaciones sitio-específicas, mediante PCR y empleando los oligonucleótidos mutagénicos que se enlistan en el Anexo.

En el caso de las mutantes en la lisina 28, se sintetizaron mediante PCR recurrente, empleando los mismos oligonucleótidos indicados en la Figura 1 de Materiales y Métodos del artículo publicado, con excepción del oligonucleótido número tres que es el que lleva la mutación. La clonación, secuenciación, expresión, y purificación de cada una de las mutantes se realizó de manera semejante como se determinó para el gen Xa-NTXr.

Los ensayos de desplazamiento en las membranas sinaptosomales y de bloqueo de canales de potasio Kv1.1, en ovocitos por parte de las variantes, se llevaron a cabo en las mismas condiciones que para la NTXr.

Modelo tridimensional de NTX. Se empleó el programa INSIGHT II para generar las estructuras de NTX (Dauplais *et al.*, 1995), ChTX (Bontems *et al.*, 1992), MgTX (Johnson *et al.*, 1994) y AgTX2 (Krezel *et al.*, 1995) a partir de sus coordenadas de NMR determinadas y depositadas en el Protein Data Bank (PDB).

RESULTADOS

Diseño, síntesis, clonación y secuenciación del gen Xa-NTXr

Actualmente no se conoce la secuencia codificante del gen de la Noxiustoxina; sin embargo se conoce la secuencia primaria de la proteína de NTX la cual tiene 39 residuos de aminoácidos, (Possani *et al.*, 1982).

Mediante la técnica de PCR recursiva se amplificó un producto del peso molecular esperado, como se indica en las Figuras 5 y 6, el cual fue purificado para ser digerido con las enzimas de restricción *Sal*I y *Hind* III y ligado con el vector PCSP105. El vector también fue digerido con las mismas enzimas de restricción. Ambos fueron ligados entre sí para generar el plásmido PCSP106 como se indica en la Figura 7.

El plásmido PCSP106 se usó para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α . Se obtuvieron cincuenta clones; se seleccionaron cinco para confirmar por PCR las cuáles tenían el inserto del fragmento NTXr (ver Figura 8). De las clones positivas se aisló una para determinar su secuencia nucleotídica, la cual resultó ser la secuencia que codifica para el segmento Xa-NTXr (ver la Figura 7). La secuencia nucleotídica se verificó en ambas cadenas.

Expresión e identificación del gen p9-Xa-NTXr

El gen Xa-NTXr es expresado como proteína de fusión, p9-Xa-NTXr, cuando el plásmido pPCSP106 se introduce en la cepa de *E. coli* BL21(DE3). La producción de la proteína de fusión se induce con IPTG 0.5 mM. La inducción de la proteína de fusión tanto de NTXr como de ChTX se confirmó en un gel de SDS-PAGE al 15%, como se indica en la Figura 9.

En la Figura 10 se muestra un perfil de purificación de la proteína p9-Xa-NTXr, separada por la resina de intercambio iónico DE52. La fracción correspondiente (I) a la proteína de fusión eluye alrededor de una concentración de NaCl de 0.25 M.

El plegamiento de la proteína NTXr se llevó a cabo de acuerdo a las condiciones indicadas por Park *et al.*, (1991). La etapa de plegamiento consiste en dializar toda la noche a la fracción correspondiente a la proteína de fusión contra un amortiguador de Tris 20 mM pH 8, NaCl 100 mM y β -ME 1mM a 4 °C.

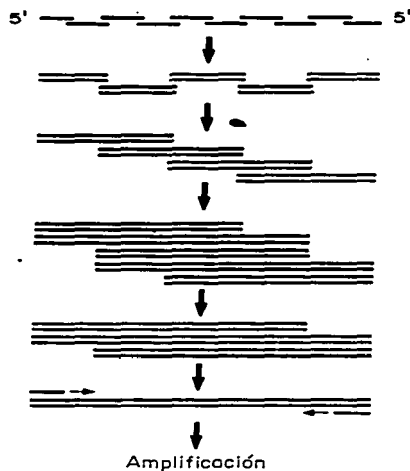


Figura 5 Síntesis de fragmentos de ADN por el método de PCR recurrente. La PCR recurrente, consiste en una mezcla de oligonucleótidos que se ensamblan entre sí, como se indica en la figura. Las condiciones de la PCR, permiten que se generen subproductos de doble cadena, que se van alargando para finalmente, dar un producto de la longitud esperada. El exceso de los oligonucleótidos más externos, permite que se enriquezca el fragmento final.

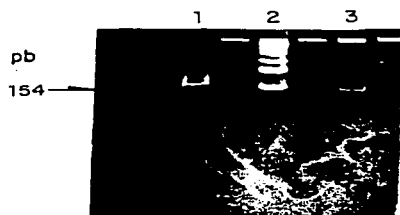
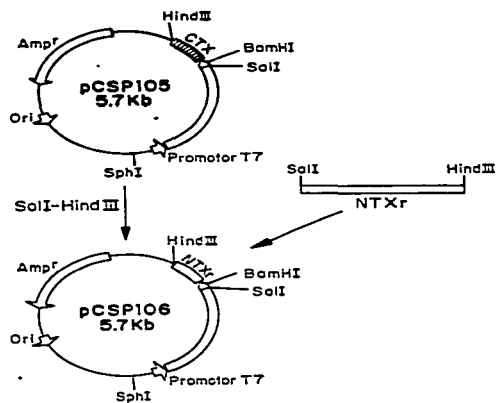


Figura 6 Síntesis por PCR del fragmento Xa-NTX_r. El fragmento Xa-NTX_r se sintetizó mediante PCR recurrente, como se explica en materiales y métodos. Una muestra del producto de PCR se cargó en un gel de poliacrilamida al 15%. En los carriles uno y tres se pueden observar los productos de PCR correspondientes al gen sintético X_a-NTX_r. El carril dos contiene marcadores de peso molecular.



¹GTGTAACGATCCATCGAAAGGTCGTACCATCATCAACGTTAAATCC
 Val Asp Gly Ser Ile Glu Gly Arg Thr Ile Ile Asn Val Lys Cys
¹⁰ACC TCC CCG AAA CAG TCC TCC AAA CCG TCC AAA GAA CTG TAC GGT
 Thr Ser Pro Lys Glu Cys Ser Lys Pro Cys Lys Glu Leu Tyr Gly
²⁰TCC TCC GCT GGT GCT AAA TCC ATC AAC GGT AAA TCC AAA TCC TAC
 Ser Ser Ala Gly Ala Lys Cys Met Asn Gly Lys Cys Lys Cys Tyr
³⁰AAC AAC TAA GAA TTC CAA GCT TAT
 Asn Asn Fin

Figura 7 Clonación del fragmento Xa-NTXr en el vector PCSP105. La banda del fragmento Xa-NTXr se digirió con las enzimas *Sal I* y *Hind III*, y se ligó con el vector PCSP105 para generar el plásmido PCSP106. En la parte inferior se indica la secuencia nucleotídica del gen Xa-NTXr. En negritas se indican los sitios de restricción; los números se refieren a los residuos de aminoácidos en la estructura primaria de NTX; los residuos subrayados señalan el sitio de reconocimiento de la proteasa de restricción Xa.

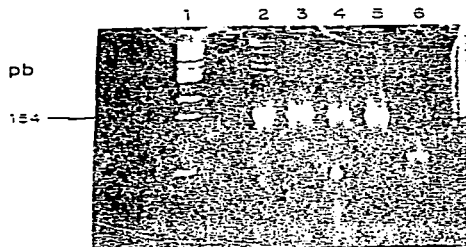


Figura 8 Selección de clonas positivas por PCR. Una muestra (1 μ l) de un cultivo líquido de cada clona, se adicionó directamente a una mezcla de PCR con los oligos #1 y #6. En el carril 1, se muestra el marcador de peso molecular; los carriles 2-5 son muestras de PCR de clonas positivas, el carril 6 es un testigo negativo.

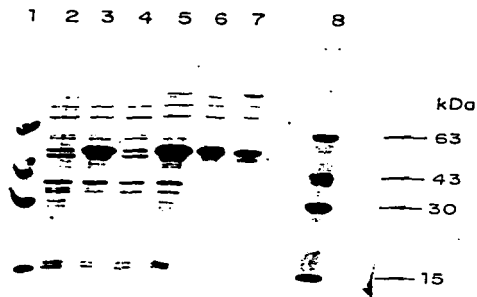


Figura 9 Inducción de la proteína de fusión. Se indujo la cepa BL21(DE3), transformada con el plásmido PCSP105 ó PCSP106, como se indica en material y métodos. Se separaron muestras de proteínas de la cepa, antes y después de inducir con 0.5 mM de IPTG, en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 10 %. Carril 1 y 8 marcadores de peso molecular, carriles 2 y 3 muestras antes y después de inducir BL21(DE3) PCSP105; carriles 4 y 5 muestras de BL21(DE3) PCSP106 antes y después de inducir; carriles 6 y 7 muestras de las fracciones I y II de la purificación por intercambio iónico de la proteína total en DE52 de la fermentación para expresar NTX_r.

Posteriormente se realizó una modificación al protocolo propuesto por Park *et al.* (1991), el cual consistió en eliminar el paso de la purificación de la proteína de fusión con la resina DE52. Así, después de lisar las células y obtener la proteína total, ésta se diluyó hasta una densidad óptica entre 1 y 2 a 280 nm, en amortiguador de diálisis (Tris 20 mM, pH 8.0, NaCl 100mM, beta mercaptoetanol [β -ME] 1mM).

Una vez llevado a cabo el plegamiento de NTXr, se procedió a separar la NTXr de la proteína acarreadora, para lo cual ésta se digirió con el factor Xa o con tripsina. En los primeros experimentos, se empleó la digestión trípica, pues resultaba mas económico emplear la tripsina. Una muestra de la digestión trípica o de la digestión con el factor Xa se pasó a través de una columna de HPLC C₁₈ semipreparativa. En la Figura 11 se indica el perfil de retención de los productos de la digestión con tripsina, o con el factor Xa. Como se observa de la figura anterior, la digestión de la proteína de fusión con el factor Xa permite separar la NTXr de la proteína acarreadora, sin generar otros productos de digestión como sucede en la digestión trípica. La Figura 12 muestra el porcentaje de reconocimiento de los picos de HPLC de una digestión trípica por los anticuerpos policlonales. El tiempo de retención 28.0 fue el que dió el porcentaje reconocimiento igual al de la NTX nativa. Como se puede ver de la Figura 12, otros picos también son reconocidos por los anticuerpos policlonales, en los tiempos de retención 28.75 a 30.3 min; lo que puede indicar que se trate de formas de la proteína de fusión parcialmente digeridas unidas a NTXr o plegadas de distinta forma. No investigamos mas al respecto pues la estructura primaria del pico identificado resultó ser la correcta hasta los primeros 27 residuos. Por otra parte se verificó la composición de aminácidos de NTXr, la cual correspondió con la esperada, ver Tabla 1.

El lote completo de la proteína purificada a partir de un litro de cultivo se digirió completamente con tripsina y se purificó a través de una columna de carboximetil celulosa CM32 pasando un gradiente salino de NaCl de 0 a 0.3 M y colectando el pico correspondiente a NTXr (Figura 13). Esta cantidad colectada se pasó a través de una columna de biogel para eliminar la sal presente en la muestra.

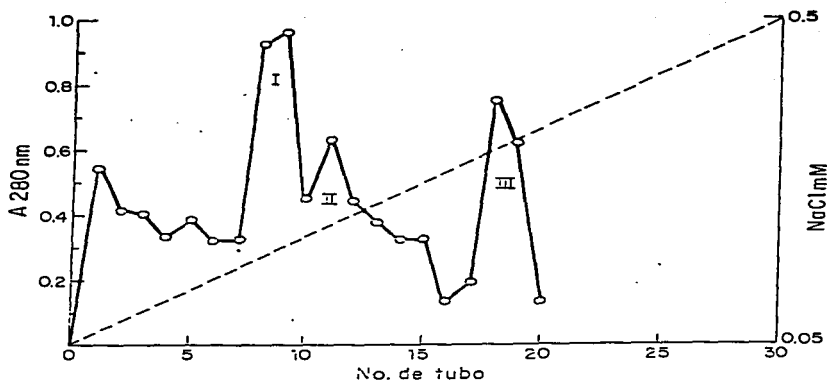


Figura 10 Purificación de la proteína de fusión P9-Xa-NTX. La proteína total de una fermentación de 1 L de la cepa BL21 (DE3) PCSP106, se purificó por cromatografía de intercambio iónico empleando una columna de resina DE52. Después de lavar el exceso de proteína, hasta una densidad óptica menor de 0.03 a 280 nm, se eluye la proteína de fusión con un gradiente de NaCl de 50 a 500 mM en amortiguador Tris-HCl 100 mM y 5 mM de β -ME. La fracción I y II corresponden a la proteína de fusión. La fracción III corresponde a ácidos nucleicos.

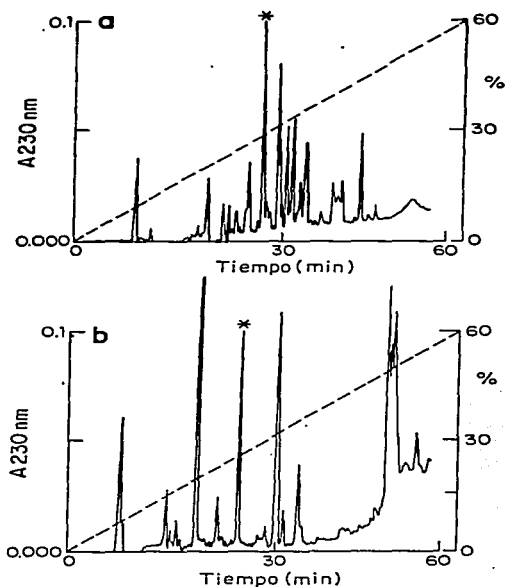


Figura 11 Purificación de NTX_r. La proteína de fusión purificada, se digirió enzimáticamente para liberar al péptido NTX_r. a.- Digestión trípica de la fracción I purificada por DES2. Se digirió un miligramo de la fracción I en el amortiguador de diálisis (ver material y métodos) con tripsina y 2 mM de CaCl₂. Se pasaron 500 µg a través de una columna C₁₈ de fase reversa, empleando un gradiente de acetonitrilo de 0 a 60 % y TFA 0.1%. Se colectaron los picos cercanos al minuto 28. b.- Digestión con la proteasa específica Xa. Se digirió la misma cantidad de la fracción I con el factor Xa, en las condiciones indicadas en el texto y se separó una muestra en las mismas condiciones de HPLC de la Figura 11a. El asterisco indica el pico correspondiente al tiempo de retención de NTX_r.

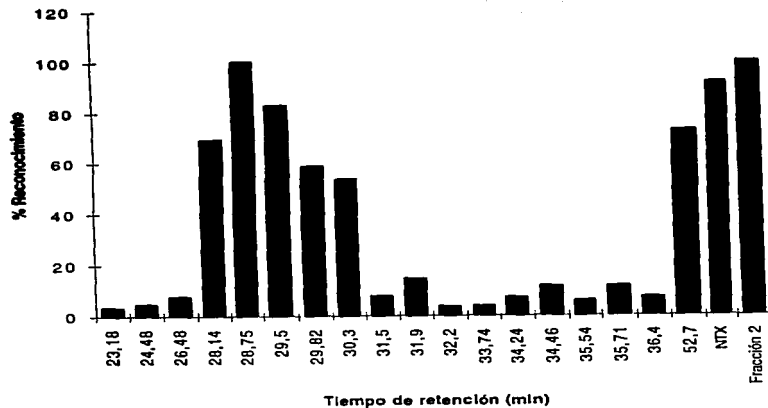


Figura 12 **Identificación de NTX, con anticuerpos policlonales.** En un ensayo de ELISA, se hicieron reaccionar con anticuerpos policlonales anti-NTX a las distintas muestras colectadas por HPLC de la digestión triptica. Se grafica el valor de la absorbancia registrada en el detector de ELISA, para cada tiempo de retención colectado. En el extremo derecho de la gráfica, se indican las barras de reconocimiento para NTX y para la proteína de fusión antes de ser digerida con tripsina.

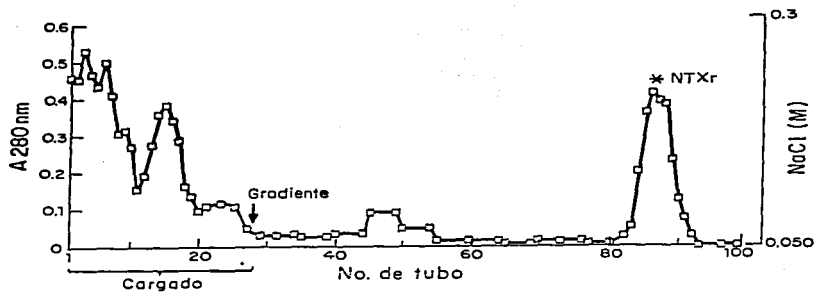


Figura 13 Purificación por intercambio iónico de NTX_r. Para la purificación preparativa de NTX_r, se empleó una columna de intercambio iónico CMC32 equilibrada con fosfato de sodio 50 mM pH6.0. Se cargaron 70 mg de la digestión trípica de la fracción I y se aplicó un gradiente salino de 0 a 300 mM de NaCl.

El rendimiento de NTXr a partir de un cultivo de 1 litro en nuestras condiciones es de 1.3 mg. Esta cantidad es significativa si se compara con la necesidad de ordeñar en nuestro laboratorio a 10,000 alacranes de la especie *Centruroides noxius* para obtener 1 mg de NTX.

El componente correspondiente a NTXr se purificó de este lote a través de columnas de HPLC C₁₈ semipreparativa y posteriormente se recromatografió la muestra empleando una columna C₁₈ analítica en las condiciones indicadas en Material y Métodos del artículo publicado.

AMINOACIDOS	V.O.	V.E
Asp	4.5	4
Thr	1.93	2
Ser	3.99	4
Glu	3.1	2
Pro	2.01	2
Gly	3.64	3
Ala	3.8	2
Cys	ND.	6
Val	1.66	1
Met	0.78	1
Ile	1.86	2
Leu	1.28	1
Tyr	1.45	2
Lys	6.65	7

Tabla 1 Composición de aminoácidos de NTXr. Se determinó la composición de aminoácidos de NTXr por hidrólisis ácida de una muestra de 2 nanomolas de NTXr como se indica en el texto. En la tabla se muestran los resultados obtenidos del análisis y aquellos conocidos para NTX. V.O.= Valores observados, V.E.= Valores esperados.

El peso molecular de NTXr se determinó por espectroscopía de masas resultando ser de 4, 220.45. Este dato fue obtenido por el Dr. Martin del NIH, EEUU., co-autor del trabajo anexo.

En este trabajo combinamos cantidades conocidas de NTX nativa y NTXr, para comparar sus tiempos de retención en una columna de HPLC C_{18} analítica. El patrón de elución indica una diferencia en los tiempos de retención (Figura 3 del artículo publicado), siendo de 24.16 min para NTX y 24.68 min para NTXr.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE NTXr

Toxicidad

Para demostrar si la NTXr presentaba las propiedades bioactivas de la NTX nativa, se inyectaron a ratones por vía intraperitoneal concentraciones conocidas de la NTXr, resultando en la misma LD_{50} que la NTX nativa, 50 μ g por 20 g de peso; además se observaron los mismos síntomas de toxicidad que provoca la NTX nativa: salivación y respiración acelerada.

Ensayos de desplazamiento de [125 I]-NTX

Se demostró que NTXr es capaz de desplazar a 125 I-NTX en el sistema de membranas sinaptosomales de rata, en la misma proporción como sucede con el desplazamiento de 125 I-NTX por NTX fría. La curva de desplazamiento de NTXr y de NTX son las mismas, ver Figura 4 del artículo publicado (Anexo1). Los valores de IC_{50} de NTXr son los mismos que los observados para la NTX.

Ensayos electrofisiológicos

En la Figura 14 se muestra la capacidad bloqueadora de NTX y NTXr sobre los canales de potasio $K_v1.1$, expresados en ovocitos de *X. laevis*. Los ensayos mostraron valores de bloqueo de las corrientes de potasio similares para ambas formas. Como se puede ver de la gráfica B. El lavado de la toxina unida a los canales permite recuperaciones por arriba del 90% de las corrientes control, lo que es indicativo de que la unión de la toxina

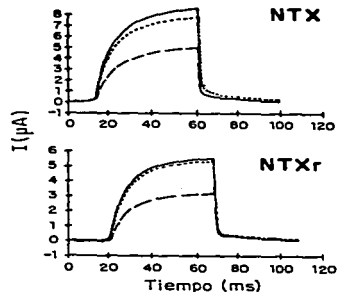
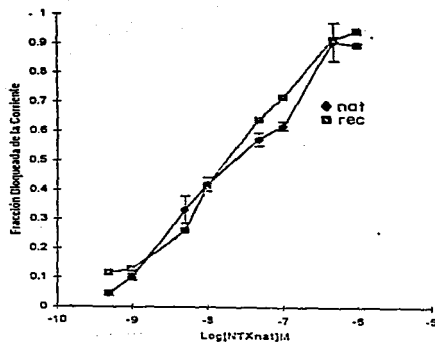


Figura 14 Ensayo de bloqueo de los canales *Kv1.1*. Los canales de potasio *Kv1.1* se expresaron en ovocitos de rana *X. laevis*, con el propósito de ensayar el bloqueo de NTX y NTX_r a distintas concentraciones. La gráfica de la izquierda muestra la fracción bloqueada de los canales de potasio. Los registros de la derecha muestran el bloqueo de las corrientes de potasio por las toxinas nativa (NTX) y recombinante (NTX_r). La línea sólida indica la corriente del ovocito antes de agregar la toxina, la línea interrumpida indica la corriente en presencia de la toxina, la línea punteada indica la corriente del ovocito, recuperada después del lavado de la toxina.

al canal es reversible. Las concentraciones de ambas toxinas ensayadas estuvieron en el intervalo de 0.5 nM a 1000 nM. El valor de IC₅₀ para NTX y NTXr fué de 24.4 nM y 19.8 nM respectivamente.

Por los resultados obtenidos de los experimentos anteriores, se demostró que es posible producir NTXr (no amidada) en cantidades significativas y con propiedades bioactivas (toxicidad en ratones, unión a membranas sinaptosomales, bloqueo de canales de potasio) similares a la nativa, empleando un sistema heterólogo de expresión de un gen sintetizado químicamente.

Generación de variantes de NTXr

La síntesis del gen NTXr y su producción con propiedades similares a la nativa permitió la síntesis de variantes con el mismo esquema de expresión y producción, con la finalidad de ensayar las propiedades biológicas de estas variantes con respecto a las de NTXr y NTX nativa, y así iniciar estudios de la relación estructura-función de NTX, empleando herramientas de biología molecular.

En la Tabla 2 se enlistan las secuencias primarias de las variantes generadas en este trabajo. Para generar las mutantes sencillas en los primeros residuos del extremo amino terminal, se empleó el enfoque de "barrido por alaninas", que consiste en sustituir el aminoácido silvestre por un residuo de alanina. Además, se sintetizó una doble mutante denominada CA[7,29], la cual consistió en sustituir las cisteínas 7 y 29 por alaninas en ambas posiciones. En la estructura de NTX estas cisteínas forman un puente disulfuro. Las mutantes en la lisina 28 fueron por arginina y por glutámico; no se pudo clonar la mutante correspondiente por alanina. Por otra parte, se sintetizó una mutante truncada (YNN), consistente en eliminar la porción que abarcan los últimos tres residuos de NTXr (Y-N-N) con la finalidad de ensayar el papel de esta porción en la actividad biológica de NTXr, ya que como se mencionó previamente, en nuestro laboratorio se planteó la hipótesis de que el extremo carboxilo terminal no tiene influencia en las propiedades de pegado y de bloqueo en NTX. Todas las mutaciones se confirmaron por secuencia de nucleótidos y por secuencia de los péptidos expresados y purificados.

Ensayos de desplazamiento

En la Figura 15 se muestran los resultados de los ensayos de desplazamiento de [¹²⁵I]-NTX de membranas sinaptosomales de cerebro de rata, de algunas de las variantes ensayadas. Se encontró que las variantes T1, I2, I3, N4, V5, K6, T8 y S9 presentaron las mismas curvas de desplazamiento que la NTX nativa. Por otro lado, las variantes de K28 y la variante ΔYNN disminuyen su desplazamiento hasta por tres ordenes de magnitud.

Ensayos electrofisiológicos

En la Figura 16 se muestran los resultados del bloqueo de canales Kv 1.1 en ovocitos *X.laevis*, para las variantes ensayadas. En este sistema sólo se ensayaron las variantes de K6, T8, K28 y ΔYNN. En este caso, las variantes de K6 y K8 muestran tener una menor capacidad bloqueadora de los canales de potasio Kv1.1, con respecto a NTX nativa y recombinante. Las variantes de lisina y ΔYNN se comportan relativamente igual que el ensayo de desplazamiento en la fracción P₃.

Como se puede observar de los experimentos de desplazamiento de [¹²⁵I]-NTX y del bloqueo de canales Kv1.1, la variante ΔYNN presenta una reducción de dos ordenes de magnitud en ambos sistemas ensayados.

NTXr	TIINVKCTSPKQCSKPKCKELYGSSAGAKCMNGKCKCYNN
T1A	AIINVKCTSPKQCSKPKCKELYGSSAGAKCMNGKCKCYNN
I2A	TAINVKCTSPKQCSKPKCKELYGSSAGAKCMNGKCKCYNN
I3A	TIANVKCTSPKQCSKPKCKELYGSSAGAKCMNGKCKCYNN
N4A	TIIVKCTSPKQCSKPKCKELYGSSAGAKCMNGKCKCYNN
V5A	TIINAKCTSPKQCSKPKCKELYGSSAGAKCMNGKCKCYNN
K6A	TIINVACTSPKQCSKPKCKELYGSSAGAKCMNGKCKCYNN
CA[7,29]	TIINVKATSPKQCSKPKCKELYGSSAGAKAMNGKCKCYNN
T8A	TIINVKCASPKQCSKPKCKELYGSSAGAKCMNGKCKCYNN
S9A	TIINVKCTAPKQCSKPKCKELYGSSAGAKCMNGKCKCYNN
K28E	TIINVKCTSPKQCSKPKCKELYGSSAGAECMNGKCKCYNN
K28R	TIINVKCTSPKQCSKPKCKELYGSSAGARCMNGKCKCYNN
ΔYNN	TIINVKCTSPKQCSKPKCKELYGSSAGAKCMNGKCKC

Tabla 2 Generación de mutantes de NTX por mutagénesis dirigida.
 En la primera línea se indica la estructura primaria de NTXr. Las mutaciones puntuales introducidas en NTX se indican en negritas. La mutante ΔYNN tiene una defeción de los tres últimos residuos en la porción carboxilo terminal. Todas las mutaciones se confirmaron por secuencia de nucleótidos y por secuencia de aminoácidos.

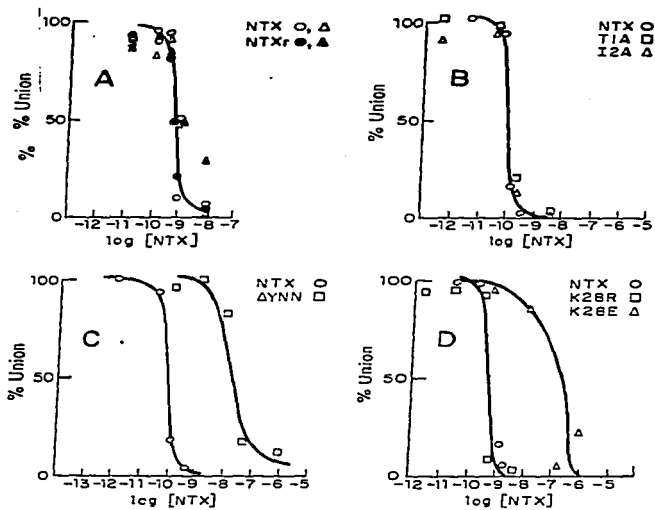


Figura 15 Ensayos de desplazamiento de ^{125}I -NTX en membranas sinaptosomales de cerebro de rata (fracción P_3). A Curva de desplazamiento entre NTX y su forma recombinante. B Comparación de las curvas de desplazamiento con las variantes T1A y I2A. C Variante ΔYNN . D Variantes K28R y K28E.

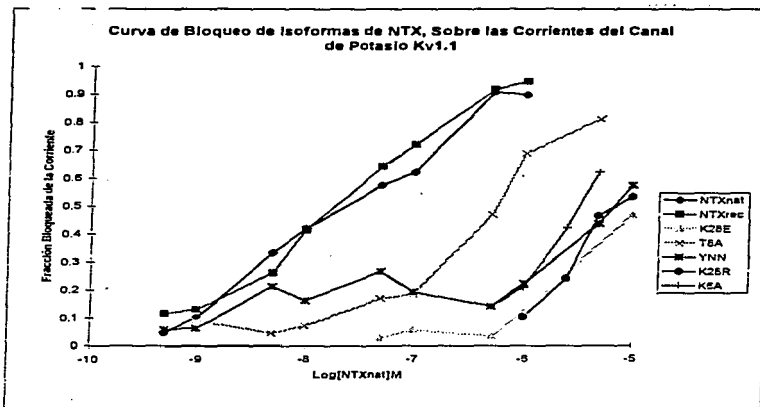


Figura 16 Bloqueo de los canales de potasio Kv1.1 por las distintas mutantes de NTX. El RNA mensajero del canal Kv1.1, se expresó en ovocitos de la rana *X. laevis*. Se realizaron registros electrofisiológicos con la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos. Se determinó la fracción de corriente bloqueada en presencia de distintas concentraciones de NTX. En la Figura se indica el porcentaje de bloqueo del canal Kv 1.1 expresado en ovocito de *X. laevis* por distintas mutantes a diferentes concentraciones.

DISCUSION

Las toxinas del veneno de alacrán han permitido estudiar distintos canales de potasio, debido a su especificidad hacia estas moléculas. Estas comparten un marco estructural común, el cual es una estructura globular y compacta, estabilizada por tres puentes disulfuro conservados (Bontems *et al.*, 1991; Vita *et al.*, 1995). Las isoformas naturales de las toxinas encontradas muestran variaciones de aminoácidos en su estructura primaria, los cuales condicionan ligeras variaciones de la estructura secundaria, pero no llegan a cambiar el motivo de la estructura tridimensional. Estos cambios permiten que las toxinas interaccionen con diferente intensidad con los canales iónicos (Olivera *et al.*, 1991).

Como se indica en antecedentes, en trabajos realizados por nuestro grupo se presentan evidencias de que en el extremo amino terminal están presentes residuos de aminoácidos que pueden estar implicados en la interacción de NTX con los canales de potasio; también se propone que la porción carboxilo terminal de NTX no tiene un papel funcional relevante (Gurrola *et al.*, 1989 y Gurrola y Possani, 1995). Por otra parte, otros grupos han demostrado que la lisina en la posición 27 de ChTX y de la AgTX2 juega un papel crucial en la actividad bloqueadora de canales de potasio (Goldstein y Miller, 1993; Hidalgo y McKinnon, 1995).

Con base a los datos anteriores, se inició este estudio con la finalidad de generar mutantes puntuales de NTX en la lisina 28, en la porción amino terminal y el carboxilo terminal, para identificar aquellos residuos que afectan la interacción de NTX con los canales de potasio presentes en fracciones sinaptosomales de cerebro de rata y en canales de potasio del subtipo $K_v1.1$ expresados en ovocitos de rana *X. laevis*.

SINTESIS Y EXPRESION DE NTXr

En la primera parte de este trabajo se planteó el diseño de un gen sintético de NTX para expresarlo en un sistema heterólogo, ya que actualmente no se conoce la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la NTX. Por lo anterior, se decidió sintetizar el gen de NTX con base en su secuencia primaria.

La síntesis y expresión del gen sintético de NTX fue exitosa. Se logró expresar y purificar una proteína recombinante (NTX_r) con propiedades

químicas y biológicas similares a las de la NTX nativa. Los datos de HPLC muestran que después del plegamiento *in vitro* de NTX_r, se produce un pico único que eluye aproximadamente en el mismo tiempo de retención que la NTX nativa, lo cual fue un indicio de que se había favorecido el plegamiento correcto de la proteína. La obtención de NTX_r en cantidades significativas es otro indicador de que los requerimientos para el plegamiento de esta proteína no son muy "complejos", y que la forma bioactiva de NTX_r está favorecida en el proceso de plegamiento.

Esto también lo confirmamos con otras toxinas cortas que fueron expresadas con este mismo sistema en nuestro grupo (datos no publicados), así como por otros grupos (Park y Miller, 1992; Garcia-Calvo *et al.*, 1993; Krezel *et al.*, 1995). A este respecto, existen estudios sobre la síntesis química de toxinas cortas de alacrán, en donde se explica que el proceso de plegamiento está termodinámicamente favorecido hacia la forma bioactiva (Sabatier *et al.*, 1996). Cabe decir que, para el caso de NTX_r, no se han realizado experimentos a tiempos de plegamiento más cortos, para definir su tiempo mínimo de plegamiento. Además, en este trabajo se demostró que es posible que se lleve a cabo el plegamiento de NTX_r, antes de la digestión, a partir de la proteína total, obtenida después de lisar las células sin necesidad de purificar la proteína de fusión.

La actividad de NTX_r *in vivo* (ensayo de toxicidad en ratones), el reconocimiento por los anticuerpos policlonales anti-NTX_r, los ensayos de desplazamiento de ¹²⁵I-NTX de membranas sinaptosomales de rata y del bloqueo de canales de potasio K_v1.1, son similares a los de la toxina nativa. Esto permite decir que la NTX_r está conservando una estructura terciaria similar a la nativa.

SINTESIS DE VARIANTES PUNTALES DE NTX

Para generar las mutantes de NTX se eligió el enfoque de "barrido por alanina", ya que esta metodología ha demostrado ser adecuada para introducir cambios que permiten decir si las cadenas laterales, de los aminoácidos sustituidos, son importantes para la función. Esta estrategia es conveniente, además, porque las mutaciones introducidas pocas veces provocan cambios en la estructura (Cunningham y Wells, 1989; Wells, 1991).

Por otra parte, como se observa de la Figura 1, las secuencias y las estructuras de las distintas toxinas cortas bloqueadoras de canales de

potasio indican que, si se mantiene el consenso de cisteínas, estas toxinas pueden aceptar diversos cambios de aminoácidos, así como eliminaciones, sin observar cambios en su estructura terciaria (Vita *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1994; Dauplais *et al.*, 1995; Delepieyre *et al.*, 1997; Gómez-Lagunas *et al.*, 1996).

Todas las mutaciones sobre el gen sintético de NTX se confirmaron por secuencia nucleotídica. A excepción de la mutante C[7/29]A, no se presentaron problemas en la expresión y purificación de las proteínas expresadas. La generación de las isoformas de NTX, permitió detectar que algunos residuos no son importantes (T1, I2, I3, N4, V5 y S9), en la unión a membranas sinaptosomales, mientras que otros residuos si lo son (K6, T8) en la unión a membranas y en el bloqueo de canales de potasio $K_v1.1$; además de que también parecen ser importantes en la actividad de NTX, la K28 y la porción carboxilo terminal que abarca los residuos de Y37, N38 y N39.

Para analizar los resultados obtenidos en este trabajo, se discuten primero los sistemas empleados para ensayar las mutantes obtenidas y posteriormente se discuten aquellos resultados que implican a la K28, los residuos de aminoácidos del extremo carboxilo terminal y, finalmente, los del extremo amino terminal de la NTX.

ENSAYOS CON MEMBRANAS SINAPTOSOMALES DE CEREBRO DE RATA Y CANALES DE POTASIO EXPRESADOS EN OVOCITOS DE RANA.

En el presente trabajo se utilizaron dos ensayos para estudiar las interacciones de NTX y sus isoformas. Uno de ellos es el ensayo de desplazamiento de ^{125}I -NTX, de la fracción P_3 de membranas sinaptosomales de cerebro de rata; el otro ensayo emplea la expresión de RNA mensajero de un canal de potasio en ovocitos de rana, para realizar registros electrofisiológicos sobre estos.

Los ensayos de unión de las toxinas de alacranes, serpientes y abejas, a las preparaciones membranales de cerebro de rata han permitido estimar las afinidades de éstas hacia las poblaciones de canales de potasio dependientes de voltaje, presentes en estas preparaciones (Rehm, 1991).

El ensayo de unión de las toxinas y de fármacos específicos con las fracciones membranales, también ha demostrado la presencia de varios subtipos de canales de potasio (Butler *et al.*, 1993; Rettig *et al.*, 1994). Por lo anterior, las membranas sinaptosomales de cerebro de rata son un

material adecuado para estudiar las interacciones de las toxinas con estos canales.

Hay evidencia de que los canales de potasio, en las fracciones sinaptosomales, que son afectados por ChTX, NTX y MgTX, son en su mayoría heterotetrámeros de las subunidades $K_v1.2$ y $K_v1.3$ (Knaus *et al.*, 1995). En condiciones nativas, las subunidades de un mismo subtipo pueden asociarse entre sí para formar heterotetrámeros: la proporción de las subunidades es variable según cada tipo celular (Xu *et al.*, 1995). Así, los heterotetrámeros tienen diferentes afinidades hacia las toxinas. Se ha demostrado que hay diferencias en la magnitud de la interacción de ChTX hacia distintos heterotetrámeros del canal de potasio tipo *Shaker* (Naranjo y Miller, 1996). Además, en el caso de la dendrotoxina (DTX), se ha demostrado que cada subunidad del canal $K_v1.1$ contribuye en la unión específica con la DTX (Tytgat *et al.*, 1995).

La caracterización electrofisiológica de los canales iónicos y la medición fina de su interacción con las toxinas, es sólo posible si se aisla un canal o una población homogénea del canal. Una metodología que ha resultado ser adecuada es la expresión del mRNA de los canales en el sistema de ovocitos de la rana *X. laevis*, descrita por Ferrer-Montiel y Montal (1994). Este ensayo permite controlar las condiciones en las cuales una población homogénea de canales de potasio es activo. En este trabajo se expresó el canal $K_v1.1$ en los ovocitos.

Las secuencias en la región del vestíbulo de los canales de potasio, dependientes de voltaje, a pesar de estar altamente conservadas, presentan diferencias que influyen en las afinidades por las toxinas (ver Figura 17). Por ejemplo: la ChTX presenta una $K_D = 120$ nM en el canal de potasio tipo *Shaker*; por otro lado, una mutación (F425G) en este mismo canal provoca una disminución en la $K_D = 50$ nM, mientras que una doble mutante (F425G, F427Q) tiene una $K_D = 5$ pM (Stocker y Miller, 1994). Por otra parte, las afinidades de NTX hacia distintos canales de potasio es variable, por ejemplo: NTX tiene una $K_D = 390$ nM hacia el canal de potasio rectificador tardío (Carbone *et al.*, 1982), hacia el canal $K_v1.3$ tiene una $K_D = 0.2$ nM (Aiyar *et al.*, 1995) mientras que presenta una $K_D = 450$ nM hacia el canal de potasio dependiente de calcio de gran conductancia (Valdivia *et al.*, 1988). Otras diferencias, que influyen en las afinidades de los canales por las toxinas, son que las condiciones del medio de ensayo son distintas en los experimentos de unión a membranas sinaptosomales y en los experimentos de bloqueo de canales en ovocitos; estas condiciones

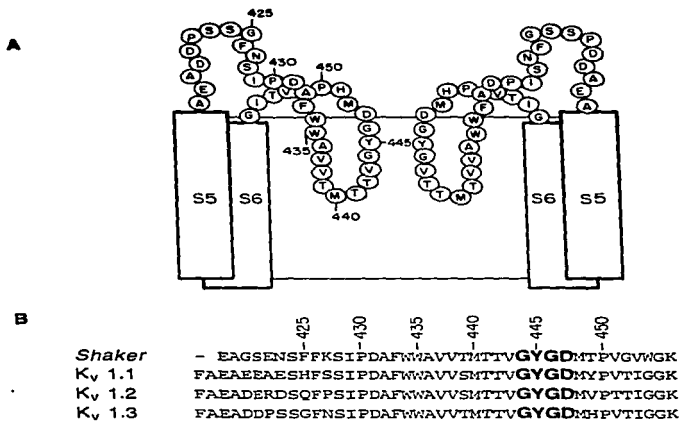


Figura 17 **A** Esquema propuesto por Aiyar *et al.*, 1996 de la región del poro en el canal de potasio *K_v 1.3*; la numeración se basa en la secuencia del canal *Shaker*. **B**. Secuencias de aminoácidos en la región del poro de cuatro subtipos de canal de potasio. En negritas se indican los residuos que se han propuesto que forman parte del filtro de selectividad.

incluyen: temperatura, pH, fuerza iónica, composición bioquímica de cada preparación (patrones de glicosilación de las subunidades α , presencia de otras subunidades proteicas que pueden interactuar con los canales de potasio). También se ha sugerido que la integridad funcional de los canales de potasio en la fracción membranal puede estar afectada (Lew *et al.*, 1997).

FUNCION DE LA LISINA 28 EN LA NOXIUSTOXINA

En las toxinas de alacrán se han identificado distintos residuos implicados en las propiedades de unión de las toxinas cortas con los canales de potasio (Stampe *et al.*, 1994; Harvey *et al.*, 1995). Entre estos aminoácidos existe uno que juega un papel crucial, relacionado con la capacidad de estas toxinas para bloquear las corrientes de potasio. Este aminoácido es un residuo de lisina, que se encuentra conservado en todas las toxinas cortas de alacranes caracterizadas hasta hoy; por ejemplo ChTX, AgTX2 y NTX (Bontems *et al.*, 1992; Dauplais *et al.*, 1995; Krezel *et al.*, 1995) (ver Figuras 1 y 19). Para ChTX y AgTX2 se trata de la lisina 27.

En estas toxinas ya se ha demostrado la función central de este residuo (Goldstein y Miller, 1993; Hidalgo y McKinnon, 1995). La función de esta lisina "activa" esta relacionada con la propiedad de las toxinas para bloquear los canales de potasio. La cadena lateral de la lisina penetra en el poro del canal y el grupo ϵ -amino bloquea el flujo de los iones de potasio, que son conducidos a través del poro (Giangiaccomo *et al.*, 1992; Goldstein y Miller, 1993; Aiyar *et al.*, 1995; Ranganathan *et al.*, 1996), (ver Figura 4). La longitud de la cadena alifática de la lisina activa no afecta las propiedades de bloqueo de isoformas sintéticas. En estas isoformas (no naturales) se ha sustituido la cadena lateral de la lisina con cadenas más cortas, pero conservando el grupo amino en el extremo de la cadena; de esta manera, su efecto en la potencia de la toxina es pequeño o no cambia. Por otra parte, el papel de la amina terminal se demostró al sustituir por asparagina o por norleucina (que asemeja a la lisina pero carece de la amina). Estas modificaciones reducen la potencia de la toxina en 300 veces (Aiyar *et al.*, 1995).

En la molécula de NTX la K28 ocupa una posición similar a la lisina activa de ChTX y AgTX2 (ver Figuras 18 y 19). Los datos obtenidos en este trabajo, son indicativos de que la Lis28 de NTX, que se encuentra estructuralmente en la misma posición, tiene un papel similar al descrito

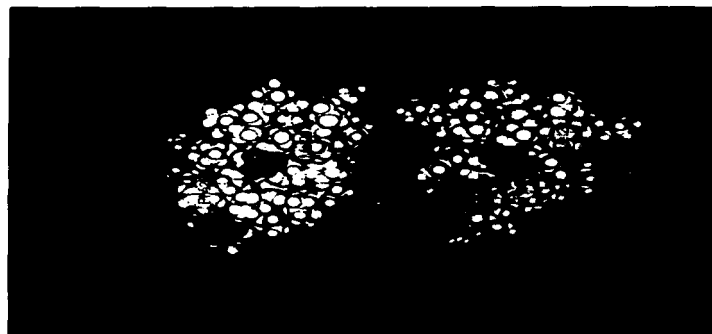


Figura 18 Comparación de las superficies de unión de tres toxinas de alacrán y una toxina de anémona marina. Los residuos importantes en la actividad de estas toxinas, se localizan en una superficie plana. La lisina activa (azul) se ubica en el centro de estas estructuras, para que su cadena lateral penetre en la región del poro del canal y bloquee el flujo de los iones de potasio. Los residuos aromáticos e hidrofóbicos (amarillo) contribuyen a la estabilidad del complejo toxina-canal. Otros residuos básicos (azul) en esta superficie también contribuyen en esta interacción.

propuesto para la K27 de ChTX y de AgTX2. La mutante K28E de NTX se une con menor afinidad a la fracción sinaptosomal; sin embargo, la mutante K28R se une en la misma proporción que NTX. La cadena alifática de glutámico es de menor longitud y el carácter negativo de la cadena lateral de la mutante K28E puede aumentar aún más la inestabilidad del complejo. Esto se puede explicar por la presencia de cuatro residuos de aspárticos (D402) en la entrada del poro del canal, como se propone en el modelo de Aiyar *et al.*, (1995) y Ranganathan *et al.*, (1996), los cuales pueden repeler al residuo de glutámico de la mutante K28E (ver Figura 17). En el caso de la mutante K28R, se observó que la afinidad hacia los canales de sinaptosomas es la misma que la toxina nativa, mientras que en el bloqueo de canales $K_v1.1$, esta mutante tiene el mismo comportamiento que la mutante K28E. La misma interacción con los sinaptosomas de K28R, podría sugerir que, el sitio donde interacciona la lisina activa depende de la carga y no del grupo cargado en la cadena lateral, la arginina tiene una cadena alifática de menor longitud y el volumen del grupo guanidino es mayor al del grupo amino de la lisina. Sin embargo, antes de asignar una forma alternativa de interacción, es necesario que los canales de cerebro de rata, sean expresados en el mismo sistema en donde esta siendo expresado el canal $K_v1.1$, para que los experimentos sean comparables.

Por otra parte, ambas mutantes, K28E y K28R, bloquean los canales de potasio $K_v1.1$, a concentraciones mayores que la nativas, ambas tienen la mayor IC_{50} de todas las variantes ensayadas, 10.8 μM y 7.41 μM respectivamente, lo cual coincide con datos para mutantes en la K27 de ChTX y AgTX2, en donde se observa que estas mutantes de K27 tienen el máximo efecto desestabilizador del complejo toxina-canal, representado por los mayores valores de la constante de disociación. (Goldstein y Miller, 1993; Hidalgo y McKinnon, 1995).

RESIDUOS DEL EXTREMO CARBOXILO TERMINAL

AMIDACION DEL CARBOXILO TERMINAL

Una diferencia que presenta NTX, en comparación con la NTX nativa, fue la ausencia de la amidación en el extremo carboxilo terminal. Esto se pudo demostrar por la diferencia en los tiempos de elución en HPLC como lo demostraron previamente Nutt *et al.* (1992). Datos previos de HPLC y de NMR indican que la NTX se encuentra amidada en el carboxilo terminal y

que corresponde al residuo de la asparagina 39 (Nutt *et al.*, 1992; Drakopoulou, *et al.*, 1995; Dauplais *et al.*, 1995). Este tipo de modificación postraduccional es un requerimiento para la actividad biológica de algunas toxinas, de ciertos neuropéptidos y hormonas. En la apamina, una neurotoxina del veneno de abeja, la amidación en el extremo amino terminal es importante para su actividad bloqueadora de canales de K activados por calcio y de baja conductancia (Devaux *et al.*, 1995). La toxina PO5, del alacrán *Androctonus mauretanicus mauretanicus*, no esta amidada naturalmente en el extremo carboxilo terminal, pero un análogo sintético amidado en esta posición, provoca que PO5 se una irreversiblemente a su receptor (Sabatier *et al.*, 1993). El papel de otras modificaciones postraducionales en toxinas de alacrán puede ser importante, como lo es el caso de la ChTX, que presenta una modificación en el primer residuo (E), el cual está en forma de piroglutamato (Gimenez *et al.*, 1988). La ausencia de esta modificación en ChTX afecta sus propiedades bioactivas. En el caso de la NTX, demostramos que la ausencia de esta modificación no influye en las propiedades biológicas ensayadas de NTX_r, ya que los datos de toxicidad en ratones, unión a sinaptosomas y bloqueo de canales iónicos K_v 1.1, son similares a los descritos para NTX nativa. La ausencia de esta modificación postraduccional en NTX_r se debe a que en *E. coli* no se realizan estas modificaciones.

RESIDUOS Tir-Asn-Asn (ΔYNN)

Para el caso de la mutante consistente en la eliminación de los últimos tres residuos (ΔYNN), se observó, por HPLC que, la supresión de este péptido no modificó su tiempo de retención con respecto al de la NTX, mientras que su capacidad de desplazamiento de ¹²⁵I-NTX, a las membranas, disminuye un orden de magnitud, y su capacidad de bloqueo de los canales de potasio presenta una IC₅₀ de 5.87 μM, la IC₅₀ de NTX es de 24.4 nM.

Analizando un modelo hipotético de la región del poro del canal K_v1.3 (Figura 17), y su interacción con otras toxinas, se podría predecir que la asparagina 39 puede estar interaccionando con alguno de los aminoácidos de la base del canal (Aiyar *et al.*, 1996). Esta asparagina está ocupando una posición espacial relativa similar a la R25 de ChTX y a la R24 de AgTX2 (ver la Figura 18 y Figura 19). La importancia de estos dos residuos en la

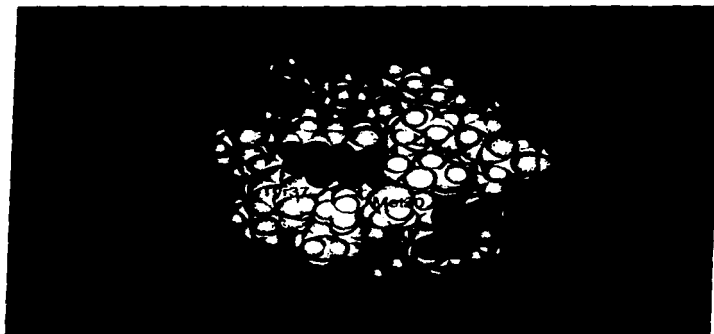


Figura 19 Superficie de unión de la NTX. La hoja β -plegada de la molécula es una superficie plana, en la que se localizan residuos importantes para la actividad de NTX. La K28 (azul) se localiza en el centro de esta superficie. La Y37 y la M30 (amarillo) en otras toxinas son importantes para la unión con los canales de potasio dependientes de voltaje. La N39 y la N31 (púrpura) se localizan en posiciones aproximadas a residuos que son importantes en ChTX y AgTX, ver texto.

interacción con el canal de potasio tipo *Shaker* ha sido demostrado para ambas toxinas (Park y Miller, 1992; Krezel *et al.*, 1995). El residuo aromático (tirosina) se encuentra conservado en varias toxinas cortas de alacrán. Los experimentos de mutagénesis lo identifican como un residuo que participa en la unión de ChTX y que forma parte del grupo de aminoácidos energéticamente importantes para el bloqueo del canal de potasio. Este residuo interactúa con la M448 del canal *Shaker*. Para el caso de la ChTX, esta díada está formada entre la K27 y la Y36, para la AgTX2 es la K27 y la F25 (ver Figura 18).

Establecemos que, a diferencia de la hipótesis de Gurrola y Possani (1995), en la porción carboxilo terminal de NTX existen aminoácidos involucrados en la unión de NTX con los canales de potasio de sinaptosomas y los canales $K_v1.1$. Sin embargo, es necesario discernir el papel relativo que tiene cada uno de los residuos eliminados en dicha interacción.

RESIDUOS EN EL EXTREMO AMINO TERMINAL

En la Figura 20 se indica la posición de los residuos del amino terminal. Las variantes T1, I2, I3, N4, V5, y S9, substituidas por alanina, no mostraron una modificación de las propiedades de unión de NTX, a membranas sinaptosomales, ya que sus curvas de desplazamiento fueron las mismas para la NTX nativa y la NTX_r. Por otra parte, el efecto de estas mutaciones en la interacción con el canal $K_v1.1$ no fué probado.

LISINA 6

Los ensayos funcionales de la mutante K6A demostraron que es un residuo importante en el bloqueo a los canales $K_v1.1$ ($IC_{50} = 3.33 \mu M$) pero no en la unión a la fracción sinaptosomal. La K6 se localiza en una asa de la porción amino terminal de la toxina. Este residuo de lisina además se encuentra dispuesto en un plano opuesto al de la K28. La cercanía con la T8, otro residuo de NTX que se demostró que también es importante, permite sugerir que la K6 estaría interaccionando con algún residuo de las asas H5 de la subunidad α del canal de potasio y que forma parte de la pared del vestíbulo del canal, como se indica en las Figuras 17 y 22. La presencia del residuo E378 en el canal $K_v1.1$, cercano al residuo de la H380 que interacciona con la T8, lo hace un candidato a mutagenizar para

establecer si este interactúa electrostáticamente con la K6. Se ha demostrado en otros trabajos que ocurren interacciones electrostáticas entre residuos de toxinas y residuos del canal (Stocker y Miller, 1994). En ChTX se demostró que el residuo K11 interactúa electrostáticamente con la K427 sobre el canal tipo *Shaker* (Stocker y Miller, 1994). En NTX existe también una lisina en la posición 11. En los canales $K_v1.1$, $K_v1.2$ y $K_v1.3$, la posición homóloga a la 427 del *Shaker* está ocupada por una serina, una prolina y una asparagina, respectivamente; por lo que una interacción electrostática sólo se podría establecer con la arginina del canal $K_v1.3$.

La identificación del residuo de K6 permite proponer otras mutaciones sobre esta misma posición, para tratar de establecer la naturaleza de su interacción con el canal de potasio $K_v1.1$. El hecho de que la mutante K6A no varíe sus propiedades de unión hacia los canales de los sinaptosomas puede explicarse porque en estos canales, $K_v1.2$ y $K_v1.3$, la interacción entre la K6 y el receptor no sea relevante en el fenómeno del desplazamiento de ^{125}I -NTX; esto es, que este residuo no contribuye en la asociación de la toxina con el canal. Otra explicación es que no existan residuos sobre estos canales que puedan interactuar con la K6 o que esta interacción no sea crítica en la unión a los sinaptosomas. Cabe recordar que en las preparaciones sinaptosomales están presentes heterotetrámeros de los subtipos $K_v1.2$ y $K_v1.3$, y los sitios de interacción pueden ser diferentes a aquellos del homotetrámero de $K_v1.1$.

PUENTE DISULFURO 7-29

En este caso, se detectó la expresión de la proteína de fusión de esta variante, sin embargo no fue posible aislar el péptido correspondiente por HPLC, ya que no se detectó un pico en el tiempo de elución esperado. Esto puede deberse a que el plegamiento de la variante fue diferente o que el péptido no sea estable a la digestión enzimática, lo cual puede ser indicativo de la importancia de este puente disulfuro para el plegamiento y la estabilidad de NTX. Hay que recordar que los tres puentes disulfuro de NTX forman un núcleo compacto.

Si el tiempo de retención de esta mutante varió en HPLC, un ensayo de ELISA empleando anticuerpos policlonales anti-NTX de los péptidos aislados por HPLC podría ayudar a identificar la presencia de un componente parcialmente plegado de esta variante de NTX. Existen datos en donde el papel del puente disulfuro equivalente al 7-29, en la

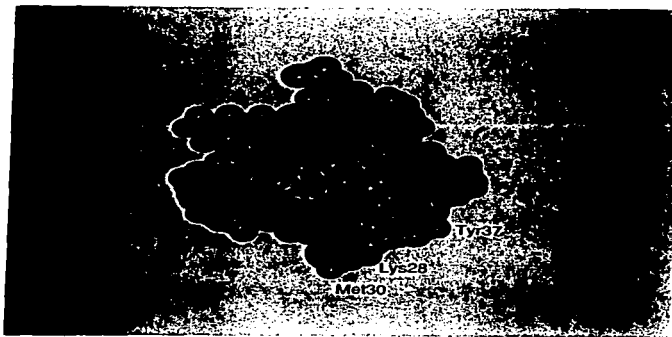


Figura 20 Porción amino terminal de NTX. Los residuos K6 y T8 que afectan el bloqueo de los canales Kv1.1, se encuentran alejados de la superficie de unión de NTX. Si el plano que definen los residuos de la superficie de unión, están en contacto con la base del canal (Figura 4) entonces la K6 y la T8 se encuentran por arriba de este plano, y podrían interactuar con algún residuo de la pared del vestíbulo del canal.

scyllatoxina, no influye en las propiedades de plegamiento ni en su afinidad hacia sinaptosomas de cerebro de rata y toxicidad en ratones (Sabatier *et al.*, 1996). Para el caso de NTX, entonces, este puente puede ser importante para su plegamiento y/o para la estabilidad de la molécula.

TREONINA 8

La mutante T8A mostró que la treonina participa en la interacción con el canal $K_v1.1$, expresado en ovocitos; por otro lado, no se hicieron ensayos de desplazamiento con este péptido. Este residuo en el modelo de la molécula de NTX se ubica en la cara opuesta a la región de la hoja β , que está en contacto con el poro del canal. La T8 se encuentra en una asa en el extremo del eje principal ($\approx 22\text{\AA}$) de la toxina. En el modelo del poro del canal de potasio $K_v1.3$, se ha podido definir que el mismo residuo de T8 en ChTX interacciona con la Glu380 del canal $K_v1.3$. En este caso, esta interacción es relevante en la unión de ChTX con la región del poro del canal (ver Figura 17) (Alyar *et al.*, 1995).

Para la NTX, la interacción de la T8 se establece, por homología, con la His380 del canal $K_v1.1$; éste residuo se localiza cerca del borde del vestíbulo del canal (ver Figura 17).

En nuestro grupo se caracterizaron dos isoformas naturales de toxinas, bloqueadoras de canales de potasio (Pi2 y Pi3), del alacrán *Pandinus imperator* que difieren tan sólo en un residuo en la posición 7: una prolina en Pi2 y un glutámico en Pi3. En NTX este residuo equivale a la prolina 10. Los ensayos de bloqueo de canales *Shaker B*, expresados en células S19 de insecto, mostraron que Pi2 tiene una $K_D = 8.2$ nM, mientras que Pi3 tiene una $K_D = 140$ nM (Gómez-Lagunas *et al.*, 1996). Por otra parte, una isoforma de ChTX, denominada CTX-2, que también muestra una sustitución de la Val5 por un residuo de glutámico, presenta una disminución en la capacidad de desplazamiento con respecto a ChTX (Harvey *et al.*, 1995). Así, los datos anteriores indican que la región amino terminal, o sea los primeros nueve aminoácidos de NTX, también participa en la interacción con residuos sobre el canal de potasio $K_v1.1$.

ANÁLISIS DE LA RELACION ESTRUCTURA-FUNCION EN NTX

La molécula de la NTX comparte varias características de las toxinas cortas de alacrán. Esta es una molécula globular y compacta con un

plegamiento α/β , y está estabilizada por tres puentes disulfuro, los cuales forman un núcleo compacto. La presencia de siete residuos de lisina inducen un potencial positivo alrededor de la molécula. La molécula de NTX, al igual que otras toxinas cortas, es una estructura rígida, sus elementos de estructura secundaria son una hélice corta que abarca los residuos 10 a 20; presenta tres cadenas β plegadas, las cuales forman una hoja β , (ver Figura 2). Así, la estructura globular de NTX presenta dos caras distinguibles, una definida por la hoja β y la otra por la hélice (Dauplais *et al.*, 1995).

En el estudio de la interacción de distintas toxinas bloqueadoras de canales de potasio, se ha definido la presencia de residuos de aminoácidos sobre las toxinas que son importantes en la actividad de bloqueo y las propiedades de unión con el canal de potasio. Así, para el caso de la ChTX, se ha detectado una región de la molécula en donde se localizan estos residuos (Stampe *et al.*, 1994). Estos autores han clasificado a los residuos de ChTX como cruciales, indiferentes y no importantes. Por otra parte, Hidalgo y McKinnon (1995) midieron la intensidad de la interacción entre los residuos de la AgTX2 con residuos complementarios, sobre el poro del canal de potasio tipo *Shaker B* y calcularon termodinámicamente cada una de estas fuerzas. Para el caso de la AgTX2 estos residuos son: K27, R24, R30, F25 y M30; para la ChTX son: K27, R25, N30, Y36, W14 y M29. En la Figura 18 se pueden observar la disposición espacial de estos residuos.

El par toxina-canal, es un ejemplo de interacción de un par ligando-receptor, en donde la interfase entre las dos moléculas la forman varios residuos, pero sólo un grupo de estos residuos son importantes en la estabilidad termodinámica del complejo. Por ejemplo, la afinidad de la hormona humana del crecimiento (hGH) hacia su molécula receptora (hGHbp), depende de manera crítica de ocho residuos que forman un "parche compacto". Este parche interacciona con residuos de la molécula receptora formando una interfase (hGH-hGHbp). El área de la interfase hGH-hGHbp abarca una superficie mayor que el área del parche, sin embargo, la contribución energética a la estabilidad del complejo hGH-hGHbp depende de los residuos del parche y al cual denomina epítope funcional, Wells (1996). Por otra parte, Jones y Thornton, (1996) analizan algunos complejos proteína-proteína depositados en el PDB, estos autores proponen la presencia de un "parche hidrofóbico" en las interfases de interacción proteína-proteína, el cual permite estabilizar estos

complejos.

Así, el par toxina-canal de potasio, parece no ser la excepción en cuanto a la presencia de un parche de residuos energéticamente importantes concentrados en la interfase y que proven estabilidad al complejo. La lisina activa junto con los residuos indicados estarían formando parte de una superficie de unión, todos estos residuos se localizan en la cara de la β -plegada. Así, un grupo de cuatro o cinco aminoácidos que incluye a la lisina activa, residuos aromáticos, la metionina, los residuos de arginina y asparagina de la ChTX y la AgTX2, definirían la cara de estas toxinas cortas, que interaccionan con la región del poro de los canales de potasio dependientes de voltaje (ver Figura 18). Sin embargo, otros residuos que no se localizan en esta superficie de unión, pueden contribuir en la interacción de la toxina con el canal. La mayor parte de las interacciones entre las toxinas cortas, se darían con ciertos residuos de la base del canal de potasio (Aiyar *et al.*, 1995), mientras que, en teoría, son posibles otras interacciones entre la toxina y el canal por existir una superficie de contacto mayor a la definida por el grupo de residuos concentrados alrededor de la lisina activa de la toxina.

El mecanismo probable para la interacción de NTX con los canales Kv1.1, 1.2 y 1.3, es el mismo que para ChTX y AgTX2, por comparación de los modelos de Miller (1992) y Aiyar (1995). Así, la K28 de NTX es la lisina activa, la cual penetra en el poro del canal que conduce a los iones potasio. Los residuos de M30, N39, N31 y Y37 formarían el grupo de residuos involucrados en la estabilización de la interacción de NTX con el vestíbulo del canal (ver Figura 19). El papel de estos residuos, se tiene que demostrar con experimentos de mutagénesis dirigida, ya que, en el caso de la mutante truncada Δ YNN, se debe definir la contribución de cada uno de los tres residuos a la unión de NTX a sinaptosomas y al bloqueo del canal de potasio K_v1.1.

Correlación con datos previos. Como se indica en los antecedentes, en nuestro grupo (Gurrola *et al.*, 1989; Vaca *et al.*, 1993 y Gurrola y Possani, 1995) se demostró que péptidos de la región amino terminal de NTX, son capaces de desplazar a ¹²⁵I-NTX de las membranas sinaptosomales y de bloquear los canales de potasio dependientes de calcio de baja conductancia de células endoteliales de aorta bovina, además de ser, algunos de estos, tóxicos a ratones. El péptido mínimo de NTX que tiene actividad bloqueadora es TIINVK (IC₅₀= 495.34 μ M), el cual incluye a la lisina 6 y que se identificó en este trabajo como importante.

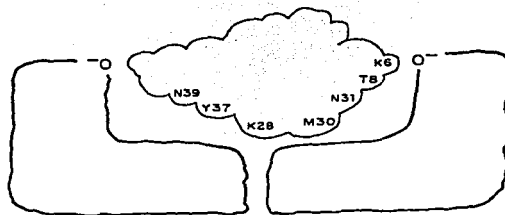


Figura 21 Modelo esquemático de la interacción NTX-canal. Este modelo se basa en el propuesto por Miller (1995). Se muestra el espacio en el vestíbulo del canal formado por las regiones del poro (P) del canal. El canal del poro se localiza en la parte central en la base del vestíbulo. Las dimensiones del canal, permiten a NTX acomodarse en el vestíbulo. La hoja β -plegada de NTX contacta la base del canal con los residuos K28, Y37, M30, N31 y N39; los residuos K6 y T8 están en un plano distinto a la hoja β -plegada y es posible que contacten a residuos de las paredes del canal.

El nonapéptido TIINVKCTS tiene actividad tóxica (200 µg/20g de peso) y de bloqueo (IC_{50} ~43.3 µM) e incluye, además de la K6, a la T8, la cual es importante en el bloqueo del canal $K_v1.1$. El eicosapéptido TIINVKCTSPKQCSKPCKEL también es tóxico (200 µg/20 g de peso) y bloquea con una IC_{50} ~4.94 µM, por lo que se puede suponer, que hay más residuos que interaccionan con el canal de potasio de baja conductancia. NTX es tóxica a ~50 µg/20g de peso y bloquea con una IC_{50} - 0.31 µM. También los péptidos del extremo amino terminal de NTX, pueden desplazar ^{125}I -NTX de las membranas sinaptosomales de rata, por ejemplo, los péptidos 1-14, 1-21 y 11-39, con una IC_{50} de 160, 800 y 250 nM respectivamente, Gurrola, (1994). En este trabajo, se demostró que la K6 y la T8 son parte de los residuos involucrados en la región amino terminal de NTX para bloquear al canal $K_v1.1$ (ver Figura 20), pero estas mismas mutantes desplazan a ^{125}I -NTX igual que NTX nativa, por lo que se puede decir que los residuos *per se*, no son importantes en la interacción con los canales sinaptosomales pero si contribuyen al bloqueo de los canales $K_v1.1$. Estos resultados ayudan a explicar por que los péptidos sintéticos de la región amino terminal de NTX son capaces de desplazar a la ^{125}I -NTX y de bloquear los canales de potasio: en estos péptidos están presentes los residuos de K6 y T8, estos pueden competir con ^{125}I -NTX, en los sitios del canal en donde la K6 y la T8 interaccionan con el canal de potasio. Los péptidos de más de nueve residuos desplazan y bloquean a menor concentración, por lo que se puede pensar que hay más residuos en el amino terminal que contribuyen en la interacción de NTX con el canal. La generación de otras mutantes puntuales en esta región de NTX ayudará a identificar estos residuos.

Estos datos son indicativos de que la porción amino terminal, aunque no forma parte de la superficie de unión concentrada alrededor de la lisina 28, si forma parte de la interfase toxina-canal, que está en contacto con el vestíbulo del poro y contribuye con los residuos K6 y T8 al bloqueo del canal $K_v1.1$. También, cabe mencionar, que los residuos que contribuyen a una interacción específica con el canal de potasio no necesariamente se concentran en la superficie de unión. En la Figura 21 se muestra un esquema hipotético de la interacción de NTX con el canal de potasio $K_v1.1$ basado en los modelos que se han propuesto para la interacción de toxinas cortas con canales de potasio dependientes de voltaje. Por lo anterior, se establece que en la región del amino terminal de NTX existen aminoácidos, K6 y T8 entre ellos, que contribuyen en la unión con los canales de potasio

K_v1.1. Sin embargo, queda por determinar la naturaleza de esta interacción y su posición relativa dentro del vestíbulo del canal. Por otra parte, para poder comparar estos resultados con los datos observados en los canales de sinaptosomas es necesario expresar esos canales en el sistema de ovocitos en donde se expresó el canal K_v1.1, ya que, la organización de los canales dependientes de voltaje, en cerebro, es compleja debido a la formación de heterotetrámeros de los canales K_v1.1 y K_v1.3.

En cuanto al papel de la porción carboxilo terminal, en experimentos previos Gurroia, (1994) se encontró que el péptido MNGKCKCYNN no desplaza a ¹²⁵I-NTX de membranas sinaptosomales, aún a concentraciones de 100 mM y no bloquea al canal de potasio de baja conductancia de células endoteliales de aorta bovina (Vaca *et al.*,1993). En el presente trabajo se demostró que la porción carboxilo terminal (YNN), si contribuye en la unión a sinaptosomas de cerebro de rata y al bloqueo de canales de potasio K_v1.1. Por comparación con los modelos de la ChTX y la AgTX, la N39 y la Y37 podrían jugar un papel funcional en esta región de NTX. Ambos residuos se localizan en la región de la β plegada. La evidencia que apoya este argumento es que en ChTX se puede identificar un residuo de Y36 y de R24 en posiciones similares y que para esta toxina se ha demostrado que estos residuos son críticos en el bloqueo del canal *Shaker* (ver Figura 18). Por lo anterior, se puede decir que la porción carboxilo terminal puede no ser importante en el bloqueo del canal de potasio de baja conductancia pero si en el bloqueo del canal K_v1.1. Así, es posible que la NTX establezca distintos contactos con los canales de potasio, lo cual podría explicar por que en el caso de un canal sea crítica la porción amino terminal, mientras que en otro sea más crítica la porción carboxilo terminal. Sin embargo, es necesario hacer la advertencia de que, la falta de la porción YNN en NTX, pueda afectar el plegamiento de la molécula, y por lo tanto, el efecto observado se deba a un plegamiento incorrecto de NTX y no al segmento YNN propiamente dicho, lo anterior se deberá comprobar por análisis de la estructura de esta variante.

En comparación con otras toxinas bloqueadoras de canales de potasio, como las toxinas de anémona, se ha descrito el papel de la lisina activa y del residuo aromático cercano a la lisina, es comparado con las toxinas de anémona marina (BgK) y (ShK) producidas por *Bunodosoma granulifera* y *Stichodactyla helianthus*. Estas toxinas bloquean canales de potasio, con un mecanismo que probablemente sea similar al de las toxinas cortas de alacrán. Sin embargo, tienen una estructura tridimensional

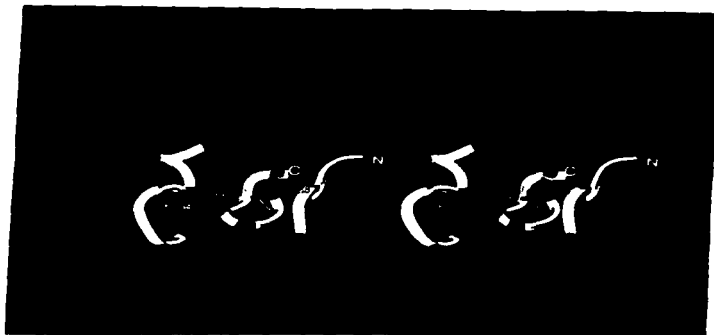


Figura 22 Superficie de unión de BgK. La toxina BgK bloquea los mismos canales de potasio que las toxinas cortas de alacrán; sin embargo, esta adopta otra conformación. En la superficie plana de BgK, que definen las dos helices (azul) se identificaron los residuos críticos (K25 y Y26) para la interacción con los canales. Así, las toxinas cortas de alacrán y algunas de anémona, con estructuras distintas, convergieron para unirse a su receptor con una lisina y un residuo aromático que son críticos en la actividad de ambos grupos de toxinas (Dauplais et al., 1997).

distinta, por que los tres puentes disulfuro se organizan de otra forma (Tudor *et al.*, 1996). Estas toxinas presentan también una cara plana que interacciona con la boca del canal de potasio, de manera similar a las toxinas de alacrán (Pennington *et al.*, 1996). Esta cara está definida por dos hélices cortas (ver Figura 22). Experimentos de mutagénesis han demostrado que la unión de estas toxinas a sus receptores depende de manera importante de una lisina, para BgK es la K25 y para ShK es la K22.

Otro residuo importante es un residuo de tirosina, en BgK es Y26 y en ShK es Y22 (ver Figura 18). Dauplais *et al.* (1997) explican que estas toxinas de anémoma convergieron funcionalmente con las toxinas cortas de alacrán, para unirse y bloquear canales de potasio dependientes de voltaje, mediante un mecanismo similar. En este caso, las toxinas de BgK y ShK adoptaron una conformación distinta, pero conservaron el residuo activo de la lisina y además un residuo aromático equivalentes a los de las toxinas de alacranes.

CONCLUSIONES

- 1.- Se demostró que, es posible la expresión en *E. coli* de NTX_r con las mismas propiedades bioactivas de la NTX nativa.
- 2.- Se demostró que, la producción de NTX recombinante en sistema de expresión heterólogo, aquí empleado, es posible obtener cantidades del orden de miligramos por litro de cultivo de la toxina recombinante. Sin embargo, se deberá de tomar en cuenta que en este sistema de expresión, no se llevan a cabo las modificaciones postraduccionales que se han detectado en las toxinas de alacrán.
- 3.- La amidación de la asparagina 39, extremo carboxilo terminal, no parece tener un papel importante en las propiedades bioactivas (toxicidad, unión a la fracción P₃ de sinaptosomas y bloqueo de los canales K_v1.1) de NTX_r.
- 4.- El enfoque del barrido por alaninas, para generar las mutantes, permitió identificar residuos específicos implicados en la interacción de la NTX_r con la fracción P₃ de cerebro de rata, y los canales de potasio K_v1.1 expresados en ovocitos.
- 5.- Se demostró que, en la región amino terminal de NTX, entre el residuo 1 y 9, hay residuos de aminoácidos (lisina 6 y treonina 8) que contribuyen con la interacción de NTX con los canales de potasio. Lo anterior permitió confirmar datos previos de nuestro laboratorio, que identifican el papel funcional del amino terminal de NTX.
- 6.- En NTX la lisina 28 es el residuo equivalente a la lisina 27 de ChTX y AgTX, en cuanto a su papel crítico en la unión a la fracción P₃ y el bloqueo de canales de potasio.
- 7.- El tripéptido del extremo carboxilo terminal Tir-Asn-Asn, parece tener un papel en la interacción con los canales de las membranas de cerebro de rata, y con el canal de potasio K_v1.1 expresado en ovocitos.

PERSPECTIVAS

a) Por el hecho de que la expresión de toxinas cortas hasta ahora ha demostrado ser viable, es posible entonces, expresar nuevas toxinas de manera funcional, sin conocer su secuencia nucleotídica y partiendo solo de la secuencia primaria para "diseñar" los genes de estas toxinas. Es posible la síntesis de nuevos genes de toxinas cortas, empleando solo un par de oligonucleótidos sin necesidad de usar varios oligos como se hizo en el presente trabajo.

b) Para definir los residuos sobre el canal de potasio, involucrados en la interacción con la toxina, es necesario generar mutantes complementarias (sobre la toxina y el canal iónico). Lo anterior permite identificar el tipo y la magnitud de las interacciones que mantienen unidas a la toxina y el canal. De lo anterior, se desprende la posibilidad de que se puedan emplear distintas toxinas afines hacia un mismo canal, y demostrar si para cada interacción toxina-canal se establecen interacciones particulares o si estas son comunes para las toxinas que afectan a los canales de potasio dependientes de voltaje.

c) Las mutaciones que detectaron residuos de interés en la capacidad de NTX_r de unirse a membranas y/o bloquear los canales K_v1.1 ahora son candidatos para caracterizar el tipo de interacción con el canal.

d) Otros residuos sobre la estructura de NTX a estudiar: son aquellos de la porción de α -hélice; los residuos alrededor de la lisina 28, la metionina 30, asparagina 31, y lisina 35. También los últimos residuos Thr 37, Asn 38 y 39 son candidatos para generar mutantes puntuales.

BIBLIOGRAFIA

- Adams, M.E., Myers, R.A., Imerial, J.S., and Olivera, B.M. 1993. Toxotyping rat brain calcium channels with ω -toxins from spider and cone snail venoms. *Biochemistry* 32: 12566-12570.
- Adelman, J.P., 1995. Proteins that interact with the pore-forming subunits of voltage-gated ion channels. *Current Opinion in Neurobiology* 5: 286-295.
- Aiyar, J., Withka, J.M., Rizzi, J.P., Singleton, D.H., Andrews, G.C., Lin, W., Boyd, J., Hanson, D. C., Simon, M., Dethlefs, B., Lee, Ch., Hall, J.E., Gutman, G. A., and Chandy, K.G. 1996. Topology of the pore-region of a K⁺ channel revealed by the NMR-derived structures of scorpion toxins. *Neuron* 15: 1169-1181.
- Aiyar, J., Rizzi, J.P., Gutman, G.A., and Chandy, K.G. 1996. The signature sequence of voltage-gated potassium channels projects into the external vestibule. *J. Biol. Chem.* 271: 31013-31016.
- Bontems, F., Roumestand, C., Gilquin, B., Ménez, A., and Toma, F. 1991. Refined structure of charybdotoxin: Common motifs in scorpion toxins and insect defensins. *Science* 254: 1521-1523.
- Bontems, F., Gilquin, B., Roumestand, C., Ménez, A., and Toma, F. 1992. Analysis of side-chain organization on a refined model of charybdotoxin: Structural and functional implications. *Biochemistry* 31: 7756-7764.
- Bouhaouala-Zahar, B., Ducancel, F., Zenouaki, I., Ben Khalifa, R., Borchani, L., Pelhate, M., Boulain, J.C., ElAyeb, M., Ménez, A., and Karoui, H. 1996. A recombinant insect-specific α -toxin of *Buthus occitanus tunetanus* scorpion confers protection against homologous mammal toxins. *Eur. J. Biochem.* 238: 653-660.
- Butler, A. Tsunoda, S., McCobb, P., Wei, A., and Salkoff, L. 1993. *mSlo*, a complex mouse gene encoding "Maxi" calcium-activated potassium channels. *Science* 261: 221-224.

Cal, Y. and Douglass, J. 1993. *In vivo* and *in vitro* phosphorylation of the T lymphocyte type n (Kv1.3) potassium channel. *J. Biol. Chem.* **268** (31): 23720-23727.

Carbone, E., Wanke, E., Prestipino, G., Possani, L.P., and Maelicke, A., 1992. Selective blockage of voltage-dependent K⁺ channels by a novel scorpion toxin. *Nature* **296**: 90-91.

Christopher Miller, 1995. The charybdotoxin family of K⁺ channel-blocking peptides. *Neuron* **15**: 5-10

Creighton, T.E. 1993. *Proteins: structures and molecular properties*. 2nd Edition. W.H. Freeman and Company, New York.

Cunningham, B. C. and Wells, J. A. 1989. High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science* **244**: 1081-1085.

Dauplais, M., Gilquin, B., Possani, L.D., Gurrola-Briones, G., Roumestand, C., and Ménez, A. 1995. Determination of the three-dimensional solution structure of noxiustoxin: Analysis of structural differences with related short-chain scorpion toxins. *Biochemistry* **34**: 16563-16573.

Dauplais, M., Lecoq, A., Song, J., Cotton, J., Jamin, N., Gilquin, B., Roumestand, C. Vite, C., de Madeiros, L.C., Rowan, E. G., Harvey, A. L., and Ménez, A. 1997. On the convergent evolution of animal toxins. *J. Biol. Chem.* **272**: 4302-4309.

Deleplere, M., Prochnika-Chalafour, A., and Possani, L. P. 1997. A novel potassium channel blocking toxin from the scorpion *Pandinus Imperator*: A ¹H NMR analysis using a nano-NMR probe. *Biochemistry* **36**: 2649-2658.

Devaux, C., Knibiehler, M., Defendini, M.L., Mabrouk, K., Rochat, H., Van Rietschoten, J., Baty, D., and Granier, C. 1995. Recombinant and chemical derivatives of apamin. Implication of post-transcriptional C-terminal amidation of apamin in biological activity. *Eur. J. Biochem.* **231**: 544-550.

- Drakopoulou, E., Cotton, J., Virelizier, H., Bernardi, E., Schoofs, A.R., Partiseti, M., Choquet, D., Gurrola, G., Possani, L.D., and Vits, C. 1995. Chemical synthesis and functional characterization of noxiustoxin, a powerful blocker of lymphocyte voltage-dependent K⁺ channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213 (3): 901-907.
- Fainzilber, M., Nakamura, T., Gaathon, A., Lodder, J. C., Kits, K. S., Burlingame, A. L., and Zlotkin, E. 1995. A new cysteine framework in sodium blocking conotoxins. *Biochemistry* 34: 8649-8656.
- Ferrer-Montiel, A.V., and Montal, M. 1994. Structure-function relations in ligand-gated ion channels: Reconstitution in lipid bilayers and heterologous expression in *Xenopus* oocytes. *Methods: A companion to methods in enzymology* 6: 60-69.
- Fernández, I., Romi, R. Szendeffy, S., Martin-Eaucclair, M.F., Rochat, H., Van Rietschoten J., Pons, M., and Giralt, E. 1994. Kallitoxin (1-37) shows structural differences with related potassium channel blockers. *Biochemistry* 33: 14256-14263.
- García-Calvo, M., Leonard, R.J. Novick, J. Stevens, S. P., Schmalhofer, W. Kaczorowski, J. G., and García, M.L. 1993. Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. *J. Biol. Chem.* 268: 18866-18874.
- García-Calvo, M., Knaus, H.G., McManus O. B., Giangiacomo K. M., Kaczorowski G. J., and García, M. L. 1994. Purification and reconstitution of the high-conductance, calcium-activated potassium channel from tracheal smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 269: 676-682.
- García, M., García-Calvo, M., Hidalgo, P., Lee, A., and MacKinnon, R. 1994. Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent K⁺ channels from *Leirus quinquestratus* var. *hebraeus* venom. *Biochemistry* 33: 6834-6839.
- Giangiacomo K.M., Garcia, M.L., and McManus, O.B. 1992. Mechanism of iberiotoxin block of the large-conductance calcium-activated potassium

channel from bovine aortic smooth muscle. *Biochemistry* **31**: 6719-6727.

Gimenez, G.G., Navia, M. A., Reuben, J. P., Katz, G. M., Kaczorowski G. J., and Garcia, M. L. 1988. Purification, sequence, and model structure of charybdotoxin, a potent selective inhibitor of calcium-activated potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 3329-3333.

Goldstein, S.A. and Miller, C. 1993. Mechanism of charybdotoxin block of a voltage-gated K⁺ channel. *Biophys. J.* **65**: 1613-1619.

Gómez-Lagunas, F., Olamendi-Portugal, T., Zamudio, F.Z., and Possani, L.D. 1996. Two Novel toxins from the venom of the scorpion *Pandinus imperator* show that the N-terminal amino-acid sequence is important for their affinities towards *Shaker* B K⁺ channels. *J. Membrane Biol.* **152**: 49-56.

Gurrola, G.B., Molinar-Rode, R., Sitges, M., Bayón, A., and Possani, L.D. 1989. Synthetic peptides corresponding to the sequence of noxiustoxin indicate that the active site of this K⁺ channel blocker is located on its amino-terminal portion. *J. Neur. Transm.* **77**: 11-20

Gurrola, G.B. 1994. Caracterización funcional y estructural de la noxiustoxina. Tesis Doctoral.

Gurrola, G.B., Possani, L.D. 1995. Structural and functional features of noxiustoxin: a K⁺ Channel blocker. *Biochem. and Mol. Biol. Int.* **37**: 527-535.

Harvey, A. L., Vatanpour, H., Rowan, E. G., Pinkasfeld, S., Vita, C., Menez, A., and Martin-Eauciaire, M.-F. 1995. Structure-activity studies on scorpion toxins that block potassium channels. *Toxicon* **33**: 425-436.

Heinemann, S. H., Rettig, J., Wunder, F., and Pongs, O. 1995. Molecular and functional characterization of a rat brain K_vβ3 potassium channel subunit. *FEBS letters* **377**: 383-389.

Heginbotham, L. and MacKinnon, R. 1992. The aromatic binding site for tetraethylammonium ion on potassium channels. *Neuron* **8**: 483-491.

- Hidalgo, P. and McKinnon, R. 1995. Revealing the architecture of a K⁺ channel pore through mutant cycles with a peptide inhibitor. *Science* **268**: 307-310.
- Hille, B. 1992. Ion channels of excitable membranes. Second Edition. Sinauer Associates INC. Publishers. Sunderland, Massachusetts, U.S.A.
- Howell, M.L. and Blumenthal K.M. 1989. Cloning and expression of a synthetic gen for *Cerebratulus lacteus*. *J. Biol. Chem.* **264**: 15268-15273.
- Johnson, B.A. and Sugg, E.E. 1992. Determination of the three-dimensional structure of iberiotoxin in solution by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **31**: 8151-8159.
- Johnson, B.A., Stevens, S.P., and Williamson, J.M. 1994. Determination of the three-dimensional structure of margatoxin by ¹H, ¹³C, ¹⁵N triple-resonance nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **33**: 15061-15070.
- Jones, S. and Thornton, J. M. 1996. Principles of protein-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** 13-20.
- Knaus, H.-G., Koch, R.O.A. Eberhart, A. Kaczorowski, G.J. Garcia, M.L., and Slaughter, R. 1995. ¹²⁵I Margatoxin, an extraordinarily high affinity ligand for voltage-gated potassium channel in mammalian brain. *Biochemistry* **34**: 13627-13634.
- Khera, P.K., Benzinger, G.R., Lipkind, G., Drum, Ch.L., Hanck, D.A., and Blumenthal, K.M. 1995. Multiple cationic residues of anthopleurin B that determine high affinity and channel isoform discrimination. *Biochemistry* **34**: 8533-8541.
- Krezel, A.M., Kasibhatla, Ch., Hidalgo, P., MacKinnon R., and Wagner G. 1995. Solution structure of the potassium channel inhibitor agitoxin 2 "Caliper" for probing channel geometry. *Protein Science* **4**: 1478-1489.
- Latorre, R. 1986. Ionic channels in cells and model systems. Plenum Press, New York, N.Y., U.S.A.

Leonard, R.J., Garcia M.L. Slaughter, R.S., and Reuben, J.P. 1992. Selective blockers of voltage-gated K⁺ channels depolarize human T lymphocytes: Mechanism of the antiproliferative effect of charybdotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 10094-10098.

Lew, M.J., Flinn, J.P., Pallaghy, P.K., Murphy, R., Whortow, S.L., Wright, C. E., Norton, R.S., and Angus, J.A. 1997. Structure-function relationship of ω -conotoxin GVIA. *J. Biol. Chem.* **272**: 12014-12023.

Lipkind, G.M., Hanck, D.A., and Fozzard, H.A. 1995. A structural motif for the voltage-gated potassium channel pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 9215-9219.

Lü, Q. and Miller, C. 1995. Silver as a probe of pore-forming residues in a potassium channel. *Science* **268**: 304-307.

McKinnon, R. 1995. Pore loops: An emerging theme in ion channel structure. *Neuron* **14**: 889-892.

Maniatis T., Fritsch, E.F., and Sambrook, K. 1982. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA.

Martínez, F., Becerril, B., Gurrola, G.B., Martín, B.M., and Possani, L.D. 1996. Synthesis and expression of the gen coding for noxiustoxin, a K⁺ channel-blocking peptide from the venom of the scorpion *Centruroides noxius*. *Toxicon* **34**: 1413-1419.

Miller, C., Moczydlowski, E., Latorre, R., and Phillips, M. 1985. Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca²⁺-activated K⁺ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature* **313**: 316-318.

Miller, C. 1991. 1990 Annus Mirabilis of potassium channels. *Science* **252**: 1092-1096.

Miller, C. 1995. The charybdotoxin family of channel-blocking peptides. *Neuron* **15**: 5-10.

- Nagai, K. and Togersen, H.Ch. 1984. *Nature* **309**: 810-812.
- Naini A.A., and Miller, C. 1996. A symmetry-driven search for electrostatic interaction partners in charybdotoxin and voltage-gated K⁺ channel. *Biochemistry* **35**: 6181-6187.
- Naranjo, D. and Miller, C. 1996. A strongly interacting pair of residues on the contact surface of charybdotoxin and a *Shaker* K⁺ channel.
- Nakamura, R.L., Anderson, J.A., and Gaber, R.F. 1997. Determination of key structural requirements of a K⁺ channel pore. *J. Bacteriol. Chem.* **272**: 1011-1018.
- Nutt, R.F., Arison, B.H., and Smith, J.S. 1992. Structure revision of the scorpion toxin noxiustoxin through total chemical synthesis. *Peptides*. C.H. Schneider and A.N. Eberte Eds. Escom Press, Leiden. pp. 101-102.
- Olamendi-Portugal, Gómez-Lagunas, F., Gurrola, G.B., and Possani, L.D. 1996. A novel structural class of K⁺-channel blocking toxin from the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochem. J.* **315**: 977-981.
- Olivera, B.M., Rivier, J., Scott, J.C., Hillyard, D.R., and Cruz, L.J. 1991. *J. Biol. Chem.* **266**: 22067-22070.
- Omecinsky, D.O., Holub, K.E., Adams, M.E., and Reilly, M.D. 1996. Three-dimensional structure analysis of μ -Agatoxins: Further evidence for common motifs among neurotoxins with diverse ion channel specificities. *Biochemistry* **35**: 2836-2844.
- Park, C.-S., Sharon, F. H., and Miller, C. 1991. Design, synthesis, and functional expression of a gen for charybdotoxin, a peptide blocker of K⁺ channels. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA.* **88**: 2046-2050.
- Park, C.-S. and Miller, C. 1992. Mapping function to structure in a channel-blocking peptide: Electrostatic mutants of charybdotoxin. *Biochemistry* **31**: 7749-7755.

Pennington, M.W., Mahnir, V.M., Zaydenberg, I., Byrnes, M.E., and Kem, W.R. 1996. An essential binding surface for ShK toxin interaction with rat brain potassium channels. *Biochemistry* **35**: 16407-16411.

Podromou, C. and Pearl, L.H. 1992. Recursive PCR: a novel technique for total gen synthesis. *Prot. Eng.* **5**: 827-829.

Possani, L.D., Martin, B.M., and Svendsen, I. 1982. The primary structure of noxiustoxin: a K channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Carsberg. Res. Commun.*, **47**: 285.

Ranganathan R., Lewis J.H., and McKinnon, R.1996. Spatial localization of the channel selectivity filter by mutant cycle-based structure analysis. *Neuron* **16**: 131-139.

Rehm, H. 1991. Molecular aspects of neuronal voltage-dependent K channels. *Eur. J. Biochem.* **202**: 701-713.

Rettig, J., Stefan, Heinemann, H., Wunder, F., Lorra, C., Parcej, D. N., Dolly, J. O., and Pongs, O. 1994. Inactivation properties of voltage-gated K channels altered by presence of β -subunit. *Nature* **369**: 289-294.

Sabatier, J.-M., Zerouk, H., Darbon, H., Mabrouk, K., Benslimane, A., Rochat, H., Martin-Eauclaire, M.-F. and Van Rietschoten, J. 1993. PO5, a new leiurotoxin I-like scorpion toxin synthesis and structure/activity relationships of the α -amidated analog, a ligand of Ca^{++} activated K channels with increased affinity, *Biochemistry* **32**, 2763-2770.

Sabatier, J.-M., Lecompte, C., Mabrouk, K., Darbon, H., Oughidendi, R., Canarelli, S., Rochat, H., Martin-Eauclaire, M.-F., and Rietschoten, J.V. 1996. Synthesis and characterization of Leiurotoxin I analogs lacking one disulfide bridge: Evidence that disulfide pairing 3-21 is not required for full toxin activity. *Biochemistry* **35**: 10641-10647.

Schmutzler, C., Darmer, D., Diekhoff, D., and Grimmelikhuijzen, J.P. 1992. Identification of a novel type of processing sites in the precursor for the sea anemone neuropeptide antho-RFamide (\leq Glu-Gly-Arg-Phe-NH₂) from *Anthopleura elegantissima*. *J. Bacteriol. Chem.* **267**: 22534-22541

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- Soman, K.V., McCammon, J.A., and Brown, A.M., 1995. Secondary structure prediction of the H5 pore of potassium channels. *Prot. Eng.* **8**: 397-401.
- Stampe, P., Partensky-Kolmakova, L., and Miller, C. 1994. Intimations of K⁺ channel structure from a complete functional map of the molecular surface of charybdotoxin. *Biochemistry* **33**: 443-450.
- Stocker, M. and Miller, C. 1994. Electrostatic distance geometry in a K⁺ channel vestibule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 9509-9513.
- Sun, T., Naini, A.A., and Miller, C. 1994. High-level expression and functional reconstitution of *Shaker* K⁺ channel. *Biochemistry* **33**: 9992-9999.
- Tudor, J.E., Pallaghy, P.K., Pennington, M.W., and Raymond, S.N. 1996. Solution structure of ShK toxin, a novel potassium channel inhibitor from sea anemone. *Nature Struct. Biol.* **3**: 317-320.
- Tytgat, J., Debont, T., Carmeliet, E., and Daenens, P. 1995. The α -dendrotoxin footprint on a mammalian potassium channel. *J. Biol. Chem.* **270**: 24776-24781.
- Vaca, L., Gurrola, G.B., Possani, L.D. and Kunze, D.L. 1993. Blockade of a K_{Ca} channel with synthetic peptides from noxiustoxin: a K⁺ channel blocker. *J. Membrane Biol.* **134**: 123-129.
- Valdivia, H.H., Smith, J.S., Martin, B.M., Coronado, R. and Possani, L.D. 1988. Charybdotoxin and noxiustoxin, two homologous peptide inhibitors of the K⁺(Ca²⁺) channel. *FEBS Letters* **226**: 280-284.
- Valdivia, H.H., Martin, B.M., Escobar, L., and Possani, L.D. 1992. Noxiustoxin and leiurotoxin III, two homologous peptide toxins with binding properties to synaptosomal membrane K⁺ channels. *Biochem. Int.* **27**: 123-129.
- Vita, C., Toma, F., and Ménez, A. 1995. Scorpion toxins as natural design scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 6404-6408.

Wells, J.A. 1991. Systematic mutational analyses of protein-protein interfaces. *Methods. Enzymol.* 202: 390-411.

Wells, J. A. 1996. Binding in the growth hormone receptor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 1-6.

Xu, X., Yu, W., Nung, Y., Jan, Y., and Li, M. 1995. Assembly of voltage-gated potassium channels. *J. Biol. Chem.* 270 (42): 24761-24768.

Zinn-Justin, S., Guennegues, M., Drakopoulou, E., Gilquin, B., Vits, C., and Ménez, A. 1996. Transfer of a β -hairpin from the functional site of snake curaremimetic toxins to the α/β scaffold of scorpion toxins: Three-dimensional solution structure of the chimeric protein. *Biochemistry* 35: 8535-8543.

ANEXOS

Anexo 1.- ARTICULO PUBLICADO:

Martínez, F., Becerril, B., Gurrola, G.B., Martín, B.M., and Possani, L.P. 1996. SYNTHESIS AND EXPRESSION OF THE GEN CODING FOR NOXIUSTOXIN A K-CHANNEL-BLOCKING PEPTIDE FROM THE VENOM OF THE SCORPION *CENTRUROIDES NOXIUS*. *Toxicon* 34: 1413-1419.

En este artículo se describe el diseño, la síntesis y la expresión de la NTX, (Noxiustoxina recombinante).



SYNTHESIS AND EXPRESSION OF THE GENE
CODING FOR NOXIUSTOXIN, A K⁺
CHANNEL-BLOCKING PEPTIDE FROM THE VENOM
OF THE SCORPION *CENTRUROIDES NOXIUS*

FERNANDO MARTINEZ,¹ BALTAZAR BECERRIL,¹
GEORGINA B. GURROLA,¹ BRIAN M. MARTIN² and
LOURIVAL D. POSSANI^{1*}

¹Department of Molecular Recognition and Structural Biology, Biotechnology Institute, National Autonomous University of Mexico, Avenida Universidad 2001, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271, Mexico; and ²Unit on Molecular Structures, Clinical Neuroscience Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD 20892, U.S.A.

(Received 6 October 1995; accepted 23 November 1995)

F. Martínez, B. Becerril, G. B. Gurrola, B. M. Martin and L. D. Possani. Synthesis and expression of the gene coding for noxiustoxin, a K⁺ channel-blocking peptide from the venom of the scorpion *Centruroides noxius*. *Toxicol* 34, 1413-1419, 1996.—A set of six synthetic overlapping oligonucleotides coding for noxiustoxin were coupled into a continuous DNA fragment by means of recursive polymerase chain reaction. The polymerase chain reaction product was digested with *SalI* and *HindIII*, ligated into the *E. coli* vector pCSP105 and expressed as a fusion protein. The fusion protein was purified and digested with trypsin and the hydrolysis products were separated by high-performance liquid chromatography. Approximately 1.3 mg of recombinant noxiustoxin per liter of culture was obtained. Amino acid analysis and N-terminal amino acid sequence of the recombinant noxiustoxin confirmed the nucleotide sequence of the cloned DNA. Binding experiments using rat brain synaptosomal membranes revealed that recombinant noxiustoxin displaced bound radioactive native NTX with a similar efficiency to cold native noxiustoxin. Copyright © 1996 Elsevier Science Ltd

INTRODUCTION

Noxiustoxin (NTX) a 39 amino acid peptide purified from the venom of the Mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann (Possani *et al.*, 1982), was the first animal toxin described as a specific K⁺ channel blocker (Carbone *et al.*, 1982). NTX can reversibly block several types of K⁺ channels, including the delayed rectifier (Carbone *et al.*, 1982), voltage-gated K⁺ channels from human T-lymphocytes (Sands *et al.*, 1989), Cu²⁺-activated K⁺ (K_{Ca}) channels from skeletal muscle (Valdivia *et al.*, 1988) and

*Author to whom correspondence should be addressed.

whole-cell K_{Ca} currents from bovine aortic endothelial cells, but not the inward rectifier (Colden-Stanfield *et al.*, 1990).

We have shown that the synthetic peptides corresponding to the amino acid sequence 1-9, 1-20 and 1-39 are toxic to mice, producing similar effects to those induced by injection of native NTX, including neurotransmitter release through K^+ channels (Gurrola *et al.*, 1989). These results suggest that the amino-terminal segment of NTX might be involved in channel blocking. We have also shown that region 1-6 is the minimum sequence required to block a K_{Ca} channel from bovine aortic endothelial cells (Vaca *et al.*, 1993). Recent binding and displacement experiments on rat brain synaptosomes, using synthetic peptides and NTX modified either enzymatically or chemically, revealed that the N-terminal segment including part of the α -helix is implicated in the recognition of brain K^+ channels (Gurrola and Possani, 1995).

Recently, our interest has been focused on the synthesis and expression of the DNA region encoding NTX to study further the structure-function relationships by generating different mutant NTXs using site-specific mutagenesis of the synthetic DNA coding for native NTX.

In this paper we report the synthesis and expression of the DNA segment encoding NTX. We also present some results on the biological properties of the recombinant NTX compared with those of native NTX.

MATERIALS AND METHODS

Design and synthesis of oligonucleotides

A set of six oligonucleotides used for the synthesis of the DNA encoding NTX [Fig. 1(a)] was designed from the nucleotide sequence derived from the amino acid sequence of NTX (Possani *et al.*, 1982). This nucleotide sequence was obtained using the 'backtranslate' program of the software package (Genetics Computer Group,

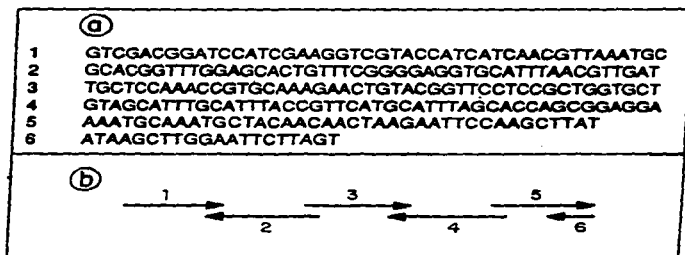


Fig. 1. Strategy for the synthesis of the DNA segment encoding NTX. (a) Nucleotide sequence of the six oligonucleotides used for the synthesis of the DNA segment encoding NTX; (b) array of the six oligonucleotides forming a partially double-stranded DNA. Arrowheads indicate 3' ends of the corresponding oligonucleotides.

GCG) from the University of Wisconsin (Madison, WI, U.S.A.). The nucleotide sequence was requested to contain the preferential codon usage for *E. coli*.

The oligonucleotides were synthesized on a PerSeptive Biosystems Expedite Model 8905 nucleic acid synthesis system using standard cyanomethyl phosphoramidite chemistry.

Synthesis, cloning and expression of the DNA segment encoding noxiustoxin

The method of recursive polymerase chain reaction (PCR) described by Prodanov and Pearl (1992) was applied for the synthesis of the DNA segment encoding NTX [Fig. 1(b)]. The PCR product was digested with *SalI* and *HindIII* and ligated into the expression vector pCSP105 (kindly provided by Dr Christopher Miller; Park *et al.*, 1991) cut with the same restriction enzymes. The nucleotide sequence of the cloned PCR product was determined on both strands by means of the Sequenase[®] kit (U.S. Biochemicals, Cleveland, OH, U.S.A.). Expression of NTX was done in *E. coli* strain BL21 (DE3) (also provided by Dr Miller). NTX was expressed after IPTG induction as a fusion protein with the product of gene 9 of bacteriophage T7. The region encoding this fusion protein is under the control of the T7 promoter (Park *et al.*, 1991).

Purification of recombinant noxiustoxin

Fusion protein was folded and purified as described by Park *et al.* (1991). A sample of the folded fusion protein (517 µg) was digested with trypsin (5 µg/mg of fusion protein; Sigma Chemical Co., St Louis, MO, U.S.A.) for 12 hr at 37°C. Recombinant NTX was purified by column chromatography (0.9 × 30 cm) using the cation-exchange resin carboxymethyl-Cellulose (CM-Cellulose), equilibrated and developed with 50 mM phosphate buffer, pH 6.0, using a linear gradient from 0 to 0.3 M NaCl (Possani *et al.*, 1982). Pooled fractions containing recombinant NTX were desalted by Sephadex G-10 filtration and finally purified by high-performance liquid chromatography (HPLC) on a C₁₈ reverse-phase semipreparative column (Vydac, Hesperia, CA, U.S.A.). The final yield of NTX was 1.5 mg per liter of culture. A mixture of purified recombinant and native NTX was separated by HPLC on a C₁₈ analytical column to compare the retention times.

Binding and displacement on rat brain synaptosomes

Rat brain synaptosome membranes (fraction P3) were prepared essentially as described previously (Catterall *et al.*, 1979). Radiolabelling of NTX (Morrison and Bayse, 1970) and binding to P3 were performed as described by Valdivia *et al.* (1992).

RESULTS AND DISCUSSION

Recursive polymerase chain reaction

PCR reaction gave a product of approximately 160 base pairs (bp) which were of the size expected according to the stretch covered by synthetic oligonucleotides (data not shown).

Nucleotide sequence of the synthetic DNA encoding noxiustoxin

The nucleotide sequence of the coding strand from the cloned PCR product is shown in Fig. 2. The amino acid sequence of recombinant NTX was deduced from the nucleotide sequence, and corresponded residue for residue to the reported sequence of NTX (Possani *et al.*, 1982).

Expression and purification of recombinant noxiustoxin

The results of expression and purification of the fusion protein were similar to those described for charybdotoxin (CTX) by Park *et al.* (1991). Although the cloned synthetic sequence was designed to be cleaved specifically by the action of a protease (factor Xu),


```

      1                               5
GTC GAC GGA TCC ATC GAA GGT CGT ACC ATC ATC AAC GTT AAA TGC
Val Asp Gly Ser Ile Glu Gly Arg Thr Ile Ile Asn Val Lys Cys

      10                               15                               20
ACC TCC CCG AAA CAG TGC TCC AAA CCG TGC AAA GAA CTG TAC GGT
Thr Ser Pro Lys Gln Cys Ser Lys Pro Cys Lys Glu Leu Tyr Gly

      25                               30                               35
TCC TCC GCT GGT GCT AAA TGC ATG AAC GGT AAA TGC AAA TGC TAC
Ser Ser Ala Gly Ala Lys Cys Met Asn Gly Lys Cys Lys Cys Tyr

      39
AAC AAC TAA GAA TTC CAA GCT TAT
Asn Asn End

```

Fig. 2. Nucleotide sequence of the synthetic DNA encoding NTX. The nucleotide sequence of the coding strand of the product of recursive PCR cloned in plasmid pCSP105 is shown. Below the nucleotide sequence, the deduced amino acid sequence is given. The numbers indicate the position of the amino acid residues of recombinant NTX. A TAA stop codon that was included as part of the synthetic DNA segment encoding recombinant NTX follows the last codon (AAC; asparagine).

we decided to use trypsin because it is less costly and provides the same final products. A small sample of the hydrolysis mixture was separated on a C_{18} semipreparative column and the components close to the retention times of the native NTX were recovered and identified using polyclonal antibodies against native NTX. The HPLC component closest to the retention time of native NTX gave the strongest cross-reaction with polyclonal antisera (data not shown), compared with other components that were also recognized. This fraction was subjected to amino acid and sequence analysis. The first 28 amino acid residues of recombinant NTX were confirmed by Edman degradation using a model 6400/6600 Prosequencer from Milligen (Division of Millipore Co., Millford, MA, U.S.A.; data not shown). Amino acid analysis provided results similar to those obtained for native NTX (data not shown). These results are in agreement with the nucleotide sequence determined on both strands of cloned DNA (Fig. 2).

Retention times on HPLC of recombinant and native noxiustoxins

A slight difference in retention times (HPLC C_{18} reverse-phase analytical column) was detected between recombinant (24.68 min) and native (24.16 min) NTXs (Fig. 3). Although the difference in retention times was minimal, it was sufficiently significant to resolve two different peaks on the chromatogram. This phenomenon has also been observed by others (Nutt *et al.*, 1993) when native NTX has been compared to synthetic NTX. These authors found a shift to a higher retention time for synthetic NTX containing a free carboxyl C-terminal, by 0.38 min using a C_{18} column. Synthetic NTX amidated at

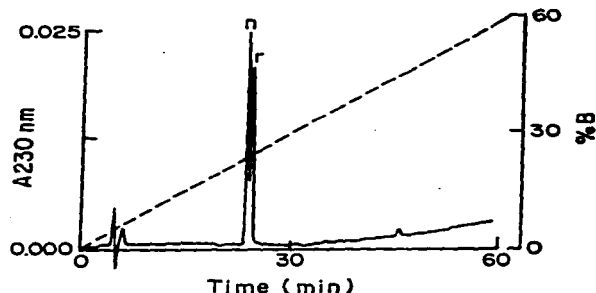


Fig. 3. HPLC separation of purified recombinant and native NTXs. A mixture of recombinant (10 μ g) and native (17.5 μ g) NTXs was loaded on to a C_{18} analytical reverse-phase column. The elution was obtained with a gradient from 0.12% trifluoroacetic acid in water to 60% acetonitrile in the presence of 0.10% trifluoroacetic acid, and developed for 1 hr. The retention times for native (n) and recombinant (r) NTXs were 24.16 min and 24.68 min, respectively.

the carboxyl-end (uspuragine-amide) had the same retention time as native NTX (Nutt *et al.*, 1993), suggesting that native NTX was amidated. In our case, using a C_{18} column reverse-phase column, we detected a shift of 0.52 min between native and recombinant NTX. Thus, we assume that neither the synthetic nor the recombinant NTX is amidated at the carboxyl-end, while the native NTX is.

Binding and displacement of recombinant noxiustoxin on rat brain synaptosomal membranes

Recombinant NTX (NTX_r) displaced labelled native NTX (¹²⁵I-NTX_n) from synaptosome membranes in a very similar manner to cold native NTX displaced labelled NTX_n (Fig. 4). These results indicate that NTX_r and NTX_n are functionally identical in their binding properties to rat brain synaptosomes and also indicate that the amidation of the C-terminus is not essential for the NTX-binding capacity.

In conclusion, this paper shows that recombinant NTX had chemical and functional properties identical to those of native NTX. The DNA segment encoding NTX can be mutagenized to obtain a set of variants of NTX to study further the structure-function relationships.

- Possani, L. D., Martin, B. M. and Svendsen, I. (1982) The primary structure of noxiustoxin: a K channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Carlsberg Res. Commun.* **47**, 285-289.
- Prodromou, C. and Pearl, L. H. (1992) Recursive PCR: a novel technique for total gene synthesis. *Prot. Engng* **5**, 827-829.
- Sande, S. B., Lewis, R. S. and Cahalan, M. D. (1989) Charybdotoxin blocks voltage-gated K⁺ channels in human and murine T lymphocytes. *J. gen. Physiol.* **93**, 1061-1074.
- Vaca, L., Gurrula, C. B., Possani, L. D. and Kunze, D. L. (1993) Blockade of a K_v channel with synthetic peptides from noxiustoxin: a K⁺ channel blocker. *J. membrane Biol.* **134**, 123-129.
- Valdivia, H. H., Smith, J. S., Martin, B. M., Coronado, R. and Possani, L. D. (1988) Charybdotoxin and noxiustoxin, two homologous peptide inhibitors of the K_v channel. *Fedn Eur. Biochem. Soc. Lett.* **2**, 280-284.
- Valdivia, H. H., Martin, B. M., Escobar, L. and Possani, L. D. (1992) Noxiustoxin and icierotoxin III: two homologous peptide toxins with binding properties to synaptosomal K⁺ channels. *Biochem. Int.* **27**, 953-960.

Anexo 2.- Condiciones de PCR recursivo para sintetizar NTX, según el método descrito por Podromou y Peari (1992).

Las concentraciones de los oligonucleótidos empleados fueron:

Oligonucleótido #1	30 picomoles
Oligonucleótido #2	0.3 picomoles
Oligonucleótido #3	0.3 picomoles
Oligonucleótido #4	0.3 picomoles
Oligonucleótido #5	0.3 picomoles
Oligonucleótido #6	30 picomoles

Las condiciones de reacción de PCR fueron:

En un volumen final de	100 μ L
Buffer para Vent™ polimerasa	10 μ L
Sulfato de magnesio 100mM	6 μ L
dNTP's	16 μ L
Oligonucleótidos	
H ₂ O	
Vent™ polimerasa	1 μ L

Programa para llevar a cabo la reacción de PCR recursiva:

Un ciclo
95 °C 1 minuto

Durante 30 ciclos se lleva a cabo el siguiente programa
95 °C 2 minutos
43 °C 2 minutos
72 °C 1 minuto

Al final de los 30 ciclos se agrega un intervalo de 10 minutos a 72 °C para que terminen de sintetizarse las cadenas incompletas.

Anexo 3.- Oligonucleótidos empleados para la síntesis de variantes de NTX, en el extremo amino terminal:

Oligonucleótido #1 (T1A)
CGGATCCATCGAAGGTCGTGCTATCATCAAC
Oligonucleótido #2 (I2A)
CGGATCCATCGAAGGTCGTACCGCTATCAACGTT
Oligonucleótido #3 (I3A)
CGGATCCATCGAAGGTCGTACCATCGCTAACGTTAAATGC
Oligonucleótido #4 (N4A)
CGGATCCATCGAAGGTCGTACCATCATCGCTGTTAAATGCACC
Oligonucleótido #5 (V5A)
CGGATCCATCGAAGGTCGTACCATCATCAACGCTAAATGCACCTCC
Oligonucleótido #6 (K6A)
CGGATCCATCGAAGGTCGTACCATCATCAACGTTGCTTGCACCTCCCCG
Oligonucleótido #7 (C7A)
CGGATCCATCGAAGGTCGTACCATCATCAACGTTAAAGCTACCTCCCCG
Oligonucleótido #8 (T8A)
CGGATCCATCGAAGGTCGTACCATCATCAACGTTAAATGCGGTTCCCCGAAA
Oligonucleótido #9 (S9A)
CGGATCCATCGAAGGTCGTACCATCATCAACGTTAAATGCACCGCTCCGAAACAG

El triplete GCT(Alanina, A) indicado en negritas indica la sustitución por el codón original en cada oligonucleótido y se expresa entre paréntesis en código de una letra para aminoácidos.
Oligonucleótidos para las modificaciones en el carboxilo terminal de NTX,:

M30L
GTAGCATTGGCATTACCGTTCAAGCATTAGCACCAGCGGAGGA

ΔYNN (DELECIÓN DE LOS ÚLTIMOS TRES RESIDUOS DE NTX)
GCATTTGCATTACCGTTCATGCATTAGCACCAGCGGAGGA

LYS28ARG
GTAGCATTGGCATTACCGTTCATGCACGGAAGCACCAGCGGAGGA

LYS28GLU
GTAGCATTGGCATTACCGTTCATGCAGAGAGCACCAGCGGAGGA

Anexo 4.- Condiciones de PCR para generar variantes de NTX,

Para cada una de las mutantes en el amino terminal se empleo el gen NTX, como molde para incertar una mutación puntual. Se emplearon los oligonucleótidos mutagénicos descritos en el anexo B. En el caso particular de las mutantes K28R, K28E y M30L se emplearon las condiciones de PCR recursiva descritas en A.

Oligonucleótido mutagénico	20 nanomolas
Oligonucleótido #6	20 nanomolas
Gen NTX,	5 nanomolas
dNTP's	5 µL
Buffer Vent	5 µL
H ₂ O	35 µL
Enzima Vent Polimerasa	1 µL