

00581  
5



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE RECONOCIMIENTO  
MOLECULAR Y BIOESTRUCTURA

## *ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE TOXINAS DE ALACRÁN CON CANALES DE SODIO.*

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

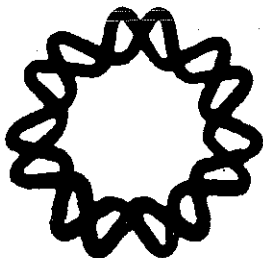
PRESENTA:  
M. en C. Martha Eugenia Ramírez Domínguez

ASESORES:  
DR. LOURIVAL DOMINGOS POSSANI POSTAY  
DR. FROYLÁN MIGUEL GÓMEZ LAGUNAS

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

CUERNAVACA, MOR.

2002.





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

COMITÉ TUTORAL:

DR. ALBERTO DARSZÓN ISRAEL (IBT - UNAM),  
DR. LUIS ALFONSO VACA DOMÍNGUEZ (IFC - UNAM),  
DR. UBALDO GARCÍA HERNÁNDEZ (FISIOLOGÍA - CINVESTAV)

JURADO DE EXAMEN:

DR. BALTAZAR BECERRIL LUJÁN (IBT - UNAM)  
DR. FROYLÁN MIGUEL GÓMEZ LAGUNAS (FAC. MEDICINA - UNAM)  
DR. DIEGO RICARDO FÉLIX GRIJALVA (FISIOLOGÍA - CINVESTAV)  
DRA. CLAUDIA TREVIÑO SANTA CRUZ (IBT - UNAM)  
DR. JOEL OSUNA QUINTERO (IBT - UNAM)  
DR. ENRIQUE REYNAUD (IBT - UNAM)

La Belleza  
Luis Eduardo Aute

Enemigo de la guerra  
Y su reverso, la medalla,  
No propuse otra batalla  
Que librar al corazón  
De ponerse cuerpo a tierra  
Bajo el peso de una historia  
Que iba a alzar hasta la gloria  
El poder de la razón  
Y ahora que ya no hay trincheras,  
El combate es la escalera  
Y el que trepe a lo más alto  
Pondrá a salvo su cabeza  
Aunque se hunda en el asfalto  
La belleza

Míralos como reptiles,  
Al acecho de la presa,  
Negociando en cada mesa  
Maquillajes de ocasión;  
Siguen todos los raiiles,  
Que conduzcan a la cumbre  
Locos porque no  
Se deslumbré  
Su parásita ambición  
Antes iban de profetas  
Y ahora el éxito es su meta,  
Meercaderes, traficantes,  
Más que náusea dan tristeza,  
No rozaron ni un instante  
La belleza

Y me hablaron de futuros  
Fraternales, solidarios  
Donde todo lo falsario  
Acabaría en el pilón  
Y ahora que se cae el muro  
Ya no somos tan iguales  
Tanto tienes, tanto vales,  
Viva la revolución  
Reivindico el espejismo  
De intentar ser uno mismo,  
Ese viaje hacia la nada  
Que consiste en la certeza  
De encontrar en tu mirada  
La belleza

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL LABORATORIO DEL  
DR. LOURIVAL POSSANI, BAJO LA DIRECCIÓN DEL  
DR. FROYLÁN GÓMEZ LAGUNAS,  
DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA EN LA  
FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNAM,  
Y EN COLABORACIÓN CON EL  
DR. UBALDO GARCÍA HERNÁNDEZ  
DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS DEL  
CINVESTAV.

PARA EL DESARROLLO DE ESTA TESIS SE CONTÓ CON EL APOYO  
FINANCIERO  
DE LOS SIGUIENTES ORGANISMOS:

- I) CONACYT, 31691 - N Y Z - 005
- II) DGAPA- UNAM, IN 216900
- III) HOWARD HUGHES MEDICAL INSTITUTE, DONATIVO 5500574
- IV) BECA CRÉDITO PARA ESTUDIOS DE DOCTORADO CONACYT, NO.  
86904.

*DEDICATORIA:*

*A MIS PADRES FROILÁN Y AURISTELA,  
ASI COMO A MIS HERMANOS POR TODO SU APOYO.*

*AL DR. UBALDO GARCÍA HERNÁNDEZ,*

*POR SU APOYO DIRECTO EN MIS INICIOS EN ELECTROFISIOLOGÍA,  
Y SOBRETUDO DURANTE PARTE IMPORTANTE EN EL DESARROLLO DEL DOCTORADO.*

*MI AGRADECIMIENTO TOTAL.*

*AL DR. VÍCTOR CALDERÓN SALINAS,*

*POR SU APOYO INDIRECTO DESDE MIS INICIOS EN EL POSGRADO.  
POR SU FUERTE INFLUENCIA PARA LOGRAR LAS METAS QUE ME PROPONGA.*

*POR SU APOYO EN LOS MOMENTOS CRITICOS DE ESTE PROCESO,  
MI ADMIRACIÓN Y RESPETO.*

## AGRADECIMIENTOS:

- AL DR. LOURIVAL POSSANI POR SU APOYO ECONÓMICO Y CONSEJOS.
- AL DR. FROYLÁN GÓMEZ LAGUNAS POR BRINDARME SU ASESORÍA Y EXPERIENCIA ACADÉMICA.
- AL DR. RICARDO FÉLIX POR SU APOYO PARA CULMINAR ESTA ETAPA Y SU ESTÍMULO PARA CONTINUAR CON LAS SIGUIENTES.
- A LOS DRS. CONSUELO GARCÍA, BÁRBARA SELISKO, ALFREDO TORRES, RENAUD CONDE, RICARDO DE LA VEGA Y JOSÉ LUIS QUINTANAR STEPHANO (UAA) POR SU COLABORACIÓN, CONSEJOS, ESTÍMULO Y GRAN AMISTAD.
- A TODOS MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO: ADRI, BALTA, BLANCA, CÉSAR, CIPRI, ERNE, FREDY, GINA, LIDIA, LILIANA, LINDA, LUIS, MARÍA, MARISOL, PAVEL, RIVE, TIMO Y ZAM.
- A LOS "IBETOS" Y LOS "ZACATENCOS" POR MANTENER LA DOSIS DIARIA DE HUMOR.

## ABREVIATURAS

A	alanina
Å	Angstroms
a.a	aminoácidos
Ap-A, -B	toxina de araña <i>Anthopleura</i> contra CSDV tipos A y B
ATX	toxina de anémona contra CSDV
BTX	Batracotoxina
C	cisteína
Cn2	toxina 2 de <i>Centruroides noxius</i> contra CSDV
Cn11	toxina 11 de <i>Centruroides noxius</i> contra CSDV
CSDV	canales de Na <sup>+</sup> dependientes del voltaje
D	ác. Aspártico.
DEKA	locus del filtro de selectividad de los CSDV
DL <sub>50</sub>	dosis letal media
DNAc	DNA complementario
DRG	neuronas del ganglio de raíz dorsal
DI-DIV	dominios repetidos de los canales de Na <sup>+</sup> dependientes de voltaje
E	ác. Glutámico
hH1	isoforma del canal de sodio de músculo cardíaco humano
hSkM1	isoforma del canal de sodio de músculo esquelético humano
h <sup>∞</sup>	inactivación en el estado estacionario de los canales iónicos.
IFM	dominio estructural de la compuerta de inactivación de los CSDV
K	lisina
KcsA	canal de K <sup>+</sup> prototípico de la bacteria <i>Streptomyces lividans</i>
Kd	constante de disociación en el equilibrio
kDa	kiloDaltones
LqTXV	toxina 5 de <i>Leiurus quinquestriatus</i> contra CSDV.
ms	milisegundos
mV	millivoltios
μ-CTX	mu-conotoxina
μg	microgramos
μ M	micromolar
nA	nanoamperios
nM	nanomolar
P <sub>i</sub>	permeabilidad iónica relativa
RMN	resonancia magnética nuclear
RNA <sub>m</sub>	RNA mensajero
SCNB1	gene de la subunidad b1 del canal de Na <sup>+</sup>
S1-S6	segmentos transmembranales 1 a 6
S4	segmento transmembranal del sensor de voltaje
STX	Saxitoxina
Ts γ	toxina gama de <i>Tityus serrulatus</i> contra CSDV
TTX	Tetrodotoxina
TTX-R	resistente a TTX
VP	veneno paralizante, sinónimo de saxitoxina
Y	tirosina



## LISTA DE FIGURAS.

<b>Figura 1. Estados cinéticos de los canales iónicos dependientes del voltaje transmembranal.</b>	<b>3</b>
<b>Figura 2. Topología de la subunidad <math>\alpha</math> del canal de <math>\text{Na}^+</math> del cerebro de rata (tipo IIA), deducida de estudios de análisis de hidropatía, mutagénesis y de anticuerpos.</b>	<b>7</b>
<b>Figura 3. Las subunidades accesorias <math>\beta</math> interactúan con la subunidad <math>\alpha</math>.</b>	<b>9</b>
<b>Figura 4. Modelo de la región del poro del canal de <math>\text{Na}^+</math> y el sitio de unión a TTX y STX.</b>	<b>11</b>
<b>Figura 5. Modelo de operación del sensor de voltaje.</b>	<b>12</b>
<b>Figura 6. Partículas de inactivación de los canales iónicos dependientes de voltaje.</b>	<b>14</b>
<b>Figura 7. Estructura de la compuerta de inactivación de los CSDV.</b>	<b>15</b>
<b>Figura 8. Modelo del segmento P de los CSDV desarrollado por Lipkind y Fozzard .</b>	<b>19</b>
<b>Figura 9. <i>Leiurus quinquestriatus</i>, modelo de LqTxV y sitio de unión al CSDV.</b>	<b>22</b>
<b>Figura 10. Alacrán <i>Centruroides noxius</i> Hoffman, y efecto de una toxina <math>\beta</math> sobre corrientes de <math>\text{Na}^+</math></b>	<b>24</b>
<b>Figura 11. Grupos de toxinas para CSDV.</b>	<b>26</b>
<b>Figura 12. Perfiles cromatográficos de la purificación de las toxinas Cn2 y Cn11.</b>	<b>31</b>
<b>Figura 13. Cultivo primario de neuronas de crustáceo.</b>	<b>33</b>
<b>Figura 14. Mapa del plásmido pcDNA3.</b>	<b>43</b>
<b>Figura 15. Efecto de Cn11 sobre las corrientes de <math>\text{Na}^+</math> en neuronas en cultivo Del0 OX del acocil <i>Procambarus clarkii</i>.</b>	<b>37</b>
<b>Figura 16 . Corrientes de <math>\text{Na}^+</math> registradas a 0 mV en presencia y en ausencia de Cn11.</b>	<b>38</b>
<b>Figura 17. El efecto de Cn11 sobre la corriente de <math>\text{Na}^+</math> en neuronas de acocil es dependiente del tiempo y de la concentración de la toxina.</b>	<b>39</b>

<b>Figura 18. Valor de <math>K_m</math> determinado para Cn11 sobre los canales de <math>Na^+</math> en neuronas del XO de <i>Procambarus clarkii</i>.</b>	<b>40</b>
<b>Figura 19. Cn11 no modifica la dependencia al voltaje de los canales neuronales de <math>Na^+</math> de <i>Procambarus clarkii</i>.</b>	<b>41</b>
<b>Figura 20. Efecto de Cn2 sobre las corrientes de <math>Na^+</math> a través de los canales rSkM1 expresado en las células HEK293.</b>	<b>42</b>
<b>Figura 21. Efecto de Cn2 sobre la cinética de las corrientes de <math>Na^+</math> a través de canales rSkM1 en células HEK293.</b>	<b>43</b>
<b>Figura 22. Cn2 no desplaza el voltaje de activación de los canales rSkM1 hacia voltajes hiperpolarizados</b>	<b>44</b>
<b>Figura 23. Cn2 no modifica la inactivación de los canales de <math>Na^+</math> de mamíferos.</b>	<b>45</b>
<b>Figura 24. Efecto de la frecuencia de estimulación sobre el bloqueo de Cn2.</b>	<b>46</b>
<b>Figura 25. El bloqueo de Cn2 sobre los canales rSkM1 es dependiente del voltaje.</b>	<b>47</b>
<b>Figura 26. Curva dosis-respuesta y <math>K_d</math> estimada para la toxina Cn2.</b>	<b>48</b>
<b>Figura 27. Porcentaje de identidad al comparar las toxinas tipo para CSDV de cada grupo con Cn11.</b>	<b>53</b>
<b>Figura 28. Estructura de los segmentos S5-S6 en los CSDV.</b>	<b>56</b>
<b>Figura 39. Modelo de la <math>\mu</math>-CTX y su interacción con el CSDV.</b>	<b>57</b>
<b>Figura 30. Superposición hipotética del modelo de la toxina Cn2 al vestibulo externo del poro del CSDV.</b>	<b>62</b>

## LISTA DE TABLAS.

<b>Tabla 1. Distintos genes, expresión tisular preferencial y sensibilidad a la tetrodotoxina (TTX) de los CSDV.</b>	<b>6</b>
<b>Tabla 2 Sitios receptores de neurotoxinas en los CSDV.</b>	<b>17</b>

## INDICE.

<b>RESUMEN.</b>	<b>1</b>
<b>Summary.</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCION.</b>	<b>3</b>
<b>Generalidades.</b>	<b>3</b>
<b>Canales de sodio voltaje dependientes (CSVD).</b>	<b>4</b>
<b>Las subunidades <math>\alpha</math> de los CSVD.</b>	<b>7</b>
<b>Estructura y topología de los CSVD.</b>	<b>5</b>
<b>Las subunidades accesorias <math>\beta</math>.</b>	<b>7</b>
<b>Dominios estructurales involucrados en los mecanismos de permeación y <i>gating</i> de CSVD.</b>	<b>9</b>
<b>El vestíbulo externo y el filtro de selectividad.</b>	<b>9</b>
<b>El sensor de voltaje y la compuerta de activación.</b>	<b>11</b>
<b>El vestíbulo interno y la compuerta de inactivación.</b>	<b>13</b>
<b>Farmacología de los CSVD: sitios de unión a neurotoxinas.</b>	<b>16</b>
<b>Sitio receptor 1: TTX, STX y <math>\mu</math>-conotoxina.</b>	<b>16</b>
<b>Analogías entre las toxinas bloqueadoras de los CSVD.</b>	<b>20</b>
<b>Sitio receptor 3: toxinas de anémona marina, toxinas <math>\alpha</math> de alacrán y toxinas de arañas.</b>	<b>21</b>
<b>Sitio receptor 4: toxinas <math>\beta</math> de alacrán.</b>	<b>23</b>
<b>Características de las toxinas de alacrán que actúan sobre CSVD.</b>	<b>24</b>
<b>Antecedentes inmediatos.</b>	<b>27</b>
<b>OBJETIVOS.</b>	<b>29</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>30</b>
<b>Fase bioquímica.</b>	<b>30</b>
<b>Material biológico.</b>	<b>30</b>
<b>Purificación de las toxinas y pruebas de letalidad.</b>	<b>30</b>
<b>Purificación de la toxina Cn2.</b>	<b>30</b>
<b>Purificación de la toxina Cn11.</b>	<b>32</b>
<b>Fase de cultivos celulares.</b>	<b>32</b>
<b>Cultivo primario de neuronas de acocil.</b>	<b>32</b>
<b>Cultivo de células de mamífero y transfección del DNAC del canal de <math>\text{Na}^+</math> rSkM1.</b>	<b>33</b>
<b>Fase electrofisiológica.</b>	<b>34</b>
<b>Registro de corrientes de <math>\text{Na}^+</math> en neuronas de acocil.</b>	<b>34</b>
<b>Registro de corrientes a través del canal de <math>\text{Na}^+</math> rSkM1 en células HEK293.</b>	<b>35</b>
<b>RESULTADOS.</b>	<b>36</b>

<b>Efecto de Cn11 sobre canales de Na<sup>+</sup> nativos en neuronas de acocil en cultivo.</b>	<b>37</b>
<b>Cn11 no modifica el <i>gating</i> de los canales de Na<sup>+</sup> del acocil.</b>	<b>38</b>
<b>El efecto de Cn11 sobre la corriente de Na<sup>+</sup> en neuronas de acocil depende de la concentración.</b>	<b>38</b>
<b>Determinación de la Km para el bloqueo de Cn11 sobre los canales neuronales de Na<sup>+</sup> de acocil.</b>	<b>40</b>
<b>Cn11 no modifica la dependencia al voltaje de los canales de Na<sup>+</sup> neuronales de crustáceos.</b>	<b>40</b>
<b>Efecto de Cn2 sobre canales de Na<sup>+</sup> rSkM1 expresados en HEK293.</b>	<b>41</b>
<b>Cn2 no modifica el <i>gating</i> de los canales de Na<sup>+</sup> rSkM1 en células HEK293.</b>	<b>43</b>
<b>El efecto bloqueador de Cn2 sobre rSkM1 no depende de la frecuencia del estímulo ni del voltaje.</b>	<b>45</b>
<b>Relación dosis-respuesta y determinación de la Kd del bloqueo por Cn2 de los canales de Na<sup>+</sup> rSkM1.</b>	<b>47</b>
<b>DISCUSIÓN.</b>	<b>49</b>
<b>Relación de la estructura primaria de Cn2 y Cn11 con los grupos de toxinas de alacrán contra CSVD.</b>	<b>52</b>
<b>Determinantes moleculares de la interacción de las neurotoxinas con los CSDV.</b>	<b>54</b>
<b>CONCLUSIONES.</b>	<b>60</b>
<b>PERSPECTIVAS.</b>	<b>61</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.</b>	<b>63</b>
<b>ANEXO</b>	<b>73</b>

## RESUMEN.

Las toxinas de alacrán de cadena larga (60-76 a.a.) contra canales de sodio dependientes de voltaje (CSDV), se dividen en  $\alpha$  y  $\beta$ . Las toxinas  $\alpha$  se unen al sitio 3 enlenteciendo la inactivación. Las toxinas  $\beta$  actúan en el sitio 4 desplazando el voltaje de activación a potenciales hiperpolarizantes. Del veneno del alacrán *Centruroides noxius*, se han identificado más de 10 toxinas contra CSDV. En este trabajo ensayamos la función de dos de ellas consideradas  $\beta$ : la Cn2 (contra mamíferos) y una toxina nueva Cn11 (contra artrópodos). Con la técnica de *patch-clamp* registramos corrientes de sodio en dos sistemas y estudiamos por separado, el efecto de Cn11 y el de Cn2 sobre: 1) neuronas en cultivo del acocil *Procambarus clarkii*, y 2) expresión del canal de sodio de músculo esquelético de rata (rSkM1) en células HEK293. En neuronas en cultivo, Cn11 bloqueó las corrientes de sodio, de manera concentración-dependiente ( $K_d \sim 320$  nM), e independiente del voltaje de membrana. En células transfectadas con rSkM1, Cn2 bloqueó la corriente de forma concentración-dependiente ( $K_d \sim 230$  nM); además no fue uso-, ni voltaje-dependiente, esto sugiere se une al poro del canal desde el estado cerrado. Además, Cn2 no desplazó el voltaje de activación, ni modificó la inactivación en el estado estacionario de los canales. Estos resultados juntos, señalan que Cn2 y Cn11 son las primeras toxinas de alacrán contra CSDV que son bloqueadoras del poro, lo que sugiere se unen al sitio 1 de los canales. Nuestros datos llevan a incluir un nuevo grupo de toxinas bloqueadoras a la clasificación de toxinas de alacrán contra CSDV.

## SUMMARY.

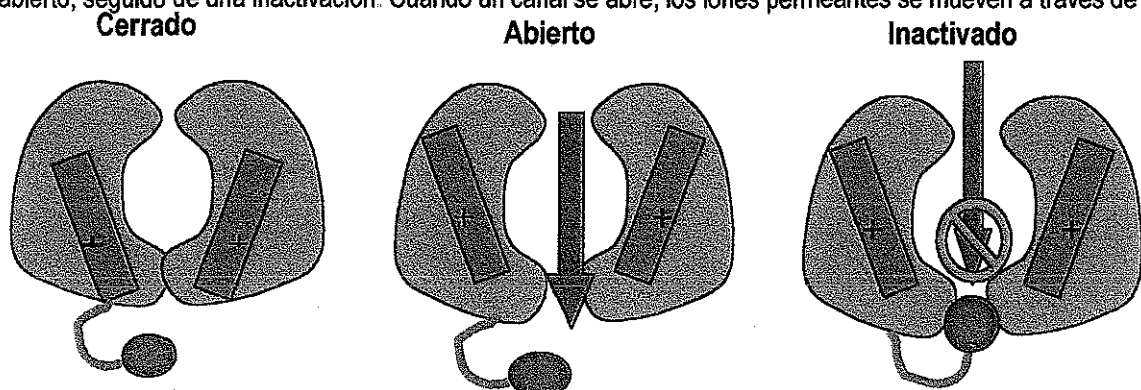
Long chain scorpion toxins (60-76 amino acids) against voltage-dependent sodium channels (VDSC) had been classified in  $\alpha$  and  $\beta$ . The  $\alpha$  toxins bind to site 3, slowing inactivation.  $\beta$  toxins bind to site 4, shifting the activation voltage hyperpolarizing potentials. From the venom of the scorpion *Centruroides noxius* more than 10 toxins against VDSC have been identified. In this work we study the function of two of them considered  $\beta$ : Cn2 (against mammals) and a new toxin Cn11 (against crustaceans). Using the patch-clamp technique we recorded sodium currents on two different systems, and characterized the effects of Cn11 and Cn2 on: 1) neurons in culture from the crayfish *Procambarus clarkii*, and 2) the rat skeletal muscle sodium channel (rSkM1) expressed in HEK293 cells. On the neuronal system, Cn11 blocked sodium currents, in a concentration-dependent ( $K_d \sim 320$  nM), and voltage-independent way. Likewise, on cells transfected with rSkM1, Cn2 blocked the sodium current in a concentration-dependent ( $K_d \sim 230$  nM) manner, and it was not use-, neither voltage-dependent. It suggests that Cn2 binds to the pore of the channel from the closed state. Furthermore Cn2, did not shift voltage activation, neither steady state inactivation of the channels. Together, these results shown that Cn2 and Cn11 are the first scorpion toxins against VDSC blockers of the pore. It suggests that they are binding on the site 1 of the channels. Ours results, bear to include a blocker toxins group to the sodium channels scorpion toxins classification.

## INTRODUCCIÓN.

### GENERALIDADES.

Los canales iónicos son proteínas que permiten el flujo pasivo de iones de un lado a otro de la membrana. Los iones que en condiciones fisiológicas fluyen a través de los canales son principalmente  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$ . El flujo de éstos a través de la membrana de las células excitables (neuronas, fibras musculares, células endocrinas), determina su capacidad de enviar señales eléctricas y responder a las señales de otras. El papel fisiológico de las células excitables es llevar información en forma de impulsos eléctricos (potenciales de acción) en los que la función de los canales iónicos es determinante

Los iones fluyen a través de los canales iónicos de un modo muy eficiente ( $>10^6$  iones/s). Este flujo masivo crea corrientes eléctricas lo suficientemente grandes (en el orden de  $10^{-12}$  a  $10^{-10}$  amperios por canal), como para producir cambios rápidos en el voltaje transmembranal (1). Debido tanto a que el interior celular es negativo y a que los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  están más concentrados en el exterior celular respecto al interior, la apertura de los canales de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{Ca}^{2+}$  provoca que entren a la célula y despolaricen la membrana. En contraste, cuando el  $\text{K}^+$  sale, o el  $\text{Cl}^-$  entra a la célula a través de sus respectivos canales, el interior de la célula llega a ser más negativo (hiperpolarizado). Los canales iónicos dependientes del voltaje responden a la despolarización de la membrana con cambios conformacionales que los llevan del estado cerrado a un estado abierto, seguido de una inactivación. Cuando un canal se abre, los iones permeantes se mueven a través de él,



**Figura 1. Estados cinéticos de los canales iónicos dependientes del voltaje transmembranal.** El esquema muestra las tres configuraciones básicas en que puede encontrarse un canal iónico dependiente de voltaje en un momento dado: los estados no conductores cerrado e inactivado y el estado conductor o abierto. Se representa a un canal de  $\text{K}^+$  dependiente de voltaje, el cual posee en su región amino terminal un dominio denominado "bola y cadena" que participa en la inactivación del canal.



en la dirección determinada por su gradiente electroquímico (Fig. 1). Sin embargo, el movimiento de un ión a través de un canal abierto no está solo en función de su gradiente electroquímico, sino que depende también de la permeabilidad relativa ( $P_i$ ) del canal al ión. Esto es determinado por varios factores incluyendo el tamaño relativo de los iones y del poro del canal. Por ejemplo, los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes del voltaje (CSDV) son altamente permeables a los iones de  $\text{Na}^+$  pero no para los iones  $\text{K}^+$ . La discriminación iónica se lleva a cabo en el poro del canal, en la región más estrecha, conocida como filtro de selectividad.

### **CANALES DE SODIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE (CSDV).**

Entre los muchos canales iónicos dependientes del voltaje conocidos a la fecha, los CSDV han sido de especial importancia. La elucidación de sus propiedades fundamentales fue llevada a cabo en el axón gigante de calamar por Hodgking y Huxley en 1952 (2). Más recientemente, los CSDV fueron los primeros canales iónicos en ser clonados por el grupo de Numa (3). Ésto permitió la aplicación conjunta de las técnicas de biología molecular con las técnicas electrofisiológicas, lo cual ha llevado a tener un mejor entendimiento de la estructura y la función de estas proteínas críticas en la excitabilidad celular.

Una de las propiedades más distintivas de los CSDV es su marcada sensibilidad al voltaje de membrana. La despolarización de la membrana incrementa drásticamente la probabilidad de que se abra el canal. De esta manera, la apertura de los canales produce una corriente entrante de  $\text{Na}^+$ , la cual a partir de un potencial cercano a los  $-10$  mV, alcanza un pico de amplitud máxima en  $<1$ ms y luego declina al irse inactivando. El estado inactivado es una conformación en que el canal se encuentra ocluido intracelularmente por un dominio propio de inactivación. Un canal en el estado inactivado persiste refractario (incapaz de responder temporalmente a otro estímulo), hasta que al potencial de membrana es nuevamente repolarizado, volviendo al canal a su estado cerrado. De tal manera que este corto pero abundante influjo de  $\text{Na}^+$ , genera el potencial de acción, la contracción muscular, etc. Como consecuencia de la depolarización producida por la corriente entrante de  $\text{Na}^+$ , otros canales dependientes del voltaje son activados, como es el caso de los canales de  $\text{K}^+$  y los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos contribuyen en parte al curso completo del potencial de acción. Por ejemplo

los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  participan en la fase de meseta en el potencial de acción de los músculos esquelético y cardíaco

### **LAS SUBUNIDADES $\alpha$ DE LOS CSDV.**

Los primeros estudios bioquímicos utilizando toxinas marcadas radiactivamente como sondas moleculares para CSDV, identificaron una proteína de 260-280 kDa (llamada subunidad  $\alpha$ ). Esta proteína que forma un poro es altamente glicosilada. La subunidad  $\alpha$  es el principal componente de los CSDV aislados de diversas fuentes: la electroplaca de anguila (4), el cerebro de rata (5) y el corazón de pollo (6). La clonación de estas moléculas ha puesto al descubierto una sorprendente diversidad de CSDV. A la fecha se han identificado al menos 11 genes diferentes que codifican para las subunidades  $\alpha$  del canal de  $\text{Na}^+$  (Tabla 1). Estos genes están altamente conservados en diferentes especies de mamíferos. Además, el potencial para la diversidad funcional se incrementa por el corte alternativo del RNA mensajero (*splicing*), la modulación por factores celulares y por el ensamble con diferentes subunidades accesorias. Las consecuencias de tal diversidad, y la elucidación de los papeles fisiológicos precisos de las diferentes variantes de CSDV es materia de intensa amplia investigación en nuestros días.

Se han clonado y secuenciado un gran número de subunidades  $\alpha$  (5,13). Cada isoforma representa un tipo de mutación que ha sido fijado por selección natural (14-19). Para tratar de entender con mayor detalle la diversidad funcional, la mayoría de los DNA complementarios (DNAC), o el RNA mensajero (RNAm) de los CSDV, han sido expresados en sistemas heterólogos. Sin embargo, no ha sido posible expresar algunas clonas de CSDV (corazón de pollo y electroplaca de anguila).

### **ESTRUCTURA Y TOPOLOGÍA DE LOS CSDV.**

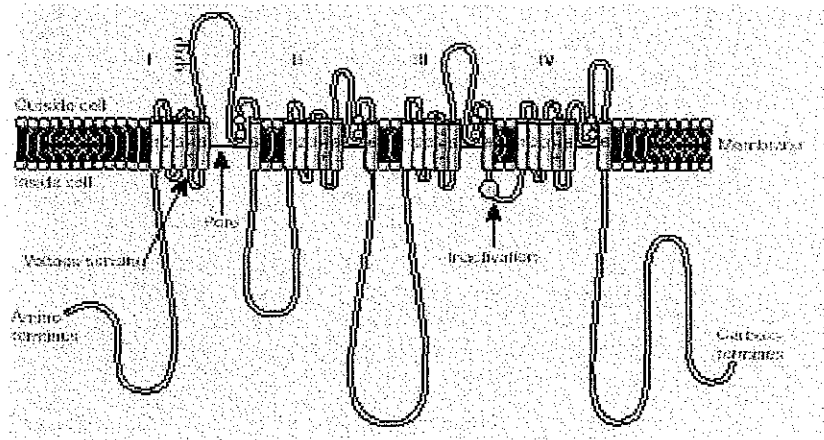
La clonación y el análisis de la secuencia de las subunidades  $\alpha$  de los CSDV predicen características estructurales en común con la gran superfamilia de los canales iónicos dependientes del voltaje. La subunidad  $\alpha$

es la principal subunidad del canal ya que cuando se expresa en sistemas heterólogos, ésta posee todas las propiedades principales de los canales: la voltaje dependencia del mecanismo de apertura y cierre (*gating*), la permeabilidad iónica selectiva y la unión de ligandos (5)

**Tabla 1. Distintos genes, expresión tisular preferencial y sensibilidad a la tetrodotoxina (TTX) de los CSDV en mamíferos.**

Tipo	Subunidad $\alpha$	Gene	Cromosoma	Tejido	TTX IC <sub>50</sub> [nM]
Cerebral tipo I	$\alpha_1$	SCN1A	2q24	Cerebro	6
Cerebral tipo II	$\alpha_2$	SCN2A	2q23-24	Cerebro	13
Cerebral tipo III	$\alpha_3$	SCN3A	2q24	Cerebro	4
Cerebral tipo IV	$\alpha_8$	SCN8A	12q13	Cerebro, Glía, DRG	3
Esquelético (SkM1)	$\alpha_4$	SCN4A	17q23-25	Músculo esquelético	5
Cardíaco (H1)	$\alpha_5$	SCN5A	3p21	Músculo cardíaco	2000
Neuronal periférico	$\alpha_9$	SCN9A	2q22-24	DRG, céls neuroendócrinas	4
Neuronal sensorio	$\alpha_{10}$	SCN10A	3p21	DRG	31000
Neuronal sensorio 2	$\alpha_{11}$	SCN11A	3p21	DRG	1500
Cardíaco atípico	$\alpha_6$	SCN6A	2q21-23	Corazón, útero, pulmón	?
Glía	$\alpha_7$	SCN7A	-	Glía	-

A partir de la clonación de la subunidad  $\alpha$  del órgano eléctrico de anguila, se dedujo la secuencia de a.a., y se postuló una estructura bidimensional que es común a todos los CSDV dependientes de voltaje (Fig 2). La subunidad  $\alpha$  es una proteína con cuatro dominios homólogos repetidos, denominados DI-DIV, conformados cada uno por seis segmentos transmembranales (S1-S6) de 19-27 residuos cada uno. Estos segmentos están conectados por secuencias hidrofílicas no conservadas. En cada dominio, el S4 está cargado positivamente, con un número de argininas (A) o lisinas (K) conservadas en cada tercera posición. Estos segmentos forman parte del sensor de voltaje del canal. Las regiones amino- y carboxilo-terminal se localizan intracelularmente (20). Del mismo modo, las asas que conectan los dominios repetidos han sido localizadas en el lado citoplásmico. Como se muestra en la Fig 2, las asas que conectan los dominios DI-DII y DII-DIII son más largas, y poseen sitios de fosforilación. El asa existente entre los dominios DIII-DIV es mucho más corta, y tiene un papel fundamental en el mecanismo de inactivación de los canales.



**Figura 2 . Topología de la subunidad  $\alpha$  del canal de  $\text{Na}^+$  del cerebro de rata (tipo IIA), deducida de estudios de análisis de hidropatía, mutagénesis y de anticuerpos. Se definen los cuatro dominios repetidos (DI-DIV), con seis segmentos transmembranales cada uno. Los segmentos S4 forman parte del sensor de voltaje, las asas que conectan los segmentos S5-S6 conforman el poro del canal. El asa citoplásmica que conecta el dominio DIII con el DIV participa en el mecanismo de inactivación de los canales. Tomado de Catterall, 2001 (21).**

#### **LAS SUBUNIDADES ACCESORIAS $\beta$ .**

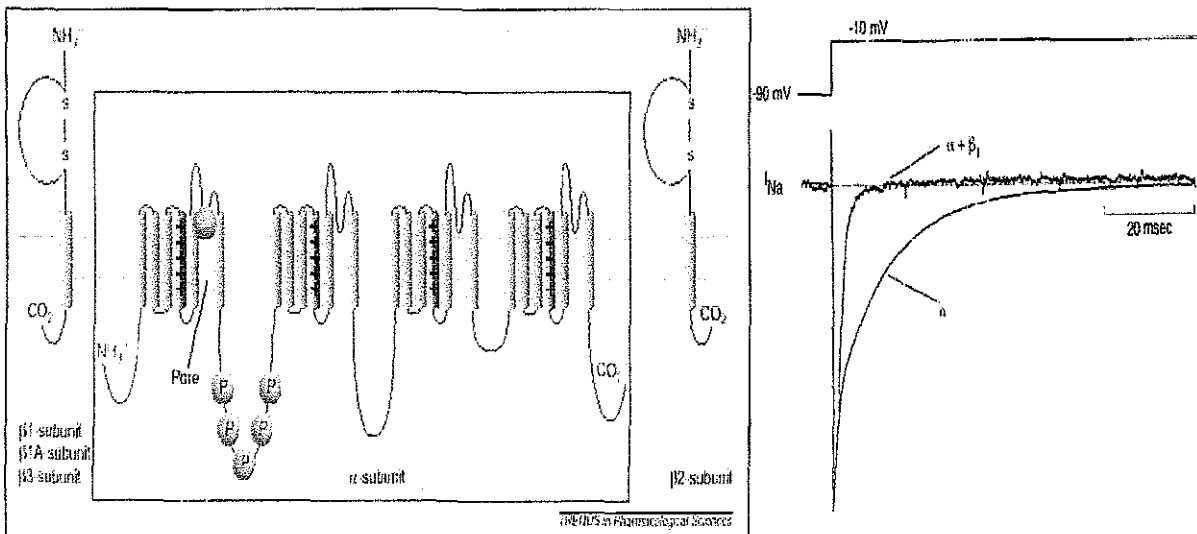
Además de la subunidad principal  $\alpha$ , algunos CSDV poseen una o dos subunidades más pequeñas conocidas como  $\beta_1$  y  $\beta_2$  (de 33-36 kDa) y una tercera isoforma de la subunidad  $\beta$  se ha descrito recientemente (7). De esta manera, se ha mostrado que el canal de  $\text{Na}^+$  del cerebro de rata es una proteína heterotrimérica conformada por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta_1$  y  $\beta_2$ , mientras que el corazón y el músculo esquelético poseen sólo las subunidades  $\alpha$  y  $\beta_1$  (8,9). Parece que estos patrones de expresión tejido-específicos son consistentes dentro de los CSDV de varias especies. Las excepciones a esta regla serían los CSDV en la electroplaca de anguila (10,11) y en el corazón de pollo (12), los cuales poseen solamente la subunidad  $\alpha$ .

La estructura primaria de la subunidad  $\beta_1$  del canal de  $\text{Na}^+$  del cerebro de rata (tipo IIA), indica que es una proteína de 33 kDa, con un pequeño dominio citoplásmico, un sólo segmento transmembranal putativo y un largo dominio extracelular con cuatro sitios potenciales de N-glicosilación (22). Un sólo gene denominado SCN1B codifica para la subunidad  $\beta_1$  expresada en el músculo esquelético, el corazón y el cerebro (23). La subunidad  $\beta_2$ , por su parte, es el producto del gene SCNB2 (24). La subunidad  $\beta_1$  no está unida

covalentemente a la subunidad  $\alpha$ , en tanto que la subunidad  $\beta 2$  si lo está, y las tres en su conjunto forman un heterotrímero que da origen al complejo del canal. Se ha estudiado el papel que las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$  ejercen para determinar las propiedades funcionales de los CSDV. La subunidad  $\beta 1$  ejerce varios efectos sobre la función de los CSDV: incrementa la corriente al pico, acelera la activación y la inactivación, así como también modifica la dependencia al voltaje de la inactivación. Aunque las subunidades  $\alpha$  por si solas son suficientes para tener un canal funcional, las subunidades  $\beta$  parecen modular la cinética de la inactivación (Fig. 3). La subunidad  $\beta 2$  puede ser removida de los CSDV del tipo IIA sin ningún efecto aparente. Sin embargo, la remoción de la subunidad  $\beta 1$  causa la pérdida de la gran mayoría de las propiedades cinéticas nativas (25). La pérdida de la actividad puede ser prevenida en parte, por el entrecruzamiento intramolecular con la subunidad  $\alpha$ , sugiriendo que la interacción con la subunidad  $\beta 1$  puede servir al menos en parte, para estabilizar la estructura de la subunidad  $\alpha$ .

Los CSDV recombinantes del músculo esquelético y de cerebro, expresados en ovocitos de *Xenopus*, exhiben una inactivación lenta cuando se comparan con las corrientes de  $\text{Na}^+$  presentes en tejidos nativos o con aquellos expresados en ovocitos inyectados con RNA-poli(A) no fraccionado del cerebro de rata (26,27). Asimismo, se ha mostrado que la co-expresión de la subunidad  $\beta 1$  humana con la subunidad  $\alpha$  recombinante del músculo esquelético humano (hSkM1) en ovocitos de *Xenopus* resulta en una corriente de  $\text{Na}^+$  que se inactiva rápidamente (23), lo cual en contraste no sucede con la co-expresión de la subunidad  $\alpha$  del canal de  $\text{Na}^+$  de corazón humano (hH1).

Las subunidades  $\beta$  poseen un motivo estructural del tipo de inmunoglobulinas, similares a los encontrados en muchas moléculas de adhesión celular (28). Debido a que casi todos los motivos semejantes a las inmunoglobulinas identificados interactúan con proteínas-ligando extracelulares, se ha propuesto que las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$  puedan actuar como moléculas de adhesión celular neural (29).



**Figura 3. Las subunidades accesorias  $\beta$  interactúan con la subunidad  $\alpha$ .** El panel de la izquierda muestra la estructura bidimensional de la subunidad  $\alpha$  de los canales de  $\text{Na}^+$  y su relación con las subunidades auxiliares  $\beta$ . A la derecha se muestran trazos ilustrativos de las corrientes de  $\text{Na}^+$  del músculo esquelético de rata (a través de canales recombinantes rSkM1), registradas en dos diferentes ovocitos de *Xenopus* expresando tanto la subunidad  $\alpha$  del canal de  $\text{Na}^+$ , como la co-expresión de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta 1$ . Tomado de Isom (7).

**DOMINIOS ESTRUCTURALES INVOLUCRADOS EN LOS MECANISMOS DE PERMEACIÓN Y GATING DE LOS CSDV.**

**EL VESTÍBULO EXTERNO Y EL FILTRO DE SELECTIVIDAD.**

El modelo descrito de la boca externa del poro de los CSDV señala dos estructuras distintas: un filtro de selectividad y un sitio de unión a toxinas bloqueadoras (llamado sitio 1). Las toxinas que poseen grupos guanidino como la Tetrodotoxina (TTX) y la Saxitoxina (STX) han sido valiosas herramientas en la investigación de la forma y la estructura del vestíbulo externo del poro del canal de  $\text{Na}^+$ . La combinación de la determinación de su estructura y varios experimentos con mutaciones sitio dirigidas, han contribuido grandemente al entendimiento de la vía de permeación en los canales de  $\text{Na}^+$ . De este modo, ahora se sabe que las estructuras que determinan la selectividad del canal a los iones de  $\text{Na}^+$ , y las diversas isoformas que confieren la sensibilidad o la insensibilidad a dichas toxinas, son funcional y topológicamente inseparables.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

La estructura del canal de  $K^+$  prototípico de la bacteria *Streptomyces lividans* (KcsA) se ha resuelto recientemente por medio de cristalografía de rayos-X. Ésta, ha revelado la estructura del poro y las bases estructurales de la selectividad iónica de toda la superfamilia de canales iónicos dependientes del voltaje, incluyendo los CSDV (30). Mediante el análisis de la permeación de series de pequeños cationes y moléculas pequeñas, Hille fue el primero en estimar las dimensiones del poro de los CSDV. Finalmente, usando el modelo molecular descrito por Fozzard y Lipkind ha sido posible revisar y corroborar dichos resultados (31). Viendo al poro desde el lado extracelular, la amplitud de la boca del poro es de 1.2 nm, y es seguido por un estrechamiento del canal de 0.3-0.5 nm que corresponde al filtro de selectividad. Una serie de cuatro a. a. situados en esta región, un ácido aspártico (D), un ácido glutámico (E), una lisina (K) y una alanina (A), forman la parte más estrecha del poro y conforman el denominado *locus* DEKA, que actúa como el filtro de selectividad. Algunos residuos situados más extracelularmente, como lo son dos ácidos glutámicos (E,E), una metionina (M) y un ácido aspártico (D), están involucrados en la conductancia del canal, la selectividad y el pegado de toxinas (32-37). La posición de los a. a. de ambas series, es equivalentemente en los cuatro dominios, formando un grupo tridimensional situado dentro del asa o segmento P (37,38). El residuo de K en DIII juega un papel central en la discriminación entre los iones monovalentes  $Na^+$  y  $K^+$ , así como en la exclusión de los iones divalentes como el  $Ca^{2+}$  (39). El mecanismo exacto de discriminación entre los diferentes cationes no está del todo claro.

Se ha descrito una vía iónica transmembranal, alineada por la invaginación del asa extracelular que conecta los segmentos S5 y S6 de cada dominio repetido (40). Basado en estudios experimentales del bloqueo del canal por toxinas, y de los datos disponibles de mutaciones sitio específicas, Lipkind y Fozzard propusieron un modelo del vestíbulo externo (38). Éste propone la existencia de una región del poro que forma una hoquedad o especie de bolsa en la que se unen la TTX y la STX. Ésta es conformada por cadenas  $\beta$ -antiparalelas (41), localizadas en las asas que conectan los segmentos S5 y S6 de los cuatro dominios (Fig. 4).

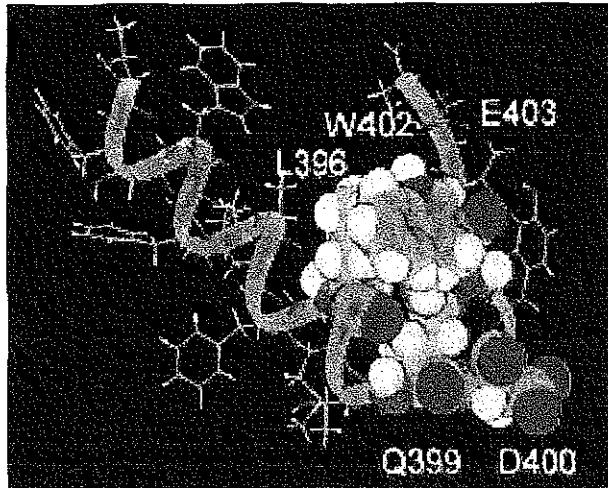


Figura 4. Modelo de la región del poro del canal de  $\text{Na}^+$  y el sitio de unión de la TTX y la STX. Esquema que ilustra la formación de la hoquedad formada por cadenas  $\beta$ -antiparalelas, en el segmento P donde se conforma el sitio de unión a TTX. Tomado de Penzotti et al., 1998 (41).

#### EL SENSOR DE VOLTAJE Y LA COMPUERTA DE ACTIVACIÓN.

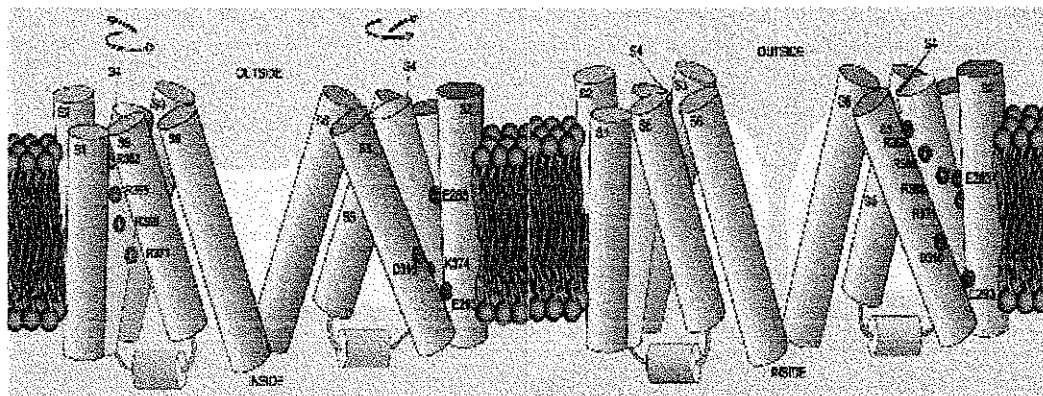
Con la clonación del primer canal de  $\text{Na}^+$  se identificaron las posibles regiones que forman el sensor de voltaje. El criterio usado fue la presencia de residuos cargados positivamente localizados en el campo eléctrico de la membrana (3). En el canal de  $\text{Na}^+$  del cerebro de rata, se presentan cinco de tales residuos en los segmentos S4 del primer y segundo dominio (DI y DII), seis en el S4 del DIII y ocho en el S4 del DIV. Este número es más o menos constante en los diferentes tipos de CSDV. El hecho de que los S4 sean segmentos transmembranales y por lo tanto están dentro del campo eléctrico de la membrana, los hace candidatos fuertes para ejercer el papel de sensores del voltaje. Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que también se encuentran patrones similares en los otros canales dependientes del voltaje. Aunado a los experimentos de mutagénesis sitio dirigida (42) se ha corroborado al menos parcialmente, la contribución de los segmentos S4 al sensor de voltaje.

De manera conjunta, mutaciones sitio específicas en los S4 de los canales de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje, han mostrado que al reemplazar residuos de R y K por residuos con carga neutra o negativa, se produce una alteración en la relación entre la apertura del canal y el potencial de membrana (43). De manera semejante en los CSDV dicho cambio se presenta cuando se muta el S4 del DI, sin embargo resulta mucho menor cuando



se modifica el S4 del DII (44) Se ha estudiado también el efecto de mutar las cargas positivas del S4 en relación a la cinética de inactivación rápida (45) y de este modo, se ha podido concluir que todos los segmentos S4 están involucrados tanto en la activación como en la inactivación (46)

La activación está asociada con corrientes capacitativas no lineares, conocidas como corrientes de compuerta, que reflejan el movimiento de las cargas dentro de la membrana. Esto sugiere que los aa. cargados positivamente se mueven a través del campo eléctrico de la membrana durante el proceso de activación. Una idea que se ha propuesto para explicar como se mueve el S4 es conocido como el modelo de "hélice deslizante" (Fig. 5). Este modelo sugiere que el segmento S4 adopta una estructura  $\alpha$ -hélice en la cual los residuos R cargados positivamente son estabilizados por la interacción con residuos de carga negativa en los dominios transmembranales adyacentes. En respuesta a un cambio en el voltaje las hélices S4 se mueven en una vía



**Figura 5 Modelo de operación del sensor de voltaje.** El esquema muestra el modelo de hélice deslizante en el cual los residuos de R del S4 se mueven girando en dirección saliente, produciendo un movimiento de cargas a través de la membrana y generando un rearrreglo de los pares iónicos que estabilizan la estructura de la molécula. Este movimiento provoca cambios conformacionales tales que hacen que el poro del canal pase a su conformación abierta o conductora. Tomado de Bezanilla, 2000 (47)

espiral, intercambiando los pares iónicos formados entre los aa con carga positiva del S4 y las cargas negativas en los segmentos transmembranales que le rodean. Debido a que hay cuatro segmentos S4, el movimiento de una sola carga positiva a través de la membrana puede ser tomada en cuenta para la dependencia del voltaje en el proceso de *gating* del canal. Los estudios de *gating* predicen que durante la activación se produce el desplazamiento de 4-6 cargas (47)

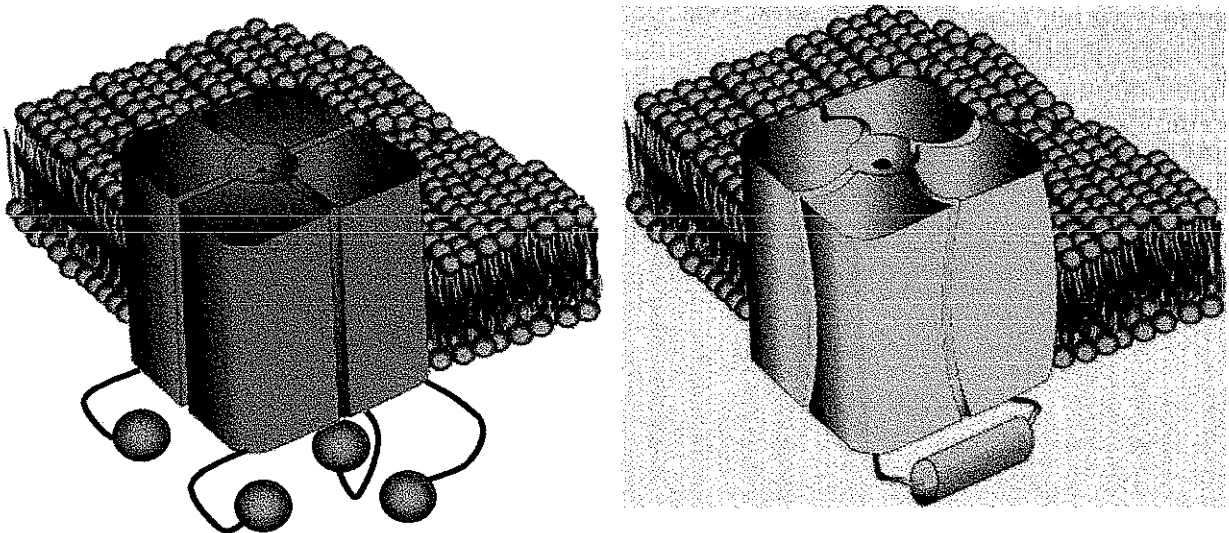
## EL VESTÍBULO INTERNO Y LA COMPUERTA DE INACTIVACIÓN.

Durante la aplicación de un pulso despolarizante, la activación de los canales de  $\text{Na}^+$  aumenta rápidamente la permeabilidad para este ión. Sin embargo, este aumento de permeabilidad decae también rápidamente. Este decaimiento de la corriente de  $\text{Na}^+$ , se debe al mecanismo de inactivación de los CSDV. Comparada al estado de reposo del canal, el cual es también un estado no conductor, la inactivación es un proceso por el cual el canal de  $\text{Na}^+$  no sólo deja de conducir iones sino que además, no se encuentra disponible para abrirse (refractario) sino hasta después de que la membrana se ha repolarizado por algún tiempo.

Actualmente, se conocen al menos dos modos de inactivación de los CSDV: una inactivación lenta la cual se desarrolla en segundos a minutos, y una inactivación rápida con una escala de tiempo de ms. Actualmente se conoce poco acerca de la inactivación lenta en los CSDV. En contraste, el mecanismo involucrado en la inactivación rápida ha sido estudiado intensivamente. Por mucho tiempo se ha conocido que un asa citoplásmica del canal puede estar involucrada en la inactivación de acuerdo al modelo de "la bola y la cadena", propuesto por Armstrong y Benzanilla (48). De hecho, estudios más recientes han mostrado que el asa intracelular que conecta los dominios DIII y DIV forma parte de la compuerta de inactivación (5). El hecho de que esta asa esté muy conservada entre los diferentes CSDV, enfatiza su importancia fisiológica. La primera evidencia experimental del papel que juega esta región como la compuerta de inactivación, fue presentada por Stühmer a partir de datos obtenidos usando clones mutantes (42). Dos de ellas, con modificaciones entre DIII y DIV, se caracterizaron por inducir una drástica disminución en la velocidad de la inactivación del canal. Unos meses después estos resultados fueron confirmados por otro grupo, el cual usando anticuerpos dirigidos contra esa misma región, produjo la inhibición de la inactivación de los canales (49). Después de la identificación de esta región intracelular como la compuerta de inactivación, se encontró que un grupo de a.a. hidrofóbicos jugaban también un papel crucial en este proceso (50). Este grupo está conformado por la isoleucina (I) 1488, la fenilalanina (F) 1489 y la metionina (M) 1490, y ha sido llamado motivo IFM (Fig. 6).

Recientemente se ha demostrado que pequeños péptidos con la secuencia IFM, son suficientes para restablecer la inactivación rápida de los CSDV con mutaciones en el asa conectora DIII-IV, lo que ha llevado a proponer que el motivo IFM se une dentro del poro del canal de  $\text{Na}^+$  y lo bloquea durante la inactivación (51). Esta hipótesis implica la presencia de a.a. en la boca intracelular del poro del canal de  $\text{Na}^+$  que participan en los

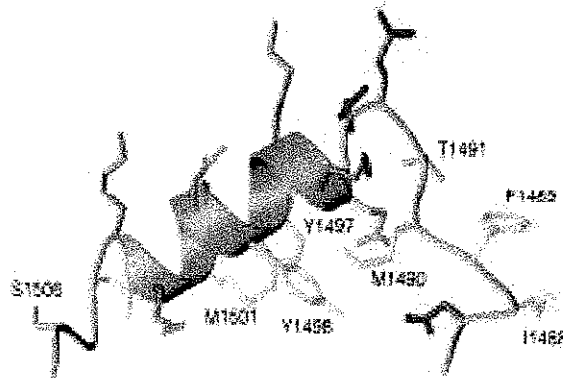
cambios conformacionales involucrados en el acoplamiento entre la activación, la inactivación y la unión del motivo IFM, lo cual a su vez resulta en el estado inactivado del canal. Realizando estudios de mutaciones seriales de intercambio por residuos de alanina, se ha encontrado que varios residuos localizados en el asa que conecta los segmentos S4 y el S5 de los dominios DIII (52) y DIV (53,54) situados en el vestibulo interno del canal, juegan también un papel crítico en el cierre y en el acople de la compuerta de inactivación. Se ha sugerido (en el canal de Na<sup>+</sup> tipo II del cerebro de rata) que la región IFM interactúa con la F1651 y/o la L1660, en el asa S4-S5 del DIV durante la inactivación. Evidencia experimental sugiere que para la inactivación también es importante el segmento S6 del DIV (55), dado que en canales que tienen mutaciones en esta región (F1764A y V1774A), el péptido que contiene la región IFM puede restablecer la inactivación (56). La primera evidencia de una interacción directa con un modelo del sitio de anclaje se ha hecho mutando el asa que conecta los segmentos S4 y S5 del dominio DIII. Los resultados mostraron que la A1329 es un residuo importante para la inactivación normal (52). También estudios realizados usando el barrido mutagénico de intercambio por A del



**Figura 6. Partículas de inactivación de los canales iónicos dependientes de voltaje.** En los canales de K<sup>+</sup> (panel izquierdo) se presenta la región de la bola y la cadena, localizado en el amino terminal de cada uno de los cuatro monómeros de la subunidad  $\alpha$  que conforman el canal. Una sola bola en el vestibulo interno del poro es suficiente para dejar al canal en estado inactivado. Para el caso de los canales de Na<sup>+</sup> (panel derecho) el asa conectora DIII-DIV, da origen a una región que forma una partícula que se desliza como una aldaba hacia el vestibulo interno del canal. Tomado y modificado de la página de F. Bezanilla (<http://pb010.anes.ucla.edu/>)

asa S4-S5 del DIV, ha sugerido que los residuos F1651, L1660 y N1662 juegan también un papel crucial en el proceso de inactivación (53)

Con los primeros datos estructurales reportados de los CSDV a una alta resolución mediante resonancia magnética nuclear (RMN), se resolvió la estructura de la parte correspondiente a la compuerta de inactivación (57). Los datos muestran que los residuos F1651 y/o L1660 son los que interactúan con el motivo IFM de la compuerta de inactivación. En este trabajo, además se muestra que la compuerta de inactivación es una estructura  $\alpha$ -hélice, antecedida por una vuelta en el N-terminal (Fig 7)



**Figura 7. Estructura de la compuerta de inactivación de los CSDV.** Resolución de la estructura de la región IFM que constituye un fragmento necesario para la inactivación del canal de  $\text{Na}^+$ . Los péptidos que contienen la secuencia IFM son suficientes para restablecer la inactivación rápida del canal. El motivo IFM se une dentro del poro del canal de  $\text{Na}^+$  y lo bloquea durante la inactivación, lo cual implica que están involucrados residuos de a.a. en la boca intracelular del poro del canal. Tomado de Rohl et al., 1999 (57)

Contrariamente al grado de conocimiento que se tiene de la inactivación rápida de los CSDV, el mecanismo molecular de la inactivación lenta de éstos aun no ha sido entendido satisfactoriamente. Se piensa que este mecanismo de inactivación lenta juega un papel importante en la excitabilidad neuronal, así como en las propiedades de disparo de los potenciales de acción (58). Además de su papel funcional relevante, las alteraciones de la inactivación lenta podrían dar lugar a importantes eventos fisiopatológicos. Actualmente se conocen varias enfermedades hereditarias que pueden atribuirse a defectos en la inactivación lenta, tal como la parálisis periódica (58-60)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **FARMACOLOGÍA DE LOS CSDV: SITIOS DE UNIÓN A NEUROTOXINAS.**

Existen varias clases de moléculas moduladoras de la actividad de los CSDV entre los que destacan: i) toxinas que bloquean la corriente, ii) toxinas que enlentecen la inactivación, iii) toxinas que modifican el voltaje de la activación y iv) agentes que afectan la dependencia al voltaje del mecanismo de apertura y cierre del canal (1).

Un gran número de toxinas de origen biológico ejercen sus efectos al modificar las propiedades de los CSDV. Éstas, incluyen tres grupos diferentes: 1) heterociclos con grupos guanidinos hidrosolubles (TTX y STX), 2) compuestos policíclicos liposolubles, como por ejemplo veratridina, aconitina y batracotoxina (BTX), y 3) toxinas polipeptídicas de bajo peso molecular aisladas del veneno de alacranes, moluscos y anémonas marinas. Algunas toxinas liposolubles, ejercen efectos combinados cambiando el voltaje de activación y enlenteciendo la inactivación. Otros agentes farmacológicos, tipificados por el fármaco DPI 201-106, han sido usados para enlentecer, disminuir o remover la inactivación de los CSDV cardíacos (61). Estos agentes prolongan la duración del potencial de acción e incrementan la contractilidad cardíaca, convirtiéndolos en fármacos potencialmente útiles para la terapia inotrópica y antiarrítmica en pacientes con contractilidad cardíaca deprimida (1).

De acuerdo a las propiedades de unión que presentan cada una de ellas se han definido diferentes sitios receptores a neurotoxinas (62). La Tabla 2, resume el conocimiento actual de los sitios receptores a toxinas de los CSDV.

### **SITIO RECEPTOR 1 : TTX, STX Y $\mu$ -CONOTOXINA.**

Las toxinas que se unen a este primer sitio receptor son probablemente las toxinas moduladoras de los CSDV mejor investigadas. La TTX es una toxina muy potente ( $LD_{50} = 0.1 \text{ mg/kg}$ ) que se encuentra en ovarios e hígado, y en menor cantidad en intestino y piel del pez globo (*fugu*) y los otros miembros de la familia *Tetraodontidae*. Tanto la TTX, como la STX son bloqueadoras de los CSDV. La STX es también conocida como veneno

**Tabla 2. Sitios receptores de neurotoxinas en los CSDV.**

SITIO	EFEECTO	TOXINA	DOMINIO	A.A.		
<b>Sitio 1*</b>	Bloqueo extracelular	Tetrodotoxina	ISS2S6	D384, E387, Y385		
		Saxitoxina	IISS2S6 IIISS2S6 IVSS2S6	E942, E945 K1422, D1426D1426D400,		
		$\mu$ -Conotoxina	ISS2S6 IIS5S6 IIISS2S6 IV SS2S6	Y401, W402, E403 A728, A730, E758 W1239, D1241W1531, D1532		
		<b>Sitio 2</b>	Modulación alostérica intramembranal del <i>gating</i>	Veratridina	IS6	I433, N434, L437
				Batrachotoxina	IVS6	F1579, N1584, Y1586, I1760, F1764
				Grayanotoxina		
		<b>Sitio 3*</b>	Enlentecimiento de la inactivación	Toxinas $\alpha$ de alacrán	IS5S6	E1613
Toxinas de anémona	IVS5S6					
Toxinas de araña	IVS3S4 ?			E1616, V1620, L1621 ?		
<b>Sitio 4*</b>	Modificación del voltaje de activación			Toxinas $\beta$ de alacrán	IS5SS1 IIS1S2 IIS3S4 IIISS2S6	G845 ? ? ?
		<b>Sitio 5</b>	Modulación alostérica intramembranal del <i>gating</i>	Brevetoxina	IS6	?
				Ciguatoxina	IVS5	?
		<b>Sitio 6</b>	Bloqueo intracelular	Anestésicos locales	IVS6	?
<b>Sitio 7</b>	Enlentecimiento de activación, inactivación y deactivación	$\delta$ -conotoxina	?	?		
<b>Sitio de toxinas excitatorias</b>	Parálisis rápida por contracción	Toxinas excitatorias de alacrán	IS5S6 IIISS2S6 IVSS2S6	?		
<b>Sitio de toxinas depresoras</b>	Parálisis lenta por flacidez	Toxinas depresoras de alacrán	IS5S6 IIISS2S6 IVSS2S6	?		

\*sitios receptores revisados en este trabajo

paralizante (VP) y es encontrada en ciertos moluscos, artrópodos, equinodermos y algunos otros animales marinos filtradores, que han ingerido protistas Dinoflagelados tóxicos, responsables de la generación de las mareas rojas. Además, la STX es también un producto de ciertas cianobacterias de agua dulce. De este modo, organismos filtradores que se alimentan de conchas, peces o bivalvos llegan a ser venenosos y pueden causar envenenamiento paralizante a humanos a través de la cadena alimenticia.

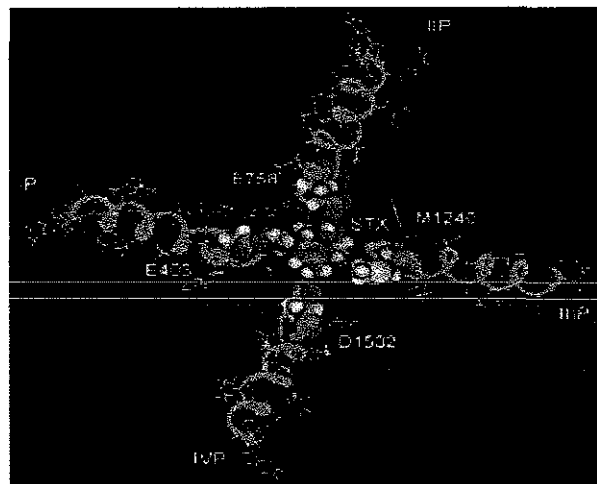
La TTX y la STX son las toxinas más específicas para los CSDV. En la mayoría de los casos, la unión a la toxina es de alta afinidad y rápidamente reversible (segundos a minutos). La constante de disociación en el equilibrio ( $K_d$ ) está en el rango de 1-10 nM, para la isoforma del músculo esquelético o del cerebro, mientras que para la isoforma cardíaca está en el rango  $\mu$ M.

Las dos toxinas guanidino han sido herramientas valiosas en el estudio de la estructura del vestíbulo del poro de los CSDV, y del modelado de su sitio de unión (37). Estudios de unión específica a [ $^3$ H]STX sugieren que también la subunidad  $\beta_1$  participa en la formación del sitio de unión de TTX/STX (63). En combinación con experimentos de mutaciones sitio dirigidas, ha sido posible hacer un esquema de esta parte del canal. Al comparar las secuencias de a. a. en la región P de tres isoformas de CSDV, se señala que la mutación E387Q del DI, en la isoforma II del cerebro de rata resulta en la eliminación completa del bloqueo por TTX y STX (35). También al mutar los residuos cargados del segmento P en los cuatro dominios homólogos repetidos, la TTX interactuó principalmente con los residuos en DI y DII (36). Con respecto a la STX, la neutralización de D1717N en DIV abolió completamente el bloqueo de ésta, en tanto que solo redujo parcialmente el bloqueo por TTX.

Actualmente se acepta que la TTX y la STX se unen al mismo sitio receptor en el canal de  $\text{Na}^+$ . Esta idea se basa en: 1) las dos toxinas bloquean completamente la corriente, 2) mutaciones en el vestíbulo externo parecen tener efectos cualitativamente similares sobre la afinidad de ambas toxinas. Estas similitudes llevaron a proponer el modelo molecular del sitio específico de unión para la TTX y la STX (35-37). El modelo asume la formación de un receptáculo con los cuatro segmentos P (Fig. 8).

Como ya se ha mencionado los CSDV en diversos tejidos tienen diferentes sensibilidades a la TTX. La primer hipótesis que explica la alta o baja afinidad de la TTX y la STX sobre los CSDV se ha enfocado en las

atracciones electrostáticas entre el grupo guanidino con carga positiva y los grupos ácidos con carga negativa en el sitio de unión del canal (8, 33, 36, 60, 64) Para este estudio se expresaron varias mutantes de la isoforma de músculo esquelético (SkM1), con mutaciones puntuales en ocho sitios importantes del vestibulo (40). Los resultados mostraron que la tirosina (Y) 401 es importante para el bloqueo de TTX y STX Por otro lado para el bloqueo de STX, los residuos E758 y D1532 son los más importantes. Los tres residuos mencionados (Y401, E758 y D1532), se sitúan más cerca a la parte extracelular del vestibulo del poro Más intracelularmente, se localizan los residuos de la región del filtro de selectividad (locus DEKA), lo que apoya la idea de que las dos toxinas bloquean el poro por el mismo mecanismo a pesar de la interacción diferencial con los a a situados alrededor del poro Además, otros grupos mostraron que la mutación F385C en los CSDV de cerebro no sólo disminuye la sensibilidad a las toxinas de guanidino, sino que también incrementan la sensibilidad a  $Zn^{2+}$  y  $Cd^{2+}$  (33,66)



**Figura 8. Modelo del segmento P de los CSDV desarrollado por Lipkind y Fozzard (65).** En este modelo se definen los sitios relevantes de interacción de la STX con el poro del canal: E403, E758, M1240 y D1532

Las conotoxinas son péptidos neurotóxicos del veneno de los caracoles de la familia *Conus* De la especie *Conus geographus*, se han purificado péptidos diversos de 10-30 a a que tienen como blancos a diversos canales incluyendo a los de  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ , receptores de acetilcolina y receptores NMDA. Un péptido de 22 a.a., designado  $\mu$ -CTX GIII tiene como blanco a los CSDV y provoca el bloqueo de la corriente (67) Se ha



determinado su estructura a una muy alta resolución, y se ha usado para probar varios modelos de CSDV. Basados en los estudios de mutagénesis de  $\mu$ -CTX, se ha sugerido que el grupo cargado positivamente del residuo R13, está directamente involucrado en la interacción con los CSDV (68-70).

#### **ANALOGÍAS ENTRE LAS TOXINAS BLOQUEADORAS DE LOS CSDV.**

Existen varias similitudes entre la  $\mu$ -CTX, la TTX y la STX: 1) son bloqueadores de los CSDV, 2) presentan un grupo guanidino que interactúa con los canales, 3) estudios de desplazamiento, han mostrado que la inhibición es competitiva entre STX y  $\mu$ -CTX GIIIA y GIIIB, lo cual sugiere que los sitios de unión respectivos se pudieran traslapar (71-73). También existe analogía entre el efecto de estas toxinas en los CSDV y las diferencias en sensibilidad de las varias isoformas del canal de  $\text{Na}^+$ . Por ejemplo, la isoforma del músculo esquelético y la de la electroplaca de la anguila, poseen una alta afinidad a la  $\mu$ -CTX, en tanto que las isoformas cerebral y cardíaca son resistentes al bloqueo (74)

En contraste con la mutación E387Q en la isoforma II del cerebro de rata, la cual elimina el bloqueo por TTX y STX (35), no se ha encontrado ningún residuo que tenga influencia sobre la potencia ni sobre la especificidad de la  $\mu$ -CTX. En rSkM1, la mutación E403Q (equivalente al E387 de la isoforma neuronal II) previene el bloqueo por TTX y STX, y la sensibilidad para  $\mu$ -CTX se reduce  $\sim 4$  veces (74). La mutación de Y401C que reduce la sensibilidad de TTX en los canales SkM1, disminuye parcialmente el efecto de la  $\mu$ -CTX (75). La mutación que resultó en una mayor reducción en la afinidad a  $\mu$ -CTX fue la sustitución de E758Q en el vestibulo externo del poro. Esta mutación disminuyó  $\sim 48$  veces la afinidad del receptor por la  $\mu$ -CTX, y al mismo tiempo redujo la unión a TTX por un factor de  $\sim 375$  (69).

Los esfuerzos por definir la región de unión a la  $\mu$ -CTX por mutagénesis de cisteínas, ha resultado en la identificación de siete residuos alineados en el poro que influyen significativamente en el bloqueo del canal SkM1: D400, Y401, W402, E758, W1239, D1241 y W1531. Sin embargo, estos residuos no contribuyen de igual manera al bloqueo de la toxina. Los residuos cargados 758 y 1241 parecen ser los más importantes (70,75). La dificultad en la determinación del sitio exacto de unión a  $\mu$ -CTX puede deberse al hecho de que la toxina es una

molécula mucho más grande que la TTX o la STX y por lo tanto probablemente interactúa en un dominio más grande y de una manera más compleja. La mayor área de contacto de la  $\mu$ -CTX incrementa la probabilidad de que las diferencias en las isoformas sean determinadas por impedimentos estéricos, así como por atracciones específicas (75-77, 86).

### **SITIO RECEPTOR 3: TOXINAS DE ANÉMOMA MARINA, TOXINAS $\alpha$ DE ALACRÁN Y TOXINAS DE ARAÑA.**

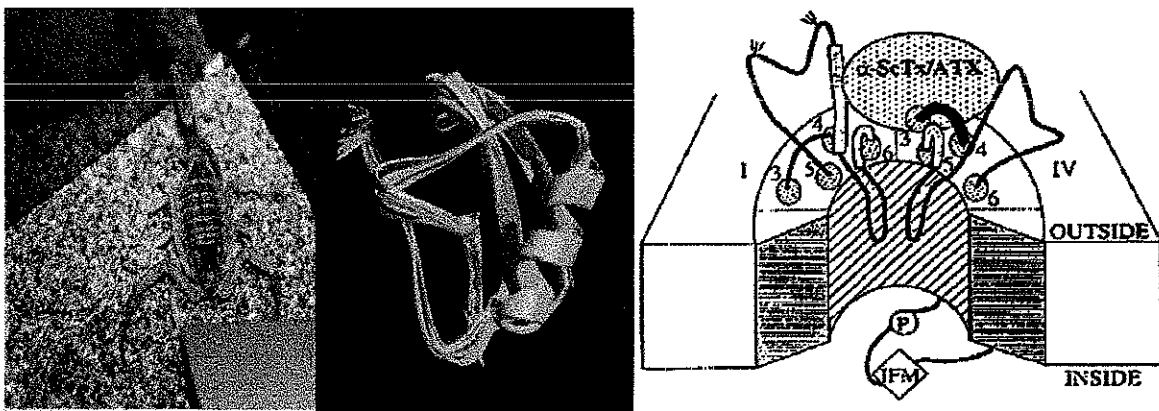
El sitio receptor 3, es el sitio de acción para las toxinas  $\alpha$  de alacrán y de anémoma marina (ATX), que se aislaron e identificaron hace unos 20 años como estimulantes cardíacos y neurotoxinas. El mecanismo de acción sobre los CSDV es principalmente inhibiendo la transición del estado abierto al estado inactivado del canal. Las toxinas de anémoma de mar son polipéptidos de 3-300 kDa aislados de los tentáculos del animal. Las toxinas anthopleurina: Ap-A o Ap-B, y ATX-I, -II ó -IV se aislaron de los géneros *Anthopleura* y *Anemonia*, respectivamente. Son proteínas relativamente grandes, clasificadas como toxinas tipo I (78).

La caracterización de los residuos que constituyen el sitio 3, se ha realizado a través de mutagénesis sitio dirigida (79). Se ha mostrado en el canal de  $\text{Na}^+$  del cerebro de rata que mutaciones en el residuo E1613 en el S3DIV, reducen ~80 veces la unión a la toxina ATX-II. Además, siete residuos adicionales del asa extracelular S3-S4 de DIV, tuvieron efectos importantes en la unión a ATX-II y de toxinas  $\alpha$  de alacrán. De este modo, E1613 y el asa S3-S4DIV son considerados determinantes críticos para la unión de las toxinas señaladas. También se ha mostrado, que estas regiones del canal pudieran estar involucradas en el acoplamiento de la activación a la inactivación rápida. Los experimentos de mutación de análogos en la isoforma del canal cardíaco de rata (rH1) han mostrado que el D1612 (equivalente al E1613 del canal de  $\text{Na}^+$  de cerebro de rata) es un residuo crucial para la interacción con la toxina de Ap-B (80).

Las toxinas  $\alpha$  de alacrán son producidas por los géneros norteafricanos *Androctonus*, *Buthus* y *Leiurus*. La toxina  $\alpha$  tipo V, se aisló del veneno del alacrán *Leiurus quinquestriatus* (LqTx). Ésta se une al sitio receptor 3

de manera dependiente del voltaje, provocando un enlentecimiento de la inactivación de los CSDV (81) La estructura de varias toxinas del veneno de dicho alacrán se han resuelto por RMN (82,83)

Aunque se conoce poco sobre la estructura del vestibulo externo del poro del canal de Na<sup>+</sup>, se han propuesto varias regiones que podrían estar participando en la unión a las toxinas de anémoma y  $\alpha$  de alacrán (Fig. 9). Con estudios de la unión específica de derivados de toxinas de alacrán, se mostró que éstas se unen al asa S5-S6 del DI. Conjuntamente con la unión de anticuerpos dirigidos contra el asa S5-S6 del DI, han implicado claramente la participación del DI (84) Además se ha mostrado, que ciertas regiones en DIV juegan un papel importante en la unión de las toxinas de anémoma y  $\alpha$  de alacrán, como se ha mostrado en estudios con canales quiméricos (85), y anticuerpos dirigidos contra regiones del péptido que forma el asa S5-S6 en el dominio DIV (84). De arañas australianas de la familia *Atracinae* llamadas de telaraña en túnel, se ha aislado una clase de toxinas relativamente nueva, que interactúan también en el sitio receptor 3. Las neurotoxinas peptídicas  $\alpha$ -Atracotoxina-Ar1 y  $\alpha$ -atracotoxina-Hv1, son toxinas de 42 a a (86) que no muestran ninguna homología de secuencia significativa con otras neurotoxinas conocidas Su estructura resuelta por RMN (87,88) hace ver que



**Figura 9. *Leiurus quinquestriatus*, modelo de LqTxV y su sitio de unión al CSDV** En el panel izquierdo se muestra una fotografía de un alacrán de esta especie, que se localiza principalmente en regiones desérticas del medio oriente. En el panel medio, se presenta la estructura tridimensional (sobreposición de 12 estructuras obtenidas por RMN) En el panel derecho se muestra el modelo propuesto del sitio de unión de las toxinas  $\alpha$  de alacrán y de anémoma a los CSDV. Tomado de Rogers et al , 1996 (88).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

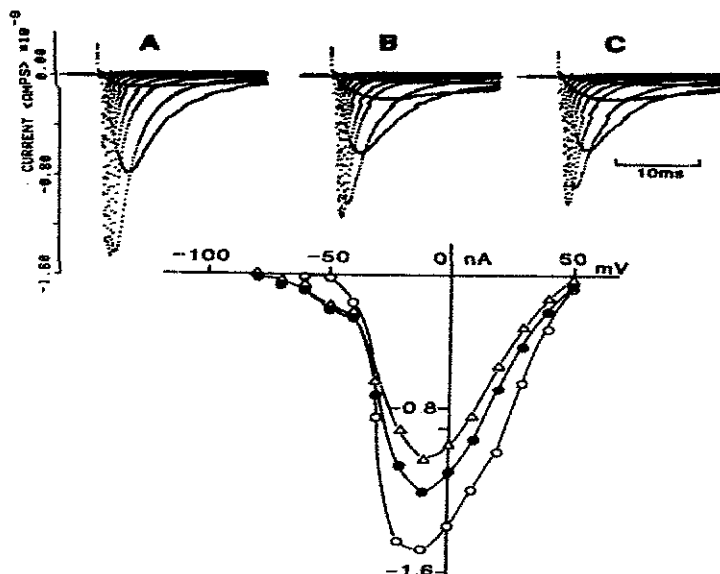
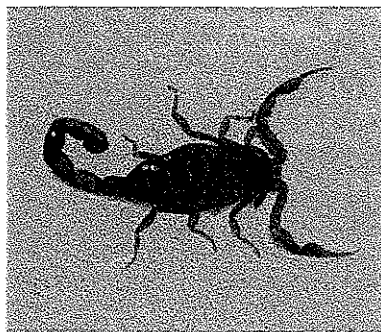
el plegamiento de estos péptidos es completamente diferente al de las toxinas  $\alpha$  de alacrán y al de las toxinas deanémoma (Ap-B). Sin embargo, estas toxinas enlentecen la inactivación de modo similar a las toxinas  $\alpha$  de alacrán (86). La demostración de que las  $\alpha$ -Atracotoxinas se unen al sitio 3, se ha realizado con ensayos de competencia con toxinas  $\alpha$  de alacrán, BTX y STX (86). El sitio de unión de las  $\alpha$ -Atracotoxinas y las toxinas  $\alpha$  de alacrán, parecen traslaparse parcialmente dentro del sitio 3 del canal de  $\text{Na}^+$ . También muestran interacción alostérica positiva, similar a la que se presenta en el acople de los sitios 2 y 3, como ya se ha mostrado para algunas otras toxinas (89).

#### **SITIO RECEPTOR 4 : TOXINAS $\beta$ DE ALACRÁN.**

Las toxinas  $\beta$  se aislaron del veneno de alacranes de América del género *Centruroides*. Las toxinas  $\alpha$  y  $\beta$  de alacrán no comparten el mismo sitio, debido a que la unión de un tipo de toxina no interfiere con la unión del otro (90-91). También del veneno del alacrán brasileño *Tytilus serrulatus*, se aisló una toxina  $\beta$  con una alta afinidad para los CSDV denominada toxina  $\gamma$  ( $T_{\gamma}$ ). La estructura tridimensional de varias toxinas  $\beta$  de alacrán se han resuelto recientemente por RMN (92,93).

Las toxinas  $\beta$  de los alacranes americanos no modifican la inactivación rápida, sino que producen varios efectos: 1) desplazan hacia voltajes hiperpolarizantes la voltaje-dependencia de la activación, así como de la inactivación. 2) Incrementan la amplitud de la corriente a voltajes entre -70 y -50 mV, donde la probabilidad de apertura de los CSDV es muy baja, al estar los canales normalmente cerrados (94-96) 3) Inhiben la amplitud de corriente a voltajes depolarizantes, entre -30 y 50 mV, al enlentecer las constantes de tiempo de la activación y la inactivación. En la Fig 10 se muestra un ejemplo del efecto de una toxina  $\beta$  sobre los CSDV.

Recientemente, se ha propuesto un modelo denominado "inmovilización del sensor de voltaje", el cual representa el mecanismo de acción de estas toxinas (98). Este mecanismo hace pensar que la unión de las toxinas  $\beta$  de alacrán al extremo extracelular del S4, se lleva a cabo durante el translocamiento que lleva al canal



**Figura 10. Alacrán *Centruroides noxius* Hoffman y efecto de una toxina  $\beta$  sobre corrientes de  $\text{Na}^+$ .** Esta especie se localiza en la costa del pacífico de México, siendo el alacrán más venenoso de Norteamérica (izquierda). Ejemplo del efecto de una toxina  $\beta$ : Tsy 50 nM ensayada sobre CSDV de miocitos ventriculares aislados de ratas neonatas. Los trazos mostrados en la parte superior del panel derecho muestran en A los registros control, en B y C se muestran las corrientes a 1 y 10 min. después de aplicar la toxina en las que se observa una disminución en la amplitud de corriente. Al realizar las curvas I-V (parte inferior) se observa al compararlas con el control (O) que tanto a 1 ( $\square$ ), como a 10 min ( $\Delta$ ) de exposición a la toxina, se inhibe la amplitud de la corriente y se desplaza a voltajes más negativos el voltaje umbral de activación. Tomado de Yatani et al., 1988 (97)

del estado cerrado al estado abierto. De este modo, la unión de la toxina  $\beta$  al extremo extracelular del segmento S4DII, puede estabilizarlo e inmovilizarlo en la posición saliente (activo). La mutación G845N, localizada en el S3-S4DII, puede abolir el efecto de las toxinas  $\beta$  de alacrán en el corrimiento del voltaje de activación, evitando la unión de la toxina al extremo extracelular de la conformación activada del segmento S4DII.

#### CARACTERÍSTICAS DE LAS TOXINAS DE ALACRÁN QUE ACTÚAN SOBRE CSDV.

Las toxinas del veneno del alacrán son polipéptidos de 4-8 KDa que se han clasificado según sus blancos receptores. Se han encontrado cuatro familias diferentes de toxinas que actúan específicamente con los canales iónicos: canales de  $\text{Na}^+$  (100), canales de  $\text{K}^+$  (101), canales de  $\text{Cl}^-$  (102) y canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (103).

Las toxinas de alacrán contra CSDV, son proteínas básicas con 60-76 a.a., estabilizadas y fuertemente empaquetadas por 4 puentes disulfuro capaces de reconocer CSDV de organismos diferentes, específicamente mamíferos, insectos y crustáceos (104). Es importante señalar aquí que el mecanismo molecular de acción descrito para todas las toxinas de alacrán contra CSDV se conoce como "modificación del *gating*". Contrariamente a estos péptidos de cadena larga, todos los péptidos de cadena corta (23-41 a.a.) son bloqueadores específicos de los canales de  $K^+$  (105-107).

Las toxinas para CSDV hasta la fecha descritas han sido clasificadas en dos clases principales: toxinas  $\alpha$  y toxinas  $\beta$  (104,108,109,112). Se han descrito otras dos clases distintas las cuales muestran especificidad para canales de  $Na^+$  en artrópodos, llamadas depresoras o excitatorias (110). Las toxinas excitatorias inducen una rápida parálisis por contracción, al provocar disparos repetitivos de los axones, atribuibles a pequeños incrementos en el pico de la conductancia de  $Na^+$  y un enlentecimiento de su inactivación. En tanto que las toxinas depresoras inducen una lenta parálisis flácida, al bloquear los potenciales de acción, debidos a una despolarización de la membrana axonal y una progresiva supresión de la corriente de  $Na^+$ . Estas cuatro clases de toxinas para canales de  $Na^+$ , comparten entre sí solamente de un 20-40% de similitud en sus secuencias primarias (109, 110). Estudios de unión de las toxinas y su relación con la toxicidad hacia mamíferos e insectos, han revelado que aún aquellas que se reportan como específicas para mamíferos, pueden ser tóxicas para insectos y viceversa (111). Por lo tanto, la especificidad hacia un grupo animal es más bien relativa, debido a la existencia de reactividad cruzada (113). En años recientes las toxinas de alacrán han ganado importancia debido al hecho de que algunas de ellas muestran una alta selectividad por canales de  $Na^+$  de insectos (111) y el hecho que son biodegradables las hace bioinsecticidas potenciales (114).

Recientemente se ha propuesto una nueva clasificación de las más de 100 toxinas para canales de  $Na^+$  reportadas (104). Ésta comprende 10 grupos diferentes, basados principalmente en las similitudes y diferencias en la estructura primaria, los efectos funcionales y en la especificidad preferencial hacia diversas especies animales (Fig 11). De esta manera, las toxinas que ejercen su efecto sólo en mamíferos, insectos o crustáceos, así como toxinas que tienen actividad en más de una especie han sido todas colocadas en grupos diferentes

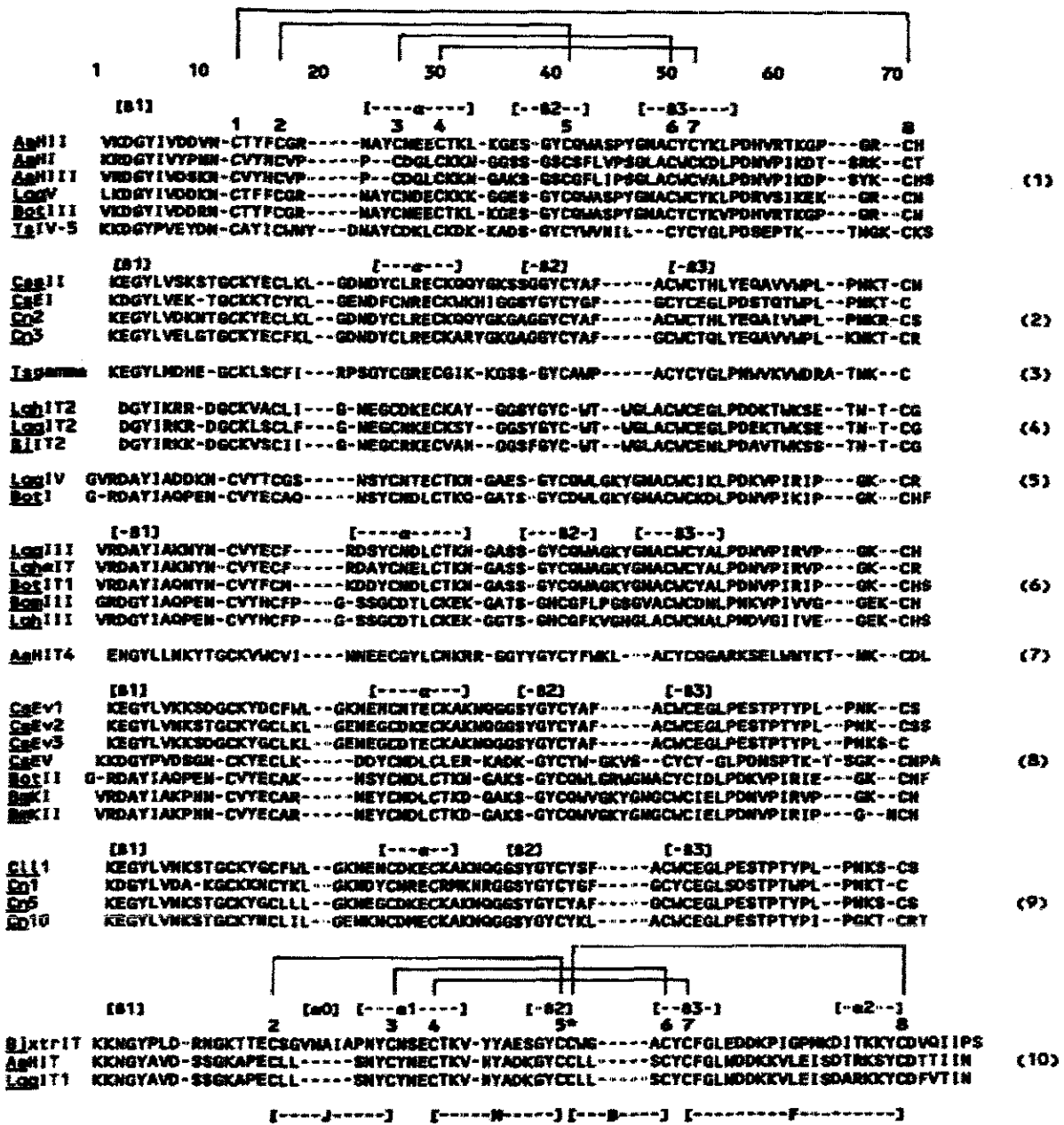


Figura 11. Grupos de toxinas para CSDV. Secuencias primarias de diferentes grupos de toxinas de acuerdo a su especificidad de especie (mamíferos y/o insectos), así como por sus propiedades de unión y efectos en ensayos electrofisiológicos. El número del grupo a que pertenecen se indica al lado derecho. Las secuencias fueron alineadas tomando como referencia los residuos de C. Se introdujeron manualmente espacios con el objeto de maximizar las similitudes. Los residuos C fueron consecutivamente numerados del extremo N- al C-terminal, con el propósito de facilitar la descripción de la formación de los enlaces disulfuro entre los diferentes grupos de toxinas. Las regiones de estructura secundaria revelada por estudios tridimensionales se indican entre corchetes arriba de las secuencias, las cuales significan: [α], α-hélice y [β] significa hebra β. El asterisco a la derecha del quinto residuo C del grupo 10, indica la posición de la C1 sustituta del resto de las toxinas. En la base de la figura, las regiones marcadas J, M, B, y F entre corchetes muestran la posición de las respectivas asas descritas en la literatura, cuyas diferencias en longitud hacen la primera división estructural entre toxinas α y toxinas β. Tomado de Possani et al., 1999a (104).

## ANTECEDENTES INMEDIATOS.

A la fecha, en el alacrán mexicano *Centruroides noxius* Hoffmann, se han identificado más de 10 toxinas contra canales de Na<sup>+</sup>. Estos componentes se han ensayado en nuestro laboratorio usando mamíferos (ratones) y artrópodos (crustáceos e insectos). Se definen tres efectos: no-tóxico significa que los animales no mostraron ningún síntoma de intoxicación en las 24 h posteriores de la inyección, y cuyo efecto fue similar a la inyección de un amortiguador de fosfatos, solución salina o agua. El efecto tóxico comprendió una serie de síntomas como salivación, lagrimeo, disnea, parálisis temporal de miembros (ratones) o parálisis generalizada (grillos y crustáceos). El efecto tóxico fue marcado como letal si por lo menos uno de los animales de prueba fallecía después de la inyección.

De las toxinas de alacrán contra CSDV purificadas del veneno de *C. noxius* dos son de particular interés para este trabajo, pues en los bioensayos mostraron tener una especificidad preferencial por mamíferos (Cn2), o por crustáceos (Cn11). Ambas toxinas son consideradas estructuralmente  $\beta$ . De éstas, Cn11 es una toxina nueva que se describe bioquímica y funcionalmente por vez primera en este trabajo. Cn11 corresponde al 1.8% de proteína total del veneno soluble. La toxina Cn2 ha sido más ampliamente caracterizada al nivel bioquímico e inmunológico.

La toxina Cn11 fue ensayada preliminarmente en nuestro laboratorio usando al acocil *Cambarellus montezumae* ssp., una especie de crustáceos de agua dulce nativa de estanques en el área de Cuemavaca, México. Estos ensayos mostraron que Cn11 fue letal a la dosis de 11.25  $\mu$ g/g y fue tóxica, pero no letal para grillos (*Acheta spp*) a la dosis de ~ 100  $\mu$ g/g. Con esta información, realizamos en este trabajo el primer ensayo electrofisiológico del efecto de Cn11 sobre las corrientes de Na<sup>+</sup> en un sistema de neuronas en cultivo de crustáceo. Por otra parte, la toxina Cn2 representa el componente más abundante del veneno de alacrán (6.8% de la proteína total). Esta toxina es una de las más potentes para mamíferos con una DL<sub>50</sub> de 0.25 mg/20 g en ratones CD1 (115-117). La acción de Cn2 fue previamente ensayada en el sistema de ovocitos de *Xenopus laevis*, expresando la subunidad  $\alpha$  de los canales de Na<sup>+</sup> recombinantes rSkM1-2, una isoforma del músculo



esquelético de rata sensible a TTX (117) En dicho trabajo además de la Cn2, se ensayaron otras toxinas de alacranes de otras especies americanas: la toxina 2 de *C. limpidus limpidus* (CII2) y la toxina 1 de *C. infamatus infamatus* (Cii1) Las tres fueron catalogadas funcionalmente como toxinas  $\beta$ .

Con los datos del efecto de la Cn2 y Cn11 sobre los CSDV, nos propusimos comenzar a estudiar la relación estructura-función de estas toxinas catalogadas  $\beta$ , modificadoras del voltaje de activación de los canales, tal y como se detalla en los objetivos.

## OBJETIVOS.

### GENERALES.

1. Realizar estudios electrofisiológicos en canales de Na<sup>+</sup> de mamíferos y crustáceos para determinar el mecanismo de acción de dos toxinas del alacrán mexicano *Centruroides noxius*, que en bioensayos han mostrado tener diferente especificidad de especie: Cn2 (mamíferos) y Cn11 (crustáceos).
2. Establecer una hipótesis sobre el sitio receptor a estas toxinas en los canales de Na<sup>+</sup> y así sentar las bases para futuros estudios de estructura-función.

### PARTICULARES.

- 1) Determinar el efecto de la toxina Cn11 sobre los canales endógenos de Na<sup>+</sup> en neuronas de crustáceos
  - a) Realizar cultivos primarios de neuronas del órgano X del acocil *Procambarus clarkii*.
  - b) Aislar las corrientes de Na<sup>+</sup> y determinar el efecto de la toxina Cn11 en este sistema.
- 2) Determinar el efecto de la toxina Cn2 sobre canales recombinantes de Na<sup>+</sup> en un sistema de expresión heteróloga en una línea celular de mamíferos.
  - a) Establecer el sistema de expresión de canales de Na<sup>+</sup> rSkM1 del músculo esquelético de rata (rSkM1) en la línea de células de riñón embrionario humano (HEK293).
  - b) Determinar el efecto de la toxina Cn2 sobre los canales de Na<sup>+</sup> rSkM1 expresados en la línea celular HEK 293.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

El desarrollo de este trabajo se llevó a cabo en dos diferentes sistemas biológicos de crustáceos y de mamíferos, en los que se registraron corrientes de  $\text{Na}^+$ . Sobre éstas se ensayaron las toxinas de alacrán contra canales de  $\text{Na}^+$ . La metodología empleada la presento en base a las diferentes etapas del desarrollo de este trabajo.

### 1) FASE BIOQUÍMICA Y BIOENSAYOS.

#### MATERIAL BIOLÓGICO.

Los alacranes de la especie *Centruroides noxius* Hoffmann se colectaron en el estado de Nayarit (México). El veneno se obtuvo por estimulación eléctrica como se ha descrito (128). El veneno crudo se disolvió en agua bidestilada y se centrifugó a  $15,000 \times g$  por 15 min. El veneno soluble (sobrenadante) se liofilizó y se mantuvo a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso. Se requirieron aproximadamente 20 mil alacranes para obtener un gramo de veneno soluble.

#### PURIFICACIÓN DE LAS TOXINAS Y PRUEBAS DE LETALIDAD.

La purificación de las toxinas de *C. noxius* requirió de 3 a 4 pasos cromatográficos como se ha descrito previamente (128). Para separar los componentes péptidicos de alto y bajo peso molecular, primeramente se fraccionó el veneno total por filtración en gel, y se obtuvieron 3 componentes (Fig. 12A). La única fracción tóxica fue la II, la cual al someterla a cromatografía de intercambio iónico en columnas de carboximetil-celulosa (CM-C), se obtuvieron 15 componentes, de los cuales los picos 4, 5 y 6 resultaron ser tóxicos para crustáceos (Fig. 12B).

#### PURIFICACIÓN DE LA TOXINA Cn2.

La toxina Cn2 se aisló de la fracción II-9 (es decir, fracción II de Sephadex, sub-fracción 9 de CM-celulosa), siguiendo el proceso de separación descrito (115,116). La fracción se separó a homogeneidad como se muestra en

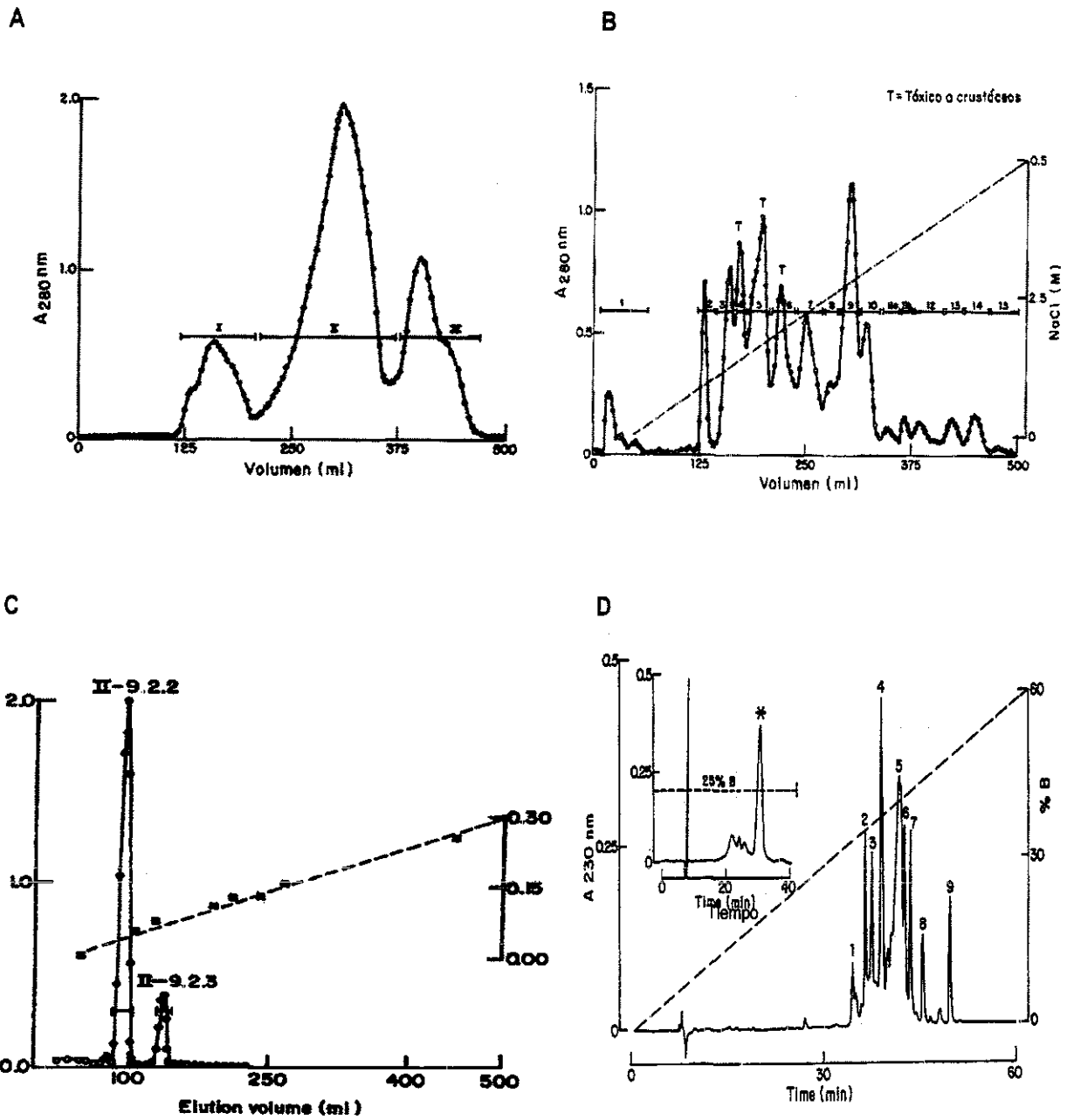


Figura 12. Perfiles cromatográficos de la purificación de las toxinas Cn2 y Cn11. A. Exclusión por peso molecular en Sephadex G-50 B. La fracción II del sephadex se fraccionó a su vez por intercambio iónico con carboximetil-celulosa (CM-celulosa), obteniéndose 15 componentes. Los componentes 4,5 y 6 mostraron toxicidad para crustáceos. C. El componente 9 se pasó por columnas de CM-celulosa. Se llevó a homogeneidad la subfracción II-9.2.2 la cual corresponde a la toxina Cn2. D. Por otro lado del componente 5 en B, se sometió a CLAR en columnas C18, como describe Selisko (123) obteniéndose 9 componentes mayoritarios de los cuales el 4 fue tóxico para acociles. Esta fracción se purificó nuevamente por CLAR (inserto) y el pico mayoritario es el que contiene la toxina Cn11

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

la Fig. 12C. Esta toxina es el componente peptídico mayoritario con un 6.8% de proteína total (118) y es una de las toxinas más potentes para mamíferos ( $LD_{50}=0.4$  mg/20 g de peso de ratón) del veneno de *C. noxius*.

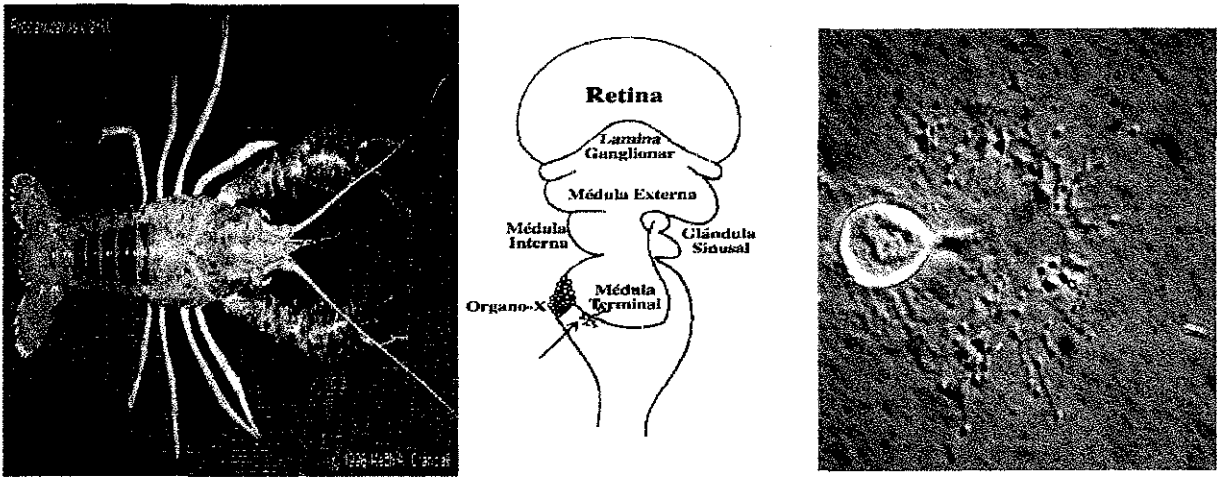
#### **PURIFICACIÓN DE LA TOXINA Cn11.**

La nueva toxina (Cn11) mostró ser específica para crustáceos en los bioensayos realizados, y fue aislada de la fracción II-5. Resultó asimismo, no ser tóxica para ratones a dosis de hasta 180 mg por 20 g de peso de ratón (119), pero sí mostró tener efecto tóxico hacia artrópodos. La fracción II-5 se separó por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), y se obtuvieron nueve sub-fracciones principales. El componente marcado con el número 4, contiene a la toxina pura, la cual se obtuvo finalmente en forma homogénea después de la separación por CLAR en una columna C18 de fase reversa (Fig. 20D, inserto). La fracción marcada con un asterisco fue homogénea, como se demostró con la determinación de la secuencia primaria y el análisis de espectroscopía de masas. La masa molecular determinada para la toxina fue de 6972. Esta nueva toxina fue denominada Cn11 (Cn de la abreviación de la especie *C. noxius* y 11 por ser el undécimo péptido, específico para canales de  $Na^+$  que se ha purificado a homogeneidad de este veneno). La determinación completa de la estructura primaria de Cn11 fue un proceso largo y complicado. Por lo que se desarrolló una novedosa modificación a la técnica de secuenciación descrita (118), como se reporta por Ramírez-Domínguez, 2002 (120).

#### **2) FASE DE CULTIVOS CELULARES.**

##### **CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS DE ACOCIL.**

Se emplearon acociles (crustáceo decápodo) adultos de la especie *Procambarus clarkii*, el manejo, disección y técnica de cultivo de las neuronas del órgano X, se realizó de acuerdo a lo descrito (120). Las neuronas fueron cultivadas a muy bajas densidades, para evitar que formaran interacciones sinápticas entre ellas (Fig. 13). Los ensayos electrofisiológicos fueron llevados a cabo en estas neuronas después de 1-2 días en cultivo.



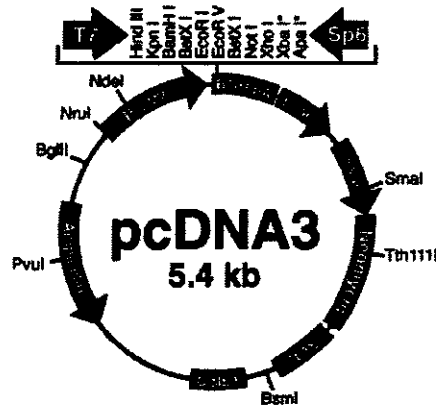
**Figura 13. Cultivo primario de neuronas de crustáceo** Acociles de la especie *Procamburus clarkii* (izquierda) a los que se les extirparon los tallos oculares, disecando el exoesqueleto, tejidos muscular y conectivo, y exponiendo el sistema neurohemal Órgano X- glándula sinusal. Los somas neuronales del OX se localizan en la médula terminal y los axones se dirigen por la médula interna hacia la glándula sinusal (panel central). El conglomerado de somas neuronales se separan del tallo y por dispersión se van sembrando una a una las neuronas en la caja de cultivo (derecha). A las 24 h presentan regeneración axonal y a este tiempo se realizaron los ensayos electrofisiológicos.

#### CULTIVO DE CÉLULAS DE MAMÍFERO Y TRANSFECCIÓN DEL DNAC DEL CANAL DE $\text{Na}^+$ rSKM1.

La línea celular usada fue la de riñón embrionario humano (HEK 293). Las células fueron cultivadas en medio Eagle modificado de Dulbecco D-MEM (GIBCO), suplementado con 10% de suero fetal bovino y se le adicionaron los antibióticos gentamicina (0.9 ml/l) y penicilina-estreptomicina (4.5 ml/l), ( ambas de GIBCO). Las células fueron mantenidas en atmósfera húmeda con 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ , y el cultivo se mantuvo hasta un máximo de 25 pases, tripsinizando y dispersando las células de frascos de cultivo de 5 ml, dos veces por semana en una proporción de 1/15–1/20. En cada pase, se sembraron también células en varias cajas de cultivo de 35 mm y se dejaron crecer a un 70% de confluencia. Estas se transfectaron con el DNAC del canal de  $\text{Na}^+$  recombinante rSKM1 proporcionado generosamente por el Dr. Rolland G. Kallen (Universidad de Pennsylvania, EUA.). Antes de la transfección (30 min.), las células se lavaron con el medio de cultivo D-MEM suplementado con suero, pero sin antibióticos.

El DNAC de la subunidad  $\alpha$  del canal está insertado en el plásmido pcDNA3 (Fig 14), el cual posee dos promotores fuertes: 1) el promotor de citomegalovirus (CMV), que lleva a la expresión del canal, y 2) el promotor de SV40, que permite la expresión del gene de resistencia a Neomicina. Las células HEK293 se transfectaron

transitoriamente con 1-2  $\mu\text{g}$  de DNA, usando el método de precipitación por fosfato de  $\text{Ca}^{2+}$  (121). La mezcla de transfección se dejó en contacto con las células de 3-5 h, y transcurrido el tiempo de transfección éstas se lavaron con medio fresco D-MEM con antibióticos. A las 24 h postransfección, se lavaron las células con medio de cultivo fresco y se procedió a la selección de células que incorporaron el plásmido. Esto se realizó mediante presión selectiva con la aplicación de 100  $\mu\text{l}$ / ml del antibiótico Geneticina G418 (Gibco). Las células con 48-96 h de transfección, se dispersaron por aspersión mecánica suave y se pasaron a cubreobjetos estériles, un mínimo de 2 h previas a realizar los ensayos electrofisiológicos.



**Figura 14. Mapa del plásmido pcDNA3.** El DNAc del canal de  $\text{Na}^+$  recombinante rSkM1 se encuentra insertado en la región del *polylinker*. Se muestran los promotores para CMV y SV40, que inducen la transcripción del gene del canal y del gene de resistencia a Neomicina, respectivamente. Invitrogen.

### 3) FASE ELECTROFISIOLÓGICA.

#### REGISTRO DE CORRIENTES DE $\text{Na}^+$ EN NEURONAS DE ACOCIL.

Para los registros electrofisiológicos se usó la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (*patch-clamp*) en la configuración de célula completa (*whole-cell*) y se aislaron las corrientes macroscópicas de  $\text{Na}^+$  de las neuronas del OX cultivadas. Los registros se obtuvieron usando un amplificador Axopatch-200A (Axon Instruments). Las micropipetas se construyeron de capilares de borosilicato (Sutter Instruments) usando un estirador de pipetas horizontal (Sutter Instruments). Para aislar la corriente de  $\text{Na}^+$ , las neuronas fueron incubadas en una solución externa que contenía (en mM): 190 NaCl, 5 KCl, 10  $\text{CaCl}_2$ , 2  $\text{MgCl}_2$ , 20 TEA-Cl, 5 4-

AP, 2 CdCl<sub>2</sub> y 10 del amortiguador HEPES (pH 7.4) La solución interna contenían (en mM): 20 NaCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 210 CsCH<sub>3</sub>SO<sub>4</sub>, 5 EGTA-K y 10 de amortiguador HEPES, (pH 7.4 con KOH o CsOH) Las pipetas se llenaron con la solución interna y con ésta la resistencia fue de  $3.3 \pm 0.2 \text{ M}\Omega$  La resistencia en serie se compensó en un 65-80% Las corrientes de Na<sup>+</sup> se adquirieron a 50  $\mu\text{s}$  por punto, se filtraron con una frecuencia de 5 kHz y almacenaron en el disco duro usando el sistema de adquisición del convertidor analógico-digital DigiData 1200 y el programa computacional pClamp6, (Axon Instruments) Los transientes capacitivos y las corrientes de fuga se restaron usando el protocolo de P/4 Los ensayos con la toxina Cn11 se realizaron con alícuotas secas y congeladas del péptido puro y se prepararon inmediatamente antes de realizar cada experimento, disolviéndola en solución externa a la concentración deseada La solución externa conteniendo la toxina (10 ml) fue perfundida continuamente en la cámara de registro (250  $\mu\text{l}$ ). Los ensayos de la toxina se hicieron en neuronas con corrientes de Na<sup>+</sup> estables Los diferentes protocolos de estimulación usados se describen en la sección de resultados.

#### **REGISTRO DE CORRIENTES A TRAVÉS DEL CANAL DE Na<sup>+</sup> rSKM1 EN CÉLULAS HEK293.**

Las células HEK293 transfectadas con el canal de Na<sup>+</sup> rSKM1 se usaron 48-96 h post-transfección Se registraron corrientes macroscópicas de Na<sup>+</sup> empleando la técnica de *patch-clamp*, tanto en la configuración de célula completa, como en la configuración del exterior celular-hacia fuera (*outside-out*) La adquisición de los datos se hizo en línea con un amplificador Axopatch-1D (Axon Instruments), un convertidor analógico digital TL-2 (Axon Instruments) y el programa de cómputo pClamp5.1 Los micropipetas se fabricaron a partir de capilares de borosilicato (KIMAX) tanto en un estirador horizontal (Sutter Instruments), como con uno vertical (Sutter Instruments) Las soluciones contenían en mM: 35 NaCl, 105 CsF, 10 EGTA y 10 de amortiguador HEPES (interna); y 150 NaCl, 2 KCl, 1.5 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub> y 10 del amortiguador HEPES (externa), ambas a pH 7.4 Después de llenar las pipetas *de patch* con la solución interna, tuvieron una resistencia de 2-2.5  $\text{M}\Omega$  Las corrientes fueron adquiridas a <50  $\mu\text{s}$  por punto y filtradas en línea a 5 kHz. Los transientes capacitivos se cancelaron en línea con el amplificador y la resta de corrientes de fuga se hizo con el protocolo de P/4. Los diferentes protocolos de estimulación usados se describen en la sección de resultados.



## RESULTADOS

Una parte importante de este trabajo de tesis, ha sido aceptada para su publicación en:

*Journal of Experimental Biology*

con el título:

Cn11, the first example of a scorpion toxin that is a true  
blocker of Na<sup>+</sup> currents on crayfish neurons

Por:

Martha E Ramirez-Dominguez, Timoteo Olamendi-Portugal, Ubaldo Garcia, Consuelo Garcia,  
Hugo Arechiga and Lourival D Possani.

En el anexo 1, se adjunta copia de las pruebas de galera del mismo.

### EFFECTO DE Cn11 SOBRE CANALES DE Na<sup>+</sup> NATIVOS EN NEURONAS DE ACOCIL EN CULTIVO.

En neuronas con 24 h de cultivo, se ensayó el efecto de la toxina Cn11 sobre las corrientes macroscópicas de Na<sup>+</sup>. A este tiempo las células muestran un muy discreto crecimiento axonal, lo cual nos permitió obtener un buen control del voltaje de membrana. La amplitud promedio de corrientes de Na<sup>+</sup> registradas a 0 mV fue de ~2 nA. El protocolo de estimulación usado para registrar las corrientes de Na<sup>+</sup> fue un pulso cuadrado despolarizante a 0 mV, durante 10 ms a partir de un potencial de mantenimiento de -60 mV, y repolarizando posteriormente la membrana a -60 mV. El pulso se aplicó consecutivamente cada 15 s durante 5 min. En la Fig 15 se muestran una serie de registros sobrepuestos de las corrientes de Na<sup>+</sup>, obtenidos en ausencia y en presencia de la toxina Cn11. Estos datos muestran el curso temporal del efecto de la toxina sobre las corrientes de Na<sup>+</sup> en neuronas de crustáceo, en donde la amplitud de corriente se redujo gradualmente en el tiempo que duró la exposición a Cn11, llegando a tener un bloqueo máximo de la corriente de 75% a los 3.5 min. La reversibilidad de este efecto fue de < 15 %, aún después de varios min. de lavado.

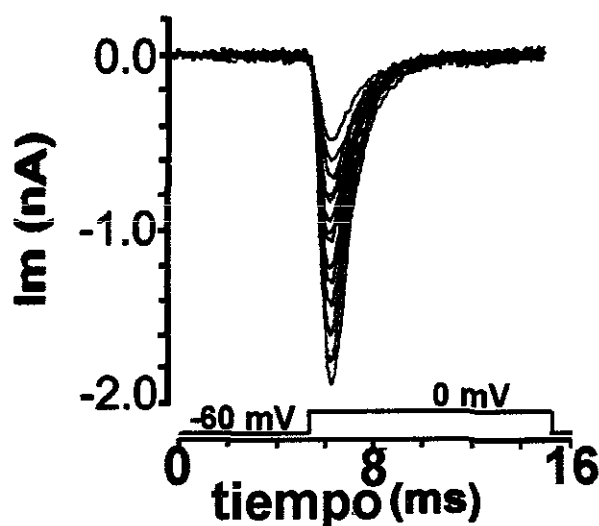


Figura 15. Efecto de Cn11 sobre las corrientes de Na<sup>+</sup> en neuronas en cultivo del OX del acocil *Procambarus clarkii*. Registros obtenidos con la técnica de *patch-clamp* en la modalidad de célula completa usando un protocolo de estimulación con un pulso cuadrado despolarizante a 0 mV, a partir de un potencial de mantenimiento de -60 mV durante 10 ms cada 15 s durante 5 min. Los registros sobrepuestos muestran el curso temporal del efecto de 1  $\mu$ M de Cn11. El registro de mayor amplitud corresponde al promedio de tres registros control, y los de amplitud reducida corresponden a los obtenidos en presencia de Cn11 a diferentes tiempos, indicando una inhibición significativa de la corriente de Na<sup>+</sup>. El 75% del bloqueo se obtuvo a los 3.5 min. de perfusión con la toxina.

### Cn11 NO MODIFICA EL GATING DE LOS CANALES DE Na<sup>+</sup> DEL ACOCIL.

Con el propósito de investigar si la inhibición en la amplitud de corriente de Na<sup>+</sup> se debía a alteraciones en la cinética del canal, se realizó un análisis de los registros obtenidos en ausencia y en presencia de Cn11. En las corrientes de Na<sup>+</sup> registradas a 0 mV en condiciones control, la amplitud máxima se alcanzó a los  $1.0 \pm 0.13$  ms después de iniciado el pulso despolarizante, para posteriormente decaer exponencialmente con una constante de tiempo de  $0.86 \pm 0.05$  ms (n=6). Adicionalmente, los trazos obtenidos al 75% de bloqueo por Cn11, fueron analizados y comparados con aquellos obtenidos en condiciones control, y normalizando los registros en presencia de toxina, como se muestra en la Fig 16. Ambos registros, se empalmaron perfectamente mostrando que ni el tiempo al pico, ni la inactivación rápida se modificaron por acción de la toxina. De estos resultados se puede concluir que Cn11 aparentemente no altera el mecanismo de *gating* de los canales de Na<sup>+</sup> nativos, y que más bien su modo de acción podría estar relacionado con un bloqueo directo de los canales en los crustáceos.

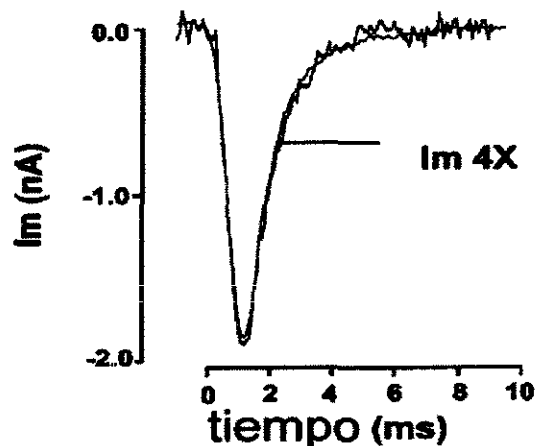


Figura 16. Corrientes de Na<sup>+</sup> registradas a 0 mV en presencia y en ausencia de Cn11. El registro de corriente de Na<sup>+</sup> al 75% de bloqueo por Cn2 se escaló 4X y se superpuso con el registro control. Nótese que no se presentaron cambios en la cinética de la corriente en presencia de la toxina.

### EL EFECTO DE Cn11 SOBRE LA CORRIENTE DE Na<sup>+</sup> EN NEURONAS DE ACOCIL DEPENDE DE LA CONCENTRACIÓN.

Para explorar el efecto de diferentes concentraciones de la toxina y el curso temporal del bloqueo inducido por Cn11 sobre las corrientes de Na<sup>+</sup>, se tomaron registros cada 10 s, usando el mismo protocolo de pulsos descrito en el apartado anterior. Se registraron los tres primeros trazos de corriente en condiciones control, después de los

cuales las células fueron perfundidas durante 160 s con Cn11 a las concentraciones de 50, 100, 200 y 500 nM. Transcurrido el tiempo de exposición, la toxina fue retirada de la cámara de registro lavando la preparación con solución externa normal, aunque el registro continuó durante 160 s más. En la Fig.17, se grafican los cambios de la amplitud de corriente en el tiempo normalizada con respecto al valor promedio en condiciones control ( $I/I_{máx}$ ). El ensayo control se realizó en ausencia de toxina, y en este caso la corriente de  $Na^+$  disminuyó únicamente ~10% durante los primeros 160 s. Esta disminución intrínseca de la corriente en función del tiempo (*rundown*) se consideró para la estimación subsecuente de la amplitud de la corriente de  $Na^+$  en presencia de toxina. En los ensayos en presencia de la toxina la corriente de  $Na^+$  se recuperó parcial y lentamente después del tiempo de lavado únicamente en los experimentos en que se empleó una concentración de 50 nM.

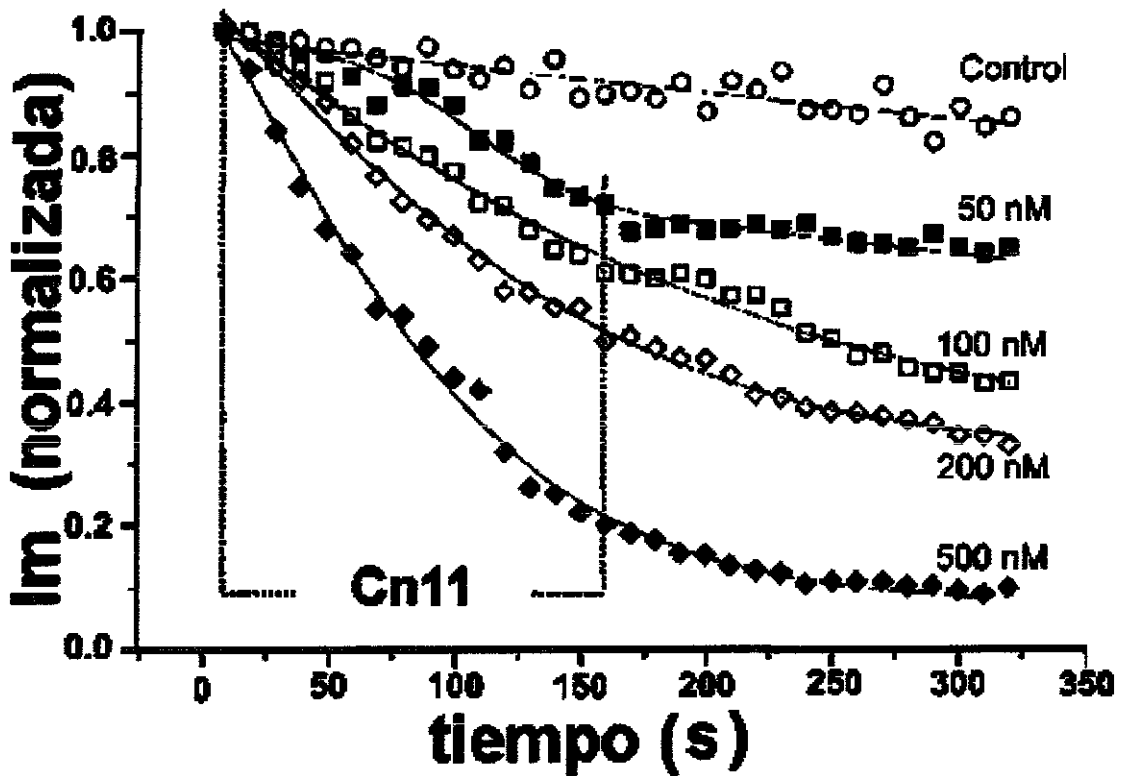


Figura 17. El efecto de Cn11 sobre la corriente de  $Na^+$  en neuronas de acocil es dependiente del tiempo y de la concentración de la toxina. Valores de amplitud de la corriente usando un protocolo de estimulación con un pulso despolarizante a 0 mV, a partir de un potencial de mantenimiento de  $-60$  mV durante 10 ms cada 15 s durante 5 min. Se grafica la amplitud de la corriente normalizada ( $I/I_{máx}$ ) y los cambios que presenta en el tiempo tanto en ausencia como en presencia de toxina. En el ensayo control la corriente de  $Na^+$  tuvo un *rundown* del ~10% durante los primeros 160 s, el cual se consideró para la estimación en la amplitud de corriente de  $Na^+$  en presencia de toxina. Las concentraciones de Cn11 ensayadas fueron 50 nM (■), 100 nM (□), 200 nM (◇) y 500 nM (◆)

#### DETERMINACIÓN DE LA $K_m$ PARA EL BLOQUEO DE Cn11 SOBRE LOS CANALES NEURONALES DE $Na^+$ DE ACOCIL.

A partir de los datos obtenidos en la serie de experimentos detallados en el apartado anterior, se determinó un valor de  $K_m$  de  $\sim 320$  nM para el bloqueo de Cn11 sobre los canales de  $Na^+$  en las neuronas del XO. Esto se realizó tomando los valores de amplitud de corriente de  $Na^+$  a los 70 s posteriores a la aplicación de la toxina en las diferentes concentraciones probadas (50, 100, 200, 500, 1000 y 3000 nM). Los resultados de este análisis se presentan en la Fig 18, en la que cada punto representa el porcentaje de bloqueo de la corriente de  $Na^+$  en función de la concentración de toxina. Asumimos que a los 70 s en que se determinó el valor de corriente, éstas presentaron un *rundown* del  $\sim 5\%$ . La  $K_m$  de 320 nM para Cn11 se estimó a partir de la curva concentración-efecto de la Fig. 18.

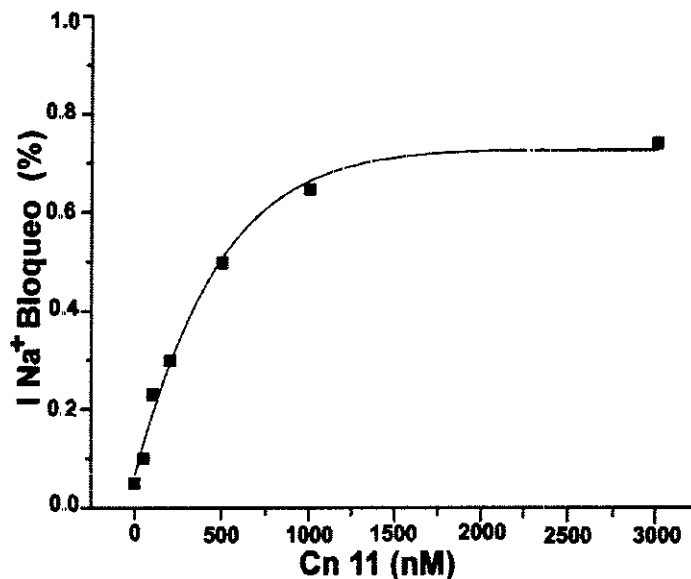
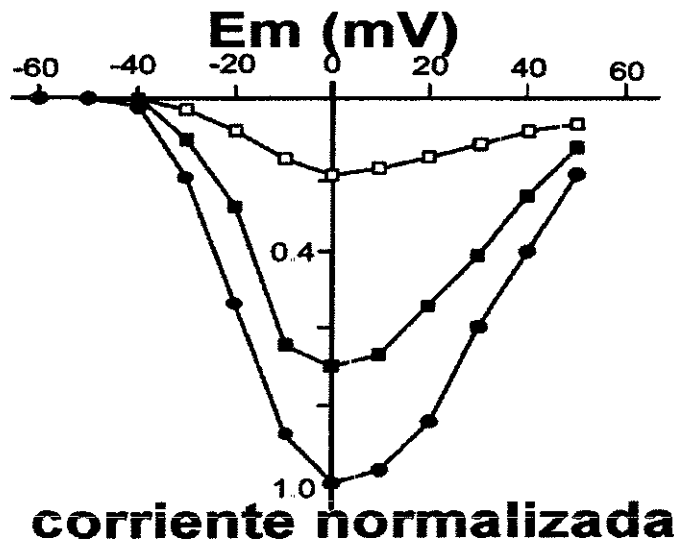


Figura 18. Valor de  $K_m$  determinado para Cn11 sobre los canales de  $Na^+$  en neuronas del XO de *Procambarus clarkii*. Los símbolos representan los valores de la amplitud de la corriente de  $Na^+$  a los 70 s posteriores a la aplicación de la toxina en las diferentes concentraciones probadas (50, 100, 200, 500, 1000 y 3000 nM). Los datos han sido graficados como el porcentaje de bloqueo de la corriente de  $Na^+$ , en función de la concentración de toxina (asumiendo un *rundown* del 5% mostrado a los 70 s). La línea continua representa el mejor ajuste de los datos empleando una función tipo Boltzman, y el valor obtenido para la  $K_m$  fue de 320 nM.

#### Cn11 NO MODIFICA LA DEPENDENCIA AL VOLTAJE DE LOS CANALES DE $Na^+$ NEURONALES DE LOS CRUSTÁCEOS.

Con el propósito de examinar si la aplicación de Cn11 modificaba de algún modo la actividad de los canales, se analizaron las corrientes de  $Na^+$  de las neuronas de crustáceos en los cultivos, en el rango de voltaje  $\pm 50$  mV, usando pulsos despolarizantes con incrementos de 10 mV y con una duración de 10 ms, partiendo de un

potencial de mantenimiento de  $-60$  mV. En la Fig 19 se muestra un ejemplo representativo de la relación I-V obtenida en esta serie de experimentos. Se observa que en ausencia de la toxina (●), el umbral de activación de la corriente fue siempre cercano a  $-40$  mV y alcanzó consistentemente el valor máximo de corriente cerca de los  $0$  mV. Durante la perfusión con concentraciones  $\mu\text{M}$  de Cn11 no se modificaron ni el umbral aparente de activación, ni el valor del potencial de la corriente máxima después de 3 min. Estos datos sugieren que el mecanismo de bloqueo de Cn11 es muy semejante al bloqueo por la TTX, la STX y la  $\mu\text{-CTX}$ . Estos datos además confirman que Cn11 no se comporta como una típica toxina  $\beta$  modificadora del *gating*, sino que es un bloqueador del poro de los canales neuronales de  $\text{Na}^+$  de crustáceos.

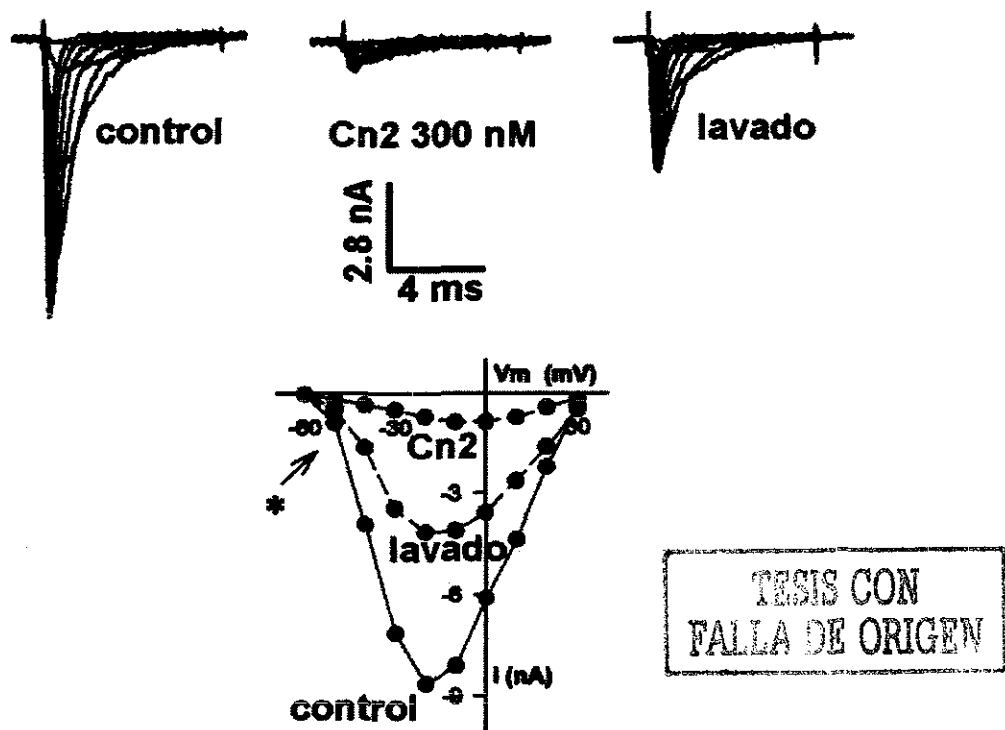


**Figura 19.** Cn11 no modifica la dependencia al voltaje de los canales neuronales de  $\text{Na}^+$  de *Procamburus clarkii*. Relaciones I-V en el rango de voltaje de  $\pm 50$  mV obtenidas en condiciones control (●), donde se observa que el umbral de activación de la corriente fue siempre cercano a  $-40$  mV y que la corriente alcanzó su valor máximo cerca de los  $0$  mV. Durante la perfusión con  $1 \mu\text{M}$  de Cn11 (■) ó  $3 \mu\text{M}$  (□), no se modificaron ni el umbral aparente de activación, ni el valor del potencial de la corriente máxima después de 3 min de exposición a la toxina

#### EFFECTO DE Cn2 SOBRE LOS CANALES DE $\text{Na}^+$ rSKM1 EXPRESADOS EN HEK293.

En células HEK293 transfectadas con la subunidad  $\alpha$  del canal de  $\text{Na}^+$  rSKM1 a las 48h posteriores a la transfección se registraron corrientes rápidas macroscópicas de  $\text{Na}^+$ . Se usó la técnica de *patch clamp* en la configuración de célula completa. El protocolo de estimulación usado consistió de pulsos despolarizantes de  $10$

ms, desde -60 a 30 mV, en incrementos de 10 mV (durante 10 ms) a partir de un potencial de mantenimiento de -100 mV. En la Fig 20 (panel superior), se muestra un ejemplo representativo de los ensayos realizados, donde se presentan registros típicos de familias de corrientes obtenidos en ausencia y en presencia de Cn2. En condiciones control el voltaje aparente, en que se empezaron a registrar corrientes fue de -50 mV. La amplitud máxima de la corriente se registró a los -10 mV y el tiempo al pico a este voltaje fue de <1 ms, después del cual la corriente decayó al entrar los canales en el estado inactivado rápido. Tras la aplicación directa a la solución del baño de alícuotas de Cn2, correspondientes a la concentración de 300 nM, las corrientes de Na<sup>+</sup> se redujeron significativamente. Por ejemplo, en los experimentos control la amplitud al pico de la corriente a -10 mV fue de  $-3.3 \pm 1.7$  nA (n=4) y disminuyó a  $0.33 \pm 0.3$  nA en presencia de 300 nM de Cn2. La disminución en la amplitud de la corriente fue >90%, efecto que se revirtió parcialmente al lavar con perfusión continua la cámara de registro con solución externa normal

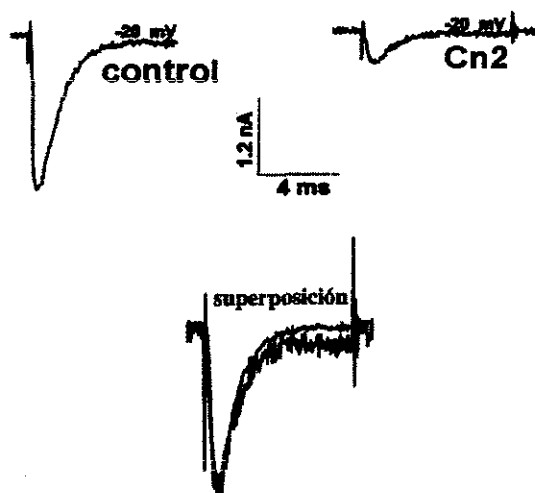


**Figura 20. Efecto de Cn2 sobre las corrientes de Na<sup>+</sup> a través de los canales rSkM1 expresados en las células HEK293.** Corrientes macroscópicas registradas usando el protocolo de pulsos detallado en el texto. El panel superior muestra familias de corrientes en condiciones control (izquierda), en presencia de 300 nM de Cn2 (centro) y después del lavado de la toxina (derecha). El panel inferior muestra las curvas I-V representativas de estos experimentos. Nótese que el voltaje umbral de activación de la corriente en todos los casos fue cercano a -50 mV (\*), mostrando que éste no se modificó por la presencia de la toxina

Con el propósito de determinar si la aplicación de Cn2 modificaba de algún modo la actividad de los canales de  $\text{Na}^+$ , exploramos las propiedades cinéticas de las corrientes en un rango amplio de voltaje (-50 a 30 mV). En el panel inferior de la Fig. 20 se presentan las curvas I-V en ausencia y en presencia de Cn2. En esta figura se puede apreciar que en ausencia de la toxina el umbral de activación de la corriente fue alrededor de -50 mV y el valor máximo de corriente se alcanzó consistentemente a los -10 mV. Tras la aplicación de 300 nM de Cn2, y a diferencia del efecto  $\beta$ , no se modificaron ni el umbral aparente de activación, ni el valor del potencial al cual se alcanza el pico máximo de corriente. También en la Fig. 20 se observa que la inhibición producida por Cn2 ocurrió en todos los rangos de voltaje, sin que hubiera un cruce con la curva control (esto último era el comportamiento esperado de una toxina  $\beta$ ). Estos resultados nos sugieren que la inhibición en la amplitud de corriente, es debida a que Cn2 está actuando como bloqueador de los canales de  $\text{Na}^+$  de mamíferos y no como una típica toxina  $\beta$ .

#### **Cn2 NO MODIFICA EL GATING DE LOS CANALES DE $\text{Na}^+$ rSKM1 EN CÉLULAS HEK293.**

Con el propósito de investigar si la inhibición de la corriente por Cn2 va acompañada de modificaciones cinéticas en los canales, se realizó un análisis de los registros de las corrientes de  $\text{Na}^+$  en ausencia y en presencia de la toxina. Del apartado anterior, los trazos control obtenidos a -20 mV se compararon con los obtenidos en

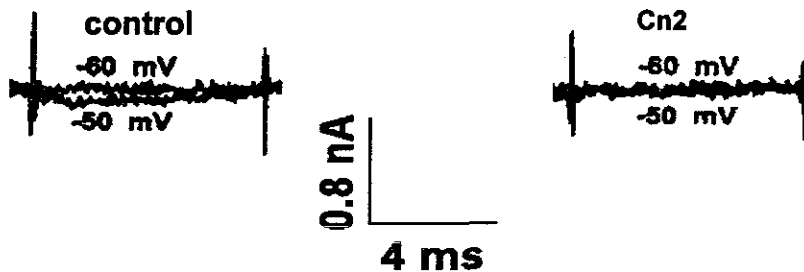


**Figura 21. Efecto de Cn2 sobre la cinética de las corrientes de  $\text{Na}^+$  a través de canales rSkM1 en células HEK293.** Registros de corrientes de  $\text{Na}^+$  a -20 mV en ausencia y en presencia de Cn2 300 nM. El registro en presencia de la toxina ha sido amplificado 4.6 veces para hacer la superposición. Ambos registros se empalmaron para mostrar que ni el tiempo al pico, ni el decaimiento de la corriente se modificaron por efecto de Cn2.



presencia de 300 nM de Cn2. El registro con toxina se normalizaron con respecto al control usando un factor de 4.6X, con el objeto de que ambos tuvieran la misma amplitud. Como se observa en la Fig. 21 ambos registros se empalmaron perfectamente, lo que nos indica que ni el tiempo al pico, ni el decaimiento de la corriente se modificaron por efecto de la toxina. Estos datos corroboran la idea de que Cn2 no está modificando el mecanismo de activación, ni el de inactivación de los canales de Na<sup>+</sup> de músculo esquelético de mamíferos

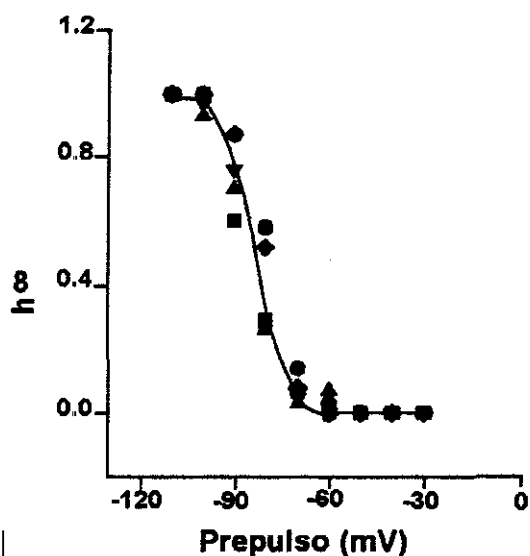
Con el propósito de corroborar si la exposición a Cn2 no producía un corrimiento en el voltaje de activación de los canales de Na<sup>+</sup> comparamos registros obtenidos a voltajes de -60 y -50 mV en presencia y en ausencia de la toxina Cn2. En este intervalo de voltaje comienza la activación de estos canales. En la Fig 22 se muestra un ejemplo de los trazos control, nótese que a -60 mV no se registra corriente y a -50 mV ya se registra una pequeña corriente entrante de Na<sup>+</sup>. Tras la aplicación de 300 nM de Cn2, no se registró corriente ni a -60, ni a -50 mV. Lo que nos indica que Cn2 no se comporta como una típica toxina β, pues no está activando los canales de Na<sup>+</sup> a voltajes más negativos.



**Figura 22. Cn2 no desplaza el voltaje de activación de los canales rSkM1 hacia voltajes hiperpolarizados**  
Corrientes de Na<sup>+</sup> a -60 y -50 mV en presencia y en ausencia de 300 nM de Cn2, según se indica en el texto

Para estudiar la inactivación en el estado estacionario ( $h^\infty$ ) de los canales de Na<sup>+</sup> rSkM1, en ausencia y en presencia de Cn2, se utilizó un protocolo convencional de dos pulsos (1) donde partiendo de un potencial de mantenimiento de -110 mV se aplicó una serie de pulsos condicionantes de 1 s de duración, en el rango de voltaje de -100 a -30 mV (cada 10 mV), seguidos de un breve pulso despolarizante a -10 mV. Los datos obtenidos se muestran en la resultante curva de inactivación en el estado estacionario de la Fig 23. Los puntos se ajustaron a una ecuación de Boltzmann de la forma:  $I_{Na} = I_{max} / (1 + \exp((Vm - V_{1/2})/k))$ , donde  $I_{max}$  es la corriente máxima calculada,  $V_{1/2}$  es el potencial de membrana en que la mitad de la corriente esta inactivada, y  $k$  es la

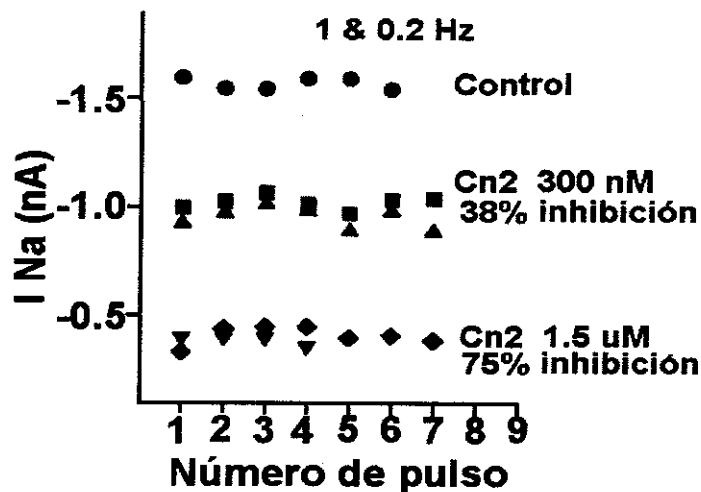
pendiente. Como es evidente de la figura 23 la dependencia de voltaje de la inactivación en el estado estacionario de los canales de Na<sup>+</sup> rSkM1, en tres diferentes células tratadas con diferentes concentraciones de Cn2 (▲ 100, ▼ 200 y ■ 300 nM) fueron casi idénticas a la observada en las células control (●). De este modo, concluimos que a diferencia de las toxinas β, la toxina Cn2 no induce modificaciones sobre la inactivación en el estado estacionario de los canales. Por consiguiente, podemos aseverar que Cn2 no modifica el *gating* y está actuando como un bloqueador del poro de los canales de Na<sup>+</sup> de mamíferos.



**Figura 23. Cn2 no modifica la inactivación de los canales de Na<sup>+</sup> de mamíferos.** Curva de inactivación en el estado estacionario para los canales rSkM1 en ausencia (●) y en presencia de diferentes concentraciones de Cn2 (▲ 100, ▼ 200 y ■ 300 nM). Estos datos fueron casi idénticos a los observados en las células control. Los datos obtenidos se ajustaron a una función de Boltzmann

#### **EL EFECTO BLOQUEADOR DE Cn2 SOBRE rSKM1 NO DEPENDE DE LA FRECUENCIA DEL ESTÍMULO NI DEL VOLTAJE.**

En otra serie de experimentos, se analizaron algunas de las características del bloqueo que Cn2 ejerce sobre los canales de Na<sup>+</sup> rSkM1, para determinar si existe alguna similitud con el bloqueo que TTX y STX ejercen sobre los canales de Na<sup>+</sup> sensibles a ellas. En este caso, se empleó un protocolo de estimulación con pulsos despolarizantes de -10 mV/8 ms, a partir de un potencial de mantenimiento de -100 mV. Estos pulsos fueron aplicados a dos diferentes frecuencias de estimulación: 1 y 0.2 Hz, es decir 1 pulso/s y 5 pulsos/s respectivamente.

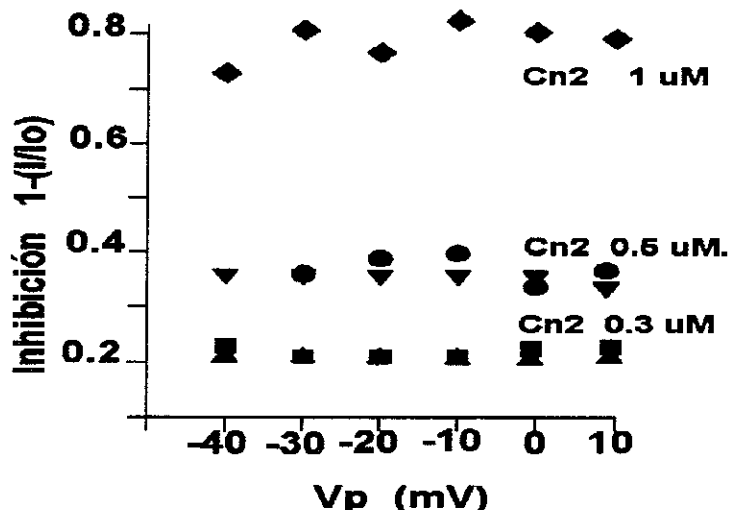


**Figura 24. Efecto de la frecuencia de estimulación sobre el bloqueo de Cn2.** Valores de amplitud de la corriente de  $\text{Na}^+$  a  $-10$  mV, obtenidos a dos distintas frecuencias de estimulación. (●) Control, Cn2 300 nM a 1 Hz (■) ó 0.2 Hz (▲), y 1.5  $\mu\text{M}$  de Cn2 a 1Hz (▼) y a 0.2 Hz (◆).

Se determinó la amplitud de corriente en presencia de altas concentraciones de Cn2, a ambas frecuencias. Los resultados se presentan en la Fig. 24, en donde se observa que en condiciones control (●) la amplitud de la corriente fue de  $-1.5$  nA, y que disminuyó a un 38% en presencia de 300 nM de Cn2, sin que se observaran cambios significativos en la amplitud de la corriente en respuesta a los estímulos aplicados a las dos distintas frecuencias utilizadas: 1 Hz (■) ó 0.2 Hz (▲). Esto es, a diferencia del bloqueo por TTX y STX, el bloqueo por Cn2 no es uso dependiente. Para el caso de la aplicación de 1.5  $\mu\text{M}$  de Cn2, la corriente de  $\text{Na}^+$  tuvo valores cercanos a los  $-0.5$  nA a 1Hz (▼) así como a 0.2 Hz (◆). Estos resultados nos muestran que: a) el efecto bloqueador de Cn2 es dependiente de la concentración y b) que no se observa un bloqueo acumulativo, es decir una reducción progresiva en el pico de la corriente, debida al aumento en la frecuencia de estimulación. Este dato sugieren que el bloqueo por Cn2, a diferencia de TTX y STX, no depende de la frecuencia de estimulación.

En la Fig 25 se presentan los resultados de la relación de fracción de corriente bloqueada ( $\{1-(I/I_0)\}$ ), en función del voltaje transmembranal, en presencia de la toxina Cn2. En la gráfica se muestra que la modificación en la amplitud de la corriente, se debe exclusivamente a la aplicación de la Cn2 (con un comportamiento dependiente de la concentración), sin que se presente modificación alguna en la amplitud de corriente, a los

diferentes voltajes de prueba. Se observa que el comportamiento fue lineal en el rango de voltaje probado. Estos resultados indican que el bloqueo por Cn2 se está llevando a efecto desde el estado cerrado del canal, ya que no depende del voltaje transmembranal.



**Figura 25.** El bloqueo de Cn2 sobre los canales rSKM1 no es dependiente del voltaje transmembranal. Relación de corriente de Na<sup>+</sup> representada como la fracción de bloqueada, respecto a diferentes potenciales de prueba. Se presentan sobrepuestos datos obtenidos en diferentes experimentos realizados por separado con concentraciones crecientes de Cn2.

#### RELACIÓN DOSIS-RESPUESTA Y DETERMINACIÓN DE LA K<sub>D</sub> DEL BLOQUEO POR Cn2 DE LOS CANALES DE Na<sup>+</sup> rSKM1.

Finalmente, en otra serie de experimentos se registraron las corrientes de Na<sup>+</sup> con pulsos despolarizantes de 8 ms de duración, en el intervalo de voltaje de -40 a 30 mV, a partir de un potencial de mantenimiento de -100 mV, y con ese protocolo de pulsos se determinó la magnitud del bloqueo ejercido por Cn2 a diferentes concentraciones. En estos experimentos se utilizaron diferentes células y se probaron distintas concentraciones de la toxina. En la curva dosis-respuesta que se muestra en la Fig. 26, cada punto representa el valor promedio (4-6 repeticiones) del porcentaje de bloqueo de la corriente de Na<sup>+</sup> registrada a -10 mV, con cada una de las concentraciones probadas (65, 190, 250, 325, 520 y 1000 nM). Con los datos anteriores se determinó el valor de K<sub>D</sub> de 230 nM, con las recíprocas de los valores de concentración de la toxina (1/Cn2), respecto a la fracción de corriente bloqueada (I/fb), donde fb=1-(I/I<sub>0</sub>)

## DISCUSIÓN.

En términos generales las neurotoxinas que actúan sobre los CSDV ejercen su mecanismo de acción en tres mecanismos diferentes: 1) bloqueando el poro, 2) modulando alostérica e indirectamente el mecanismo de apertura y cierre de los canales, mejor conocido como *gating*, y 3) modulando directamente el *gating*, mediante un mecanismo específico denominado inmovilización del sensor de voltaje

Las toxinas bloqueadoras inhiben la conductancia iónica al obstruir físicamente la vía de permeabilidad, al interactuar (extra- o intracelularmente) con el vestíbulo del poro del canal. La interacción con el vestíbulo externo, es el mecanismo empleado por las toxinas de guanidino (TTX y STX) y la toxina polipeptídica  $\mu$ -CTX. Por otra parte, los anestésicos locales bloquean intracelularmente al canal, mediante la interacción con el vestíbulo interno del poro. Las neurotoxinas no peptídicas que son modificadoras del *gating*, actúan a través de un mecanismo alostérico al unirse en sitios receptores diferentes a los que se unen las toxinas peptídicas. Se ha propuesto que las toxinas polipeptídicas de anémone y de alacranes, se unen a sitios receptores extracelulares, y modifican el *gating* del canal al mantener inmovilizado al sensor de voltaje en diferentes posiciones. Los estudios que definen los sitios receptores y los mecanismos de acción de estas neurotoxinas han sido revisadas recientemente (122)

Del alacrán *C. noxius* se han identificado más de 10 toxinas contra canales de  $\text{Na}^+$ , consideradas estructuralmente  $\beta$ . Dos de ellas en los bioensayos realizados, mostraron especificidad por mamíferos (Cn2) o por crustáceos (Cn11). Esta última es una toxina nueva, que se describe por primera vez bioquímica y funcionalmente en este trabajo. El desarrollo de esta parte del proyecto se realizó con la colaboración del Dr. Ubaldo Garcia (CINVESTAV, IPN). Se emplearon cultivos primarios de neuronas del órgano X del acocil *Procambarus clarkii* como sistema modelo. En éstas se determinó el efecto de la toxina Cn11 sobre las corrientes de  $\text{Na}^+$  sensibles a TTX. Aunque no se mostró en la sección de resultados, la especificidad de Cn11 para los CSDV se corroboró al ensayarla sobre corrientes aisladas de  $\text{K}^+$  y de  $\text{Ca}^{2+}$ . La toxina no afectó las propiedades cinéticas, ni la dependencia del voltaje transmembranal de dichas corrientes.

Los resultados obtenidos en los CSDV de neuronas en cultivo, señalan que contrario a lo descrito para una toxina  $\beta$ , esta nueva toxina no modifica el mecanismo de *gating*, sino que es un bloqueador del poro de los CSDV neuronales de los crustáceos. Este bloqueo es dependiente de la concentración, con una Km de 320 nM. Además, Cn11 no modifica la dependencia del voltaje de la actividad estos canales de Na<sup>+</sup> sensibles a TTX. Nuestros resultados señalan que Cn11 es la primer toxina de alacrán contra CSDV con actividad bloqueadora.

Cabe señalar en este punto, que el bloqueo por Cn11 no fue total, dado que quedaba una pequeña fracción de corriente de Na<sup>+</sup> remanente (5-15%), aún a concentraciones altas y en tiempos prolongados de perfusión. Este hecho nos sugiere que la fracción no bloqueada por Cn11 podría corresponder a una población de CSDV neuronales insensibles a TTX (TTX-R). Este tipo de canales se han descrito para algunas neuronas del órgano X, en preparaciones del tallo ocular aislado (145). Esta corriente de Na<sup>+</sup> TTX-R se presenta en células con actividad eléctrica tipo marcapaso (aquéllas que disparan trenes de potenciales de acción). Sin embargo, estas corrientes TTX-R no han sido aisladas para el estudio de su dependencia al voltaje transmembranal y la determinación de sus parámetros cinéticos. De esta manera, cabe la posibilidad que Cn11 sea una toxina que probablemente discrimine entre estos dos tipos de CSDV presentes en las neuronas del acocil.

En lo referente a la toxina Cn2, su función fue descrita previamente en un sistema de expresión heteróloga (ovocitos de *Xenopus laevis*), usando la subunidad  $\alpha$  de los canales de Na<sup>+</sup> rSkM1-2, isoforma de músculo esquelético de rata sensible a la TTX y a la  $\mu$ -CTX tipo GIIIA (117). En ese trabajo, se describió el efecto de Cn2 como una típica toxina  $\beta$ . Con base en estos antecedentes, nos propusimos comenzar a estudiar más a fondo la relación de la toxina Cn2 con los CSDV de mamíferos, para de esta manera comenzar a dilucidar los determinantes estructurales involucrados en los posibles sitios de la interacción entre la toxina y los CSDV. Para esto, implementamos en el laboratorio el sistema de expresión heteróloga del canal de Na<sup>+</sup> de músculo esquelético de rata (rSkM1), sensible a TTX y la  $\mu$ -CTX tipo GIIIB, expresado en la línea celular de riñón embrionario humano (HEK293). Esta parte del estudio, la realizamos con la asesoría del Dr. Froylán Gómez-

Lagunas (Fac. Medicina, UNAM) y gracias a la colaboración con el Dr. Rolland Kallen (Universidad de Pennsylvania, EUA) quien proporcionó la clona del canal. Las células HEK293 fueron amablemente proporcionadas por la Dra. Ligia Toro (UCLA, EUA).

Los resultados obtenidos con Cn2 en este sistema de CSDV interesantemente difiere de lo reportado (117), ya que ésta no afectó el mecanismo de *gating* de los CSDV. Esta discrepancia puede surgir de las diferencias en el sistema de expresión (ovocitos respecto a células de mamíferos), así como de las diferencias en los residuos del poro del canal que confieren la sensibilidad a las isoformas de  $\mu$ -CTX en rSKM1, respecto a rSKM1-2.

En este trabajo de tesis demostramos que en nuestro sistema de expresión, Cn2 resultó ser una toxina bloqueadora del poro de los canales rSkM1, como lo son TTX, STX y  $\mu$ -CTX. El bloqueo por Cn2 fue dependiente de la concentración con una Kd de 230 nM. El bloqueo por Cn2 no mostró ser dependiente de la frecuencia de estimulación (uso-dependencia), ni del voltaje transmembranal. Estas características del bloqueo de Cn2, difieren sin embargo de las características del bloqueo por la TTX y la STX que son uso- y voltaje-dependientes. Estos resultados sugieren fuertemente que el bloqueo de Cn2 en los canales rSkM1, se está llevando a efecto desde el estado cerrado del canal, aunque nuestros datos no excluyen la posibilidad de que también pueda unirse al canal abierto.

La uso-dependencia es también una característica del efecto del bloqueo de los anestésicos locales, los cuales bloquean el poro del canal desde el lado citoplásmico a nivel del vestibulo interno del poro. Esta uso-dependencia del bloqueo se ha considerado como una evidencia de que dichas toxinas se unen mejor al canal en el estado abierto que en el cerrado (1). Esta característica del bloqueo de la TTX y la STX fue inicialmente reportada para la isoforma cardíaca (124), y se ha observado también en preparaciones altamente sensibles a dichas toxinas, como lo es el axón del acocil *Procambarus clarkii* (125) y el nodo de Ranvier de rana (126), y parece ser común a todos los CSDV.

Se ha sugerido que en el reposo el canal tiene una menor afinidad por la TTX, debido a que a menudo ésta se une al poro, cuando el canal está albergando en un sitio más interno a un ión  $\text{Na}^+$  o  $\text{Ca}^{2+}$ . Este ión impide la interacción con la toxina (125), y de esta manera, el ión permanece atrapado en el poro mientras el canal está

cerrado La despolarización de la membrana confiere al canal una alta probabilidad de abrirse, y de este modo permite que el ión escape hacia el medio intracelular, incrementando así la estabilidad del estado conformacional del canal, que permite el pegado de la TTX. Este mecanismo es apoyado por los estudios de la interacción de TTX con los CSDV que es antagonizada por cationes mono y divalentes (127,128).

#### **RELACIÓN DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE Cn2 Y Cn11 CON LOS GRUPOS DE TOXINAS DE ALACRÁN CONTRA CSDV.**

En este trabajo de tesis hemos mostrado que Cn2 y Cn11 son las primeras toxinas de alacrán bloqueadoras del poro de los CSDV. En contraste a lo descrito para todas las demás toxinas de alacrán contra canales de Na<sup>+</sup> estudiadas a la fecha, que son modificadoras del *gating*. Estos resultados nos llevan a incluir, dentro de la clasificación propuesta (104) un nuevo grupo el cual conjunta a las toxinas bloqueadoras de los canales de Na<sup>+</sup>. Interesantemente este 11º grupo muestra también especificidad hacia canales de mamífero (Cn2) o de artrópodo (Cn11), siendo de este modo las toxinas tipo para cada especie animal

Se realizó un análisis de la identidad de secuencia haciendo comparaciones pareadas de la nueva toxina Cn11, con cada una de las secuencias de las toxinas tipo de los 10 grupos propuestos (Fig. 27). Se introdujeron espacios para reforzar las similitudes y colocar los residuos de C en posiciones equivalentes. Sólo el grupo 10, que es una toxina del insecto (AaHIT), tiene un enlace disulfuro que no encaja exactamente con los otros. El grupo más estrechamente relacionado con Cn11 es el 4 ya que tiene un 56% de identidad con la toxina. Las otras toxinas tienen identidades de sólo el 28-46%. En general, se conservan las dos secuencias consenso CXXXC y la CXC, donde C representa cisteína y X cualquier residuo que sirva para estabilizar la estructura tridimensional al unir la  $\alpha$ -hélice con los segmentos de la hoja  $\beta$ . Se observa que entre Cn11 y Cn2 existe sólo un 25% de identidad y sin embargo estas toxinas poseen propiedades de bloqueadores de CSDV. De este modo podemos decir que el argumento más importante para clasificar a Cn2 y a Cn11 como un grupo distinto reside en su efecto sobre los CSDV



Figura 27. Porcentaje de identidad al comparar las toxinas tipo para CSDV de cada grupo con Cn11.

Gpo. Toxina	Secuencia de aminoácidos									%Identidad/ Cn11																																																																		
	1	10	20	30	40	50	60	70																																																																				
1. AaHII	V	K	D	G	Y	L	V	-	D	D	V	N	C	T	Y	F	C	G	R	-	-	-	N	A	V	C	N	E	E	C	I	K	L	K	G	E	-	-	S	G	Y	C	O	W	A	S	P	Y	G	N	A	C	Y	C	Y	K	L	P	D	H	V	R	-	-	I	K	G	P	G	R	C	H	36			
2. CssII	-	K	E	G	Y	L	V	S	K	S	T	C	C	K	Y	E	C	L	K	L	G	D	N	D	Y	C	L	R	E	C	F	O	O	Y	G	K	S	S	G	Y	C	Y	-	A	-	-	-	F	A	C	W	C	T	H	L	Y	E	Q	A	V	V	W	P	L	P	N	K	I	C	N	32					
3. Tsgamma	-	K	E	G	Y	L	M	D	H	E	-	C	C	K	L	S	C	F	I	-	R	E	S	G	Y	C	G	R	E	C	G	L	K	K	G	-	-	S	S	G	Y	C	A	W	-	P	-	-	-	A	C	Y	C	Y	G	L	P	N	W	V	K	V	D	R	A	T	N	K	C	-	46					
4. LqhIT2	-	-	D	G	Y	I	K	R	R	D	-	C	C	K	V	F	C	L	I	G	-	N	-	E	G	D	K	E	C	K	A	-	Y	G	G	-	S	Y	G	C	W	T	W	-	-	-	G	L	A	C	W	C	E	G	E	P	D	-	K	I	W	K	S	E	T	N	T	C	G	56						
5. LqqIV	G	V	R	D	A	I	A	D	D	K	N	C	V	Y	T	C	G	S	-	N	-	S	Y	C	N	T	E	C	T	-	K	N	-	G	A	E	S	G	Y	C	O	W	L	G	K	Y	G	N	A	C	W	C	I	K	L	P	D	K	V	-	-	P	I	R	I	P	G	K	R	34						
6. LqqIII	V	R	D	A	I	A	K	N	Y	-	N	C	V	Y	E	C	E	R	-	-	D	S	Y	C	N	D	E	C	T	-	K	N	-	G	A	S	S	G	Y	C	O	W	A	C	K	Y	G	N	A	C	W	C	Y	A	L	P	D	N	V	P	I	-	-	R	V	P	G	K	C	H	37					
7. AaHIT4	-	E	H	G	Y	L	N	K	Y	T	C	C	K	V	C	V	T	-	-	N	N	E	C	G	Y	L	C	N	-	K	R	R	G	Y	Y	G	Y	F	W	K	L	-	-	-	A	C	Y	C	O	G	A	R	K	S	-	E	L	N	Y	K	T	N	K	C	D	L	42									
8. CsEv3	-	K	E	G	Y	L	V	K	S	D	C	C	K	Y	C	L	K	L	G	E	N	E	C	D	T	E	C	K	A	K	N	O	G	G	S	Y	G	Y	C	Y	A	-	P	-	-	-	A	C	W	C	E	G	L	P	E	S	T	P	T	Y	P	L	P	N	K	S	C	-	35							
9. Cn10	-	K	E	G	Y	L	V	N	K	S	T	C	C	K	Y	N	C	L	I	L	G	E	N	K	C	D	M	E	C	K	A	K	N	O	G	G	S	Y	G	Y	C	Y	K	-	L	-	-	-	A	C	W	C	E	G	L	P	E	S	T	P	T	Y	P	I	P	G	K	C	R	T	39					
10. AaHIT	K	K	N	G	Y	A	V	D	S	S	-	G	K	A	P	E	C	L	L	S	-	N	Y	-	C	Y	N	N	E	C	T	K	V	H	A	D	K	-	Y	C	C	L	-	L	-	-	-	S	C	Y	C	F	G	L	N	D	D	K	V	L	E	I	S	D	T	R	K	S	Y	C	D	T	T	E	N	28
11. Cn11	A	R	D	G	Y	P	V	D	E	K	-	C	C	K	L	S	G	L	I	-	N	D	K	M	C	N	S	A	C	H	S	R	-	-	G	G	K	Y	G	Y	C	Y	T	-	G	-	-	G	L	A	C	Y	C	E	A	V	P	D	N	V	K	V	W	T	Y	E	T	N	T	C	-	100				
Cn2	K	E	G	Y	L	V	D	K	N	F	-	C	C	K	Y	E	C	L	K	E	G	D	N	D	Y	C	L	R	E	C	F	O	O	Y	G	R	G	A	G	G	Y	C	Y	-	-	-	-	A	F	A	C	W	C	T	H	L	Y	E	Q	A	V	W	P	L	P	N	K	R	C	S	25					

En términos generales podemos decir que el bloqueo producido por Cn2 y Cn11 sobre los CSDV es similar al bloqueo ejercido por TTX, STX y  $\mu$ -CTX. Esto nos hace suponer que ambas toxinas de alacrán se unen también al sitio 1, en la región de mayor amplitud del vestibulo externo poro del canal. Además el hecho de que ambas bloqueen en forma independiente del voltaje los CSDV, sugiere fuertemente que tanto Cn2 como Cn11 estarían interactuando muy probablemente a nivel del vestibulo externo del poro, sin que su unión interfiera con los dominios estructurales involucrados en el mecanismo de apertura y cierre del canal de Na<sup>+</sup>. Por esta razón, proponemos que Cn2 y Cn11 constituyen herramientas invaluable para el estudio de la estructura del poro, específicamente de la región más externa del vestibulo del poro, de forma semejante como la TTX, la STX (30) y el  $\mu$ -CTX lo han sido para modelar la región más interna del poro (30, 69, 70, 75, 76, 130, 131).

Cabe señalar aquí que otro aspecto relevante de los resultados obtenidos en este trabajo es que Cn2 y Cn11 presentan también especificidad hacia diferentes especies animales. Y el hecho de que existan toxinas que afecten específicamente a los canales CSDV de los artrópodos, es de particular interés biotecnológico dado su potencial papel insecticida (132-136). En varios trabajos, se muestran ejemplos de que no existe ninguna diferencia esencial en la susceptibilidad a las toxinas entre los CSDV de vertebrados y los de insectos. Obviamente, los canales de Na<sup>+</sup> han permanecido muy conservados durante la evolución (137), sin embargo existen algunas



diferencias entre los CSDV de diferentes insectos (y otros invertebrados) respecto a los de vertebrados, entre las que destaca el hecho de que los CSDV de insecto son generalmente más sensibles a TTX que los de vertebrados, aunque hay excepciones a esta regla (136,138-140).

#### **DETERMINANTES MOLECULARES DE LA INTERACCIÓN DE LAS NEUROTOXINAS CON LOS CSDV.**

Diversos estudios funcionales han propuesto el mecanismo por el que las toxinas  $\alpha$  de alacrán y las toxinas de anémona enlentecen la inactivación al evitar el movimiento de las cargas del segmento IVS4, impidiendo por lo tanto los cambios conformacionales que son necesarios para la inactivación rápida. Este mecanismo de acción se basa en la evidencia reciente obtenida en ensayos electrofisiológicos en los que se han determinado las corrientes de compuerta o de *gating* (141)

El conocimiento de las bases moleculares de la interacción de las toxinas  $\beta$  de alacrán con los CSDV, es menor en comparación con el conocimiento actual respecto a los sitios de unión de las toxinas  $\alpha$  de alacrán y las toxinas bloqueadoras de los CSDV. El mecanismo de acción propuesto para las toxinas  $\beta$  sobre los CSDV, involucra su interacción con el extremo extracelular del segmento IIS4. Durante la depolarización el S4 se mueve hacia fuera, y de este modo las toxinas  $\beta$  se unen a un residuo del asa S3-S4 que queda accesible. Se propone entonces que el pegado de la toxina  $\beta$  atrapa y estabiliza el IIS4 en su posición saliente y activada.

Con el propósito de discutir más a fondo respecto a los efectos bloqueadores de las toxinas de alacrán Cn11 y Cn2, y sus probables interacciones con los CSDV es necesario mencionar varias de las características del bloqueo de algunas toxinas bloqueadoras de canales iónicos dependientes de voltaje. Las toxinas bloqueadoras se unen al poro de los canales iónicos y evitan el flujo de iones a través de ellos, de una manera todo o nada. Se ha demostrado que para inhibir la corriente iónica la caribdotoxina (147) y la agitoxina-2 (148) se colocan como una especie de "gorra" sobre el poro del canal de  $K^+$ . En una variedad de canales de  $Na^+$  la TTX y la STX, bloquean el poro al insertarse como un "corcho" a una botella al unirse directamente en regiones cercanas al filtro de selectividad (1). La  $\mu$ -CTX es un potente bloqueador de tipo todo o nada, que actúa

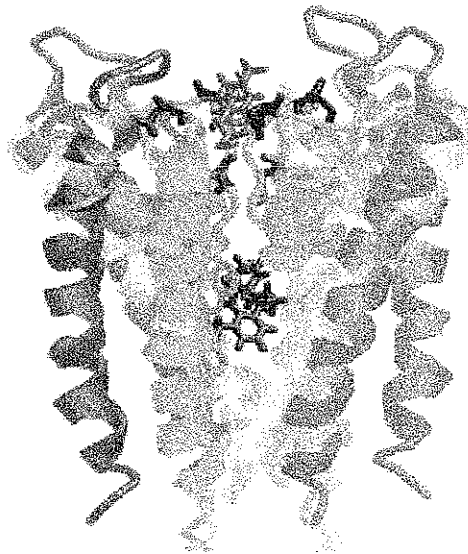
solamente sobre los CSDV de músculo esquelético (150) Aunque se conoce la estructura de la  $\mu$ -CTX (149) y que su sitio de unión se sobrelapa con el de la TTX y la STX (150), su mecanismo de acción es incierto. La unión de la  $\mu$ -CTX recae sobre interacciones múltiples con el canal, y no depende de algún residuo en particular de la toxina (130), sin embargo, el bloqueo total de la corriente involucra la localización estratégica de una carga positiva cercana a la vía de permeación, pero no en el filtro de selectividad.

El bloqueo depende de forma importante del residuo R13, el cual es estabilizado en el vestíbulo externo del poro a través de múltiples interacciones de unión toxina-canal (76). Además, R13 también interactúa fuertemente con el residuo E758 del DII, localizado tres posiciones arriba del filtro de selectividad (151). Este E758 es importante para la conducción iónica, pero no para la selectividad. Con la generación de diversas mutantes de la  $\mu$ -CTX en el residuo 13, sugieren que la toxina puede bloquear la corriente iónica a través de los canales de  $\text{Na}^+$ , en parte por reducir la efectividad del E758 en la facilitación del movimiento del catión a través del poro. Del mismo modo, al incrementar la longitud de las cadenas laterales en el residuo 13, parecen reflejar una inhibición estérica. La mutación R13Q de la  $\mu$ -CTX, produce un bloqueo parcial de la corriente de  $\text{Na}^+$ , ya que resulta una corriente residual significativa (~30%). De tal manera que esta mutante de la toxina y bloqueadores parciales constiuyen oportunidades únicas para estudiar los determinantes moleculares de la función del canal sin mutar la proteína del canal al permitir identificar los requerimientos electrostáticos y estéricos para el bloqueo de la corriente iónica por las toxinas (151-153)

Recientemente MacKinnon y colaboradores han resuelto a 3.2 Å la estructura de un canal de  $\text{K}^+$  bacterial, llamado KcsA (146). Este canal tiene la selectividad característica de los canales de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje. La región del poro del canal KcsA se ha analizado a nivel estructural y ha constituido un excelente modelo para el estudio de la permeación en muchos canales iónicos, incluyendo a los canales de  $\text{Na}^+$ . Esto ha dado gran información acerca del proceso de permeación del poro y de la selectividad del  $\text{K}^+$ . Sin embargo, el canal KcsA no tiene un mecanismo de *gating* dependiente del voltaje, y de este modo no proporciona información acerca de este mecanismo. La estructura del cristal de la parte que forma el poro del canal KcsA,

constituye un posible motivo estructural relacionado a todos los canales iónicos dependientes de voltaje. Sin embargo, la estructura de la región del poro de los CSDV se cree es diferente. Esto es debido a que en ellos la selectividad es determinada por las interacciones de las cadenas laterales, en vez de los carbonilos de la cadena principal en los canales de  $K^+$ , además en su vestíbulo externo se unen moléculas relativamente grandes como TTX, STX y  $\mu$ -CTX.

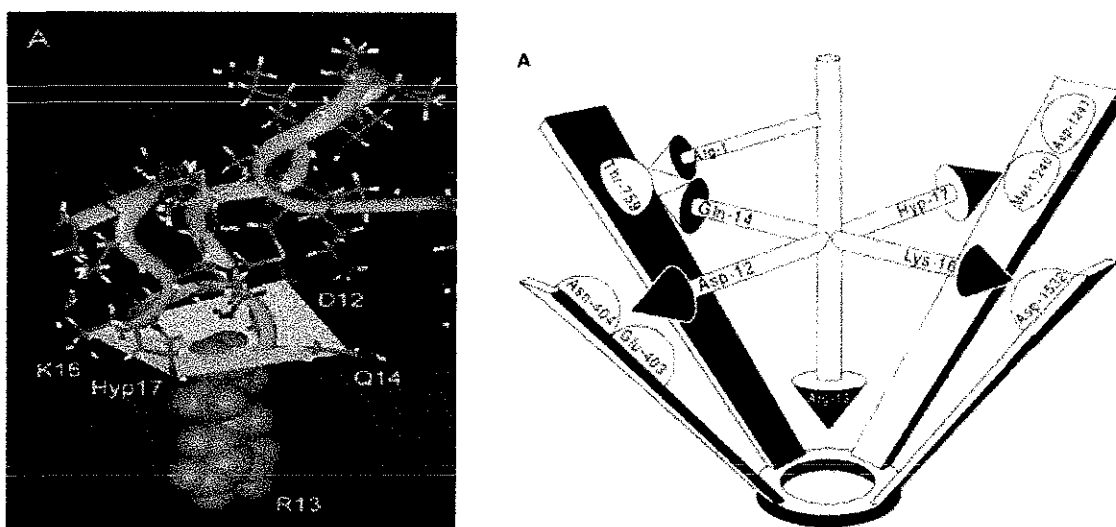
La estructura de la región del poro de los CSDV y los segmentos transmembranales que lo contienen (S5-S6), es similar al de KcsA, donde el poro está flanqueado por dos segmentos transmembranales M1 y M2. En la Fig. 28 se muestra el modelo del poro de los CSDV propuesto por Lipkind y Fozzard (142), realizado en base a la estructura del canal de  $K^+$  bacteriano. El modelo del poro de los CSDV se ajustó a un motivo estructural de  $\alpha$  hélice-vuelta-cadena  $\beta$ , el cual mantiene la interacción descrita experimentalmente de las toxinas bloqueadoras con el canal. En él se puede observar que en la parte central se localizan los segmentos P de cada dominio, que en la región del filtro de selectividad se encuentran alineados. En la región inmediata superior



**Figura 28. Estructura de los segmentos S5-S6 en los CSDV.** El modelo del poro de los CSDV ha sido realizado con base a la estructura del canal de  $K^+$  de la bacteria KcsA. Los distintos colores empleados muestran el sitio de interacción de la TTX (verde) en el vestíbulo externo, y el de los anestésicos locales (violeta) en el vestíbulo interno del poro. Tomada de Lipkind y Fozzard, 2000 (142)

al filtro de selectividad, se localiza el sitio de unión a la TTX. Inmediatamente después en la región intracelular se encuentra el vestíbulo interno del poro, en el cual se encuentra el sitio receptor de los anestésicos locales, que bloquean intracelularmente la vía de permeabilidad a los iones (142). Respecto a la  $\mu$ -CTX, cabe presentar el modelo propuesto recientemente por Dudley (130), en el que se muestra su interacción con el poro del canal de  $\text{Na}^+$  rSkM1, el cual se muestra en la Fig. 29. Se puede conjeturar que la unión en el poro de una molécula relativamente voluminosa, como lo es la  $\mu$ -CTX, podría distorsionar significativamente la estructura del poro, y de ahí modificar la vía de permeación iónica, sin embargo evidencias experimentales sugieren que en general la unión de la  $\mu$ -CTX al poro del canal, prácticamente no provoca perturbaciones en las propiedades del poro.

En este punto, es de interés mencionar brevemente diferentes estrategias moleculares de toxinas bloqueadoras de los canales iónicos. Recientemente se han identificado los residuos que contribuyen en la superficie de interacción entre la  $\delta$ -dendrotoxina y un canal de  $\text{K}^+$  dependiente de voltaje. Esta toxina parece no ocluir físicamente el poro, sino que ésta se une a la "torreta", la estructura adyacente al vestíbulo externo del poro del canal; y aunque ésta puede inducir un bloqueo parcial, los autores consideran que esto es debido



**Figura 29. Modelo de la  $\mu$ -CTX y su interacción con el poro del CSDV.** La estructura de la toxina (izquierda) resalta la posición de R13. En la de interacción de la toxina con el poro del canal de  $\text{Na}^+$  (derecha) tomado de Dudley 2000 (130).

probablemente a una restricción de la dinámica conformacional del poro, en lugar de una inhibición electrostática de la conducción (155). En contraste, todas las toxinas de alacrán contra canales de  $K^+$  son bloqueadoras del poro y son ejemplificadas por la caribdotoxina, la cual obstruye el poro de los canales de  $K^+$ , con la cadena lateral de la K27, la cual entra a la parte más estrecha del poro (156). Por otro lado, evidencias experimentales sugieren que algunas toxinas peptídicas contra canales de  $Ca^{2+}$  pueden causar también un bloqueo incompleto (157,158). Si esto se confirma con análisis detallados de corrientes unitarias, podría entonces reflejar una característica estructural común del vestibulo de los canales de  $Na^+$  y de  $Ca^{2+}$ .

La estructura tridimensional completa del canal de  $Na^+$  del órgano eléctrico de anguila se ha determinado recientemente, a una resolución de 19 Å por criomicroscopía electrónica y reconstrucción de imágenes (143). Estas últimas, muestran que el CSDV tiene forma de campana, con aproximadamente un 47% de su masa en el lado intracelular y un 24% en el exterior, lo cual concuerda con el modelo bidimensional inicialmente propuesto (3). Sin embargo, el poro central no se conecta directamente con el lado citoplásmico ni al extracelular; en vez de ello, se divide en cuatro ramas. Otra característica inesperada de la estructura es la presencia de cuatro poros transmembranales, localizados periféricamente, uno en cada dominio denominados poros de *gating*. Catterall, considera que dichos poros forman la vía de deslizamiento de los segmentos S4 (21). Sin embargo, esta interpretación del CSDV, no concuerda con lo descrito biofísicamente ni con los modelados estructurales. Este hecho despierta aún más la necesidad de imágenes a mayor resolución, que junto con nuevos estudios de estructura-función que permitan correlacionar la estructura completa del canal con las evidencias experimentales. Tales estudios ayudarán a responder muchas de las preguntas que surgen con respecto a la estructura del CSDV recién resuelta. Por ejemplo, ¿qué interacciones moleculares subyacen al proceso de *gating*? ¿Cómo estarían participando los poros de *gating* observados en el proceso de apertura y cierre del canal? Y en base al conocimiento de la relación de las toxinas bloqueadoras del poro del canal, ¿cómo sería posible la inhibición de la corriente de  $Na^+$  en el poro del canal?

Para el caso de las toxinas bloqueadoras de alacrán descritas en este trabajo de tesis, cómo estarían interactuando en el poro del CSDV, sin que interfieran al menos estéricamente con el mecanismo de *gating*?

De modo independiente a la obtención de la estructura del CSDV, el uso de toxinas que sean bloqueadoras (totales y parciales) han abierto una ventana única en el estudio de las bases estructurales de la conducción iónica.

## CONCLUSIONES.

En el presente trabajo de tesis se reporta por vez primera la secuencia primaria y la función de la nueva toxina de *C. noxius* contra CSDV a la que se le ha llamado Cn11. Se ensayó su efecto sobre canales de Na<sup>+</sup> de neuronas en cultivo del acocil *Procambarus clarkii*, y contrario a lo esperado, Cn11 no resultó ser una toxina modificadora del *gating*, sino que se comportó como una toxina bloqueadora de los canales de Na<sup>+</sup> neuronales. El efecto de bloqueo de Cn11 es concentración dependiente, con una Km de ~320 nM.

Asimismo, durante el desarrollo de este trabajo se implementó en el laboratorio la técnica de expresión heteróloga de canales recombinantes rSkM1 en células de mamífero, y en este sistema se determinó la actividad de la toxina Cn2. En este sistema, contrario a lo descrito Cn2 resultó ser una toxina bloqueadora de los canales de Na<sup>+</sup>. El efecto de bloqueo de Cn2 fue concentración dependiente, con una Kd de ~230 nM. El efecto de Cn2 no es dependiente del voltaje transmembranal, ni es uso-dependiente, lo cual sugiere que Cn2 se une al canal en su estado cerrado.

El efecto bloqueador que ambas toxinas ejercen en los diferentes sistemas de CSDV usados, nos han permitido proponer un 11° grupo en la clasificación de toxinas de alacrán para canales de Na<sup>+</sup>. Pese a que la homología de secuencia primaria entre Cn2 y Cn11 es baja, el efecto bloqueador que ejercen sobre los CSDV es el argumento más importante para clasificarlas en un nuevo grupo.

En base a los resultados obtenidos en esta tesis mostramos también que el nuevo grupo de toxinas de alacrán con actividad bloqueadora, presenta también especificidad de especie, Cn2 hacia mamíferos y Cn11 hacia crustáceos.



## PERSPECTIVAS.

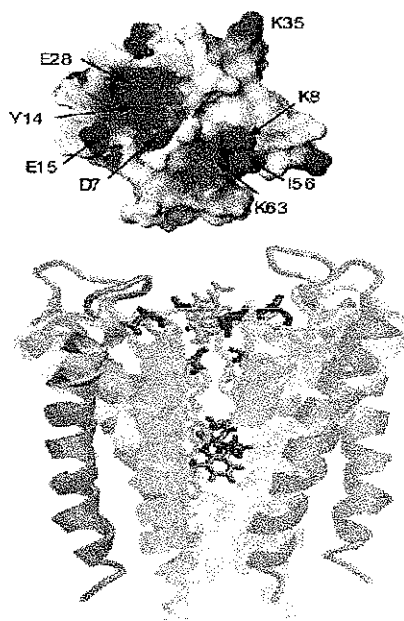
Dadas las diferencias en las dimensiones entre los bloqueadores del canal de Na<sup>+</sup> TTX < STX <<  $\mu$ -CTX <<< [Cn2 ~Cn11]), se puede suponer que cada una de ellas está interactuando a diferentes niveles en el sitio receptor 1 del canal de Na<sup>+</sup>. Las toxinas de alacrán bloqueadoras Cn2 y Cn11, podrían estar teniendo interacción con varios residuos localizados en la región más externa del vestíbulo del poro. De este modo, mediante la realización de estudios con dobles mutantes de los CSDV y de las toxinas de alacrán bloqueadoras se podría deducir la conformación de la estructura del vestíbulo del poro, así como los residuos involucrados en la interacción toxina-canal.

Actualmente se cuenta ya con una gran cantidad de mutantes funcionales sitio específicas de los CSDV, sin embargo para el caso de las toxinas de alacrán que afectan a los canales de Na<sup>+</sup>, la generación de clonas funcionales (silvestres y mutantes) ha sido particularmente difícil. Contrariamente a lo que sucede con las toxinas de cadena corta para canales de K<sup>+</sup> que se pliegan sin ningún problema, para las toxinas de cadena larga para canales de Na<sup>+</sup> este proceso de plegamiento es complejo. Esto ha sido estudiado en detalle y ha permitido el desarrollo de un sistema de plegamiento para toxinas de alacrán de cadena larga, mediante la creación de una columna de proteínas chaperonas las cuales permiten que a medida que la toxina (expresada o sintética) va pasando a través de la columna, ésta va siendo plegada de forma correcta (144). De la misma manera, haciendo uso de variantes naturales de las dos toxinas de alacrán bloqueadoras de canales de Na<sup>+</sup> descritas en este trabajo, y empleando canales de Na<sup>+</sup> con mutaciones específicas en los probables sitios de interacción en la región más externa del vestíbulo del poro, se podría comenzar a realizar estudios más profundos de la relación estructura función de las toxinas bloqueadoras y de los CSDV.

De este modo, tanto Cn2 y Cn11 constituyen pues una herramienta invaluable en la investigación de la forma y estructura del vestíbulo externo del poro de los CSDV, de la misma manera que las otras toxinas bloqueadoras (TTX, STX y  $\mu$ -CTX) revisadas en este trabajo (30, 69, 75, 76, 79, 131). Del mismo modo, éstas constituyen ahora una herramienta importante para continuar analizando el proceso de permeabilidad iónica en los CSDV, en estudios más detallados como el realizado por French y colaboradores (153), en el que describe

los diferentes tipos de interacciones de la  $\mu$ -CTX y varias de sus mutantes, sobre el poro de los canales de  $\text{Na}^+$  rSkM1 que llevan finalmente a la inhibición de la corriente de una forma total o parcial

En la Fig. 30 se presenta el modelo descrito de la toxina Cn2 (93), colocado hipotéticamente sobre el vestibulo externo del poro, en el modelo propuesto de los segmentos S5-S6 del CSDV, acordes con la estructura del canal KcsA mostrado en la Fig 28. Sin embargo, para tener un mejor ajuste de la interacción toxina-canal, es necesario poder diseñar varias estrategias experimentales que nos permitan realizar análisis de las posibles interacciones electrostáticas y/o estéricas que las toxinas de alacrán bloqueadoras ejerzan sobre los CSDV. Una de estas estrategias podría ser el desarrollo de un modelo computacional *ad hoc* que correlacione la estructura tridimensional de la toxina Cn2 con el poro del CSDV. Paralelamente, la realización de estudios electrofisiológicos de la cinética de interacción de las toxinas de alacrán bloqueadoras, que nos permitan conocer más a fondo las condiciones moleculares del mecanismo de bloqueo sobre los CSDV



TESIS COM  
A DE OR

**Figura 30. Superposición hipotética del modelo de la toxina Cn2 al vestibulo externo del poro del CSDV.** Superposición de los modelos tridimensionales, obtenidos por separado de la región del poro del CSDV modelada por Lipkind y Fozzard (142) y de la estructura de la toxina Cn2 descrita por Pintar y colaboradores (93)

## BIBLIOGRAFÍA.

1. Hille , B. (1992). Ionic channels of excitable membranes. Sinauer Associates. Sunderland, MA.
2. Hodgking A.L., Huxley A.F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerves *J. Physiol.* 117: 500-544.
3. Noda M., Shimizu S., Tanabe T., Takai T., Kayano T., Ikeda T., Takahashi H., Nakayma H., Kanaoka Y., Minamino N., Kangawa K., Matsuo H., Raftery M.A., Hirose T., Inayama S., Hayashida H., Miyata T., Numa S (1984). Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channels deduced from cDNA sequence. *Nature.* 320, 188-192.
4. Moore A.C., Levinson S.R., Raftery M.A. (1980). Identification of a large molecular weight peptide associated with tetrodotoxin binding protein from the electroplax of *Electrophorus electricus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92: 869-866.
5. Noda M., Ikeda T., Suzuki H., Takeshima H., Takahashi T., Kuno M., Numa S. (1986) Expression of functional sodium channels from cloned cDNA. *Nature* 322: 826-828.
6. Lombert A., Lazdunski, M. (1984). Characterization, solubilization, affinity labelling and purification of the cardiac Na<sup>+</sup> channel using Tityus toxin gamma. *Eur. J Biochem.* 141: 651-660
7. Isom L.L. (2001). Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist.* (1):42-54. Review.
8. Roberts R.H., Barchi R.L. (1987). The voltage-sensitive sodium channel from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 262: 2298-2303.
9. Satin J., Kyle J.W., Chen M., Bell P., Cribbs L.L., Fozzard H.A., Rogard R.B. (1992) A mutant of TTX-sensitive properties *Science.* 256: 1202-1205.
10. Grant A.O. (1991). The electrophysiology of the cardiac sodium channel. *Trends Cardiovasc. Med.* 1: 321-330
11. Krafte D.S., Davison K., Dugrenier N., Estep K., Josef K., Barchi R.L., Kallen R.G., Silver P.J., Ezrin A.M. (1994). Pharmacological modulation of human cardiac Na channels. *Eur. J Pharmacol.* 266: 245-254
12. Catterall W.A., Seagar M.J., Takahashi M. (1988). Molecular properties of the sodium channel: a receptor for multiple neurotoxins. *J. Biol. Chem.* 263: 3535-3538.
13. Rogart R.B., Cribbs L.L., Muglia L.K., Kephart D.D., Kaiser M.W. (1989). Molecular cloning of a putative tetrodotoxin resistant rat heart Na channel isoform. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 86: 8170-8174
14. Trimmer J.S., Cooperman S.S., Tomiko S.A., Zhou J., Cream S.M., Boyle B.M., Kallen R.G., Sheng Z.H., Barchi R.L., Sigworth F.J., Goodman R.H., Agnew W.S., Mandel G. (1989). Primary structure and functional expression of a mammalian skeletal muscle sodium channel. *Neuron* 3: 33-49.
15. Schaller K.L., Krzemien D.M., Yarowsky P.J., Krueger B.K., Caldwell J.H. (1995). A novel, abundant sodium channel expressed in neurons and glia. *J. Neurosci.* 15: 3231-3242.

16. Akopian A N, Sivilotti L, Wood J.N (1996) A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons *Nature*. 379: 257-262.
17. Toledo Aral J.J., Moss B.L., He Z.J., Koszowski A.G., Whisenand T., Levison S.R., Wolf J.J., Silos Santiago I., Haleboua S., Mandel G. (1997). Identification of PN1, a predominant voltage-dependent sodium channel expressed principally in peripheral neurons.
18. Chen J., Ikeda S.R., Lang W., Isales C.M., Wei X (1997). Molecular cloning of a putative tetrodotoxin-resistant sodium channel from dog nodose ganglion neurons. *Gene*. 202: 7-14.
19. Dib-Hajj S., Tyrrell L., Black J.A., Waxman S.G. (1998) NaN, a novel voltage-gated Na channel, is expressed preferentially in peripheral sensory neurons and down-regulated after axotomy. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8963-8968.
20. Nakayma H., Nakayama K., Nonomura Y., Kobayashi M., Kangawa K., Matsuo H., Kanaoka Y. (1993) A topographical study of the electroplax sodium channel with site-directed antibodies. *Biochim. Biophys. Acta*. 1145: 134-140.
21. Catterall W.A. (2001). A 3D view of sodium channels. *Nature*. 409(6823): 988-991.
22. Isom L.L., De Jongh K.S., Patton D.E., Reber B.F., Offord J., Charbonneau H., Walsh K., Goldin A.L., Catterall W.A. (1992). Primary structure and functional expression of the  $\beta$ 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science* 256: 839-832
23. Makita N., Bennet P.B.J., George A.L. Jr. (1994). Voltage-gated Na channel  $\beta$ 1 subunit mRNA expressed in adult human skeletal muscle, heart and brain is encoded by a single gene. *J. Biol. Chem.* 269: 751-758
24. Catterall W.A. (1995). Structure and function of voltage-gated channels. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 493-531.
25. Messner D.J., Feller D.J., Scheuer T., Catterall W.A. (1986) Functional properties of rat brain channels lacking the  $\beta$ 1 or  $\beta$ 2 subunit. *J. Biol. Chem.* 261:14882-14890.
26. Trimmer J.S., Cooperman S.S., Tomiko S.A., Zhou J., Crean S.M., Boyle M.B., Kallen R.G., Sheng Z.H., Barchi R.L., Sigworth F.J., Goodman R.H., Agnew W.S., Mandel G. (1989). Primary structure and functional expression of a mammalian skeletal muscle sodium channel. *Neuron*. 3: 33-49.
27. Zhou J., Potts J.F., Trimmer J.S., Agnew W.S., Sigworth F.J. (1991) Multiple gating modes and the effect of modulating factors on the  $\beta$ 1 sodium channel. *Neuron* 7: 775-785.
28. Isom L.L., Ragsdale D.S., De Jongh K.S., Westbroek R.E., Reber B.F., Scheuer T., Catterall W.A. (1995). Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell*. 83: 433-442
29. Isom L.L., Catterall W.A. (1996). Na<sup>+</sup> channel subunits and Ig domains. *Nature*. 383: 307-308
30. Lipkind G., Fozzard H. (2000). KcsA crystal structure as framework for a molecular model of the Na(+) channel pore. *Biochemistry* 39(28):8161-70

31. Fozzard H.A. , Lipkind G. (1996). The guanidinium toxin binding site on the sodium channel. *Jpn. Heart J* 37(5): 683-692. Review.
32. Backx P.H., Yue D.T., Lawrence J.H., Marban E., Tomaselli G.F. (1992) Molecular localization of an ion-binding site within the pore of mammalian sodium channels. *Science* 257: 248-251
33. Chen L.Q., Chahine M., Kallen R.G., Barchi R.L., Horn R. (1992) Chimeric study of sodium channels from rat skeletal muscle. *FEBS Lett.* 309: 253-257.
34. Heinemann S.H., Terlau H., Imoto K (1992). Molecular basis for pharmacological differences between brain and cardiac sodium channels. *Plügers Arch* 442: 90-92.
35. Heinemann S.H., Terlau H., Imoto K (1992b). Molecular basis for pharmacological differences between brain and cardiac sodium channels. *Plügers Arch* 442: 90-92
36. Noda M., Suzuki H., Numa S., Sthümer W. A. (1989). Single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity of the sodium channel II. *FEBS Lett.* 259: 213-216.
37. Terlau H., Heinemann S.H., Sthümer W., Pusch M., Conti F., Imoto K, Numa S (1991). Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Lett* 293: 93-96
38. Lipkind G.M., Fozzard H.A. (1994). A structural model of the tetrodotoxin and saxitoxin binding site of the sodium channel. *Biophys. J.* 66: 1-13
39. Favre I., Moczydlowski E., Schild L (1996). On the structural basis for ionic selectivity among Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> in the voltage gated sodium channel. *Biophys. J.* 71: 3110-3125.
40. Guy H.R., Conti F. (1990). Pursuing the structure and function of voltage-gated channels. *Trends. Neurosci* 13: 201-206.
41. Penzotti J.L., Fozzard H.A., Lipkind G.M., Dudley S.C. Jr. (1998) Differences in saxitoxin and tetrodotoxin binding revealed by mutagenesis of the Na<sup>+</sup> channel outer vestibule. *Biophys. J.* 75: 2647-2657.
42. Stühmer W., Conti F., Suzuki H., Wang X., Noda M., Yahagi N., Kubo H., Numa S. (1989) *Nature* 339 : 597-603.
43. Papazian D.M., Timpe L.C., Jan Y.N., Jan L.Y. (1991). Alteration of voltage-dependence of *Shaker* potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature.* 349: 305-310
44. Terlau H., Heinemann S.H., Stühmer W., Pusch M., Conti F., Imoto K, Numa S. (1991) Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Lett.* 293: 93-96
45. Chen T.Y., Miller, C (1996) Non equilibrium gating and voltage dependence of the Na<sup>+</sup> channel. *J. Gen. Physiol.* 108: 237-250
46. Kühn F.J., Greeff N.G. (1999) Movement of voltage sensor S4 in domain 4 is tightly coupled to sodium channel fast inactivation and gating charge immobilization. *J. Gen. Physiol.* 114: 167-183.

47. Bezanilla F (2000). The voltage sensor in voltage-dependent ion channels *Physiol. Rev.* 80(2):555-592. Review.
48. Armstrong C., Bezanilla F. (1977). Inactivation of the Na channel II. Gating currents experiments *J. Gen. Physiol.* 70: 567-590.
49. Vassilev P., Scheuer T., Catterall W.A. (1989). Inhibition of activation of single sodium channels by site-directed antibody *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 8147-8151
50. West J.W., Patton D.E., Scheuer T., Wang Y., Goldin A.L., Catterall W.A. (1992). A cluster of hydrophobic aminoacid residues required for fast Na<sup>+</sup> channel inactivation *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 10910-10914
51. Rohl C.A., Boeckman F.A., Baker C., Scheuer T., Catterall W.A., Klevit R.E. (1999). Solution structure of the sodium channel inactivation gate *Biochemistry.* 38: 855-861
52. Smith M.R., Goldin A.L. (1997) Interaction between the sodium channel inactivation linker and domain III S4-S5 *Biophys. J.* 73: 1885-1895.
53. McPhee J.C., Ragsdale D.S., Scheuer T., Catterall W.A. (1998) A critical role for the S4-S5 intracellular loop in domain IV of the sodium channel alpha-subunit in fast inactivation. *J. Biol. Chem.* 273: 1121-1129.
54. Tang L., Kallen R.G., Horn R. (1996) Role of an S4-S5 linker in sodium channel inactivation probed by mutagenesis and a peptide blocker *J. Gen. Physiol.* 108: 89-104.
55. McPhee J.C., Ragsdale D.S., Scheuer T., Catterall W.A. (1994). A mutation in segment IVS6 disrupts fast inactivation of sodium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 12346-12350.
56. McPhee J.C., Ragsdale D.S., Scheuer T., Catterall W.A. (1995). A critical role for transmembrane segment IVS6 of the sodium channel alpha subunit in fast inactivation *J. Biol. Chem.* 270: 12025-12034.
57. Rohl C.A., Boeckman F.A., Baker C., Scheuer T., Catterall W.A., Klevit R.E. (1999). Solution structure of the sodium channel inactivation gate *Biochemistry.* 38: 855-861
58. Sawczuk A., Powers R.K., Binder M.D. (1995). Intrinsic properties of motoneurons. Implications for muscle fatigue. *Adv. Exp. Med. Biol.* 384: 123-134.
59. Cummins T.R., Sigworth F.J. (1996). Impaired slow inactivation in mutant sodium channel (comments) *Biophys. J.* 71: 227-236.
60. Ruff R.I. (1994). Slow Na<sup>+</sup> channel inactivation must be disrupted to evoke prolonged depolarization-induced paralysis (letter, comment) *Biophys. J.* 66: 542-545.
61. Scholtysik G., Salzmann R., Berthold R., Herzig J.W., Quast U., Markstein R. (1985). DPI 201-106, a novel cardioactive agent. Combination of independent positive inotropic, negative chronotropic, action potential prolonging and coronary dilatory properties. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 329: 316-325.
62. Catterall W.A. (1980). Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20: 15-42

63. Lipkind G.M., Fozzard H.A. (1994). A structural model of the tetrodotoxin and saxitoxin binding site of the sodium channel. *Biophys. J* 66: 1-13
64. Kirsch G.A., Alam M., Hartmann H.A. (1994). Differential effects of sulphhydryl reagents on saxitoxin and tetrodotoxin block of voltage-dependent Na channels. *Biophys. J* 67: 2305-2315
65. Chang N.S., French R.J., Lipkind G.M., Fozzard H.A., Dudley S. Jr. (1998). Predominant interactions between mu-conotoxin Arg-13 and the skeletal muscle Na<sup>+</sup> channel localized by mutant cycle analysis. *Biochemistry*. 37(13):4407-19.
66. Frelin C., Cognard C., Vigne P., Lazdunski M. (1986). Tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> channels differ in their sensitivity to Cd<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>. *Eur. J. Pharmacol.* 122: 245-250
67. Olivera B.M., Rivier J., Scott J.K., Hillyard D.R., Cruz L.J. (1991). Conotoxins. *J. Biol. Chem* 266: 22067-22070.
68. McIntosh J.M., Olivera B.M., Cruz L.J. (1999) Conus peptides as probes for ion channels. *Methods Enzymol* 294: 605-624.
69. Dudley S.C.Jr., Todt H. Jr., Lipkind G.M., Fozzard H.A. (1995). A mu-conotoxin-insensitive Na channel mutant: possible localization of a binding site at the outer vestibule. *Biophys. J* 69: 1657-1665
70. Li R.A., Tsushima R.G., Kallen R.G., Backx P.H. (1997) Pore residues critical for mu-CTX binding to rat skeletal muscle Na channels revealed by cysteine mutagenesis. *Biophys. J.* 73: 1874-1884.
71. Moczydlowski E., Olivera B.M., Gray W.R., Strichartz G.R. (1986). Discrimination of muscle and neuronal sodium channel subtypes by binding competition between [<sup>3</sup>H]Saxitoxin and  $\mu$ -conotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5321-5325.
72. Ohizumi Y., Nakamura H., Kobayashi J. and Catterall W.A. (1986). Geographutoxin II, a peptide sodium channel blocker that selectively inhibits [<sup>3</sup>H] saxitoxin binding to muscle and nerve sodium channels. *J. Biol. Chem.* 261: 6149-6152.
73. Yanagawa Y., Abe T., Satake M. (1986) Blockade of [<sup>3</sup>H] lysine-tetrodotoxin binding to sodium channel proteins by conotoxin GIII. *Neurosci. Lett* 64: 7-12.
74. Stephan M.M., Potts J.F., Agnew W.S. (1994). The micro1 skeletal muscle sodium channel: mutation E403Q eliminates sensitivity to tetrodotoxin but not to mu-conotoxins GIIIA and GIIIB. *J. Membr. Biol.* 137: 1-8.
75. French R.J., Dudley S.C.Jr. (1999) Pore-blocking toxins as probes of voltage-dependent channels. *Methods Enzymol.* 294: 575-605.
76. Chahine M., Sirois J., Marcotte P., Chen L.Q., Kallen R.G. (1998) Extrapore residues of the S5-S6 loop of domain 2 of the voltage-gated skeletal muscle sodium channel (rSkM1) contribute to the  $\mu$ -conotoxin GIIIA binding site. *Biophys. J.* 75: 236-246.
77. Shon K.J., Olivera B.M., Watkins M., Jacobsen R.B., Gray W.R., Florezca C.Z., Cruz L.J., Hillyard D.R., Brink A., Terlau H., Yoshikami D. (1998). Mu-conotoxin PIIIA, a new peptide for discriminating among tetrodotoxin-sensitive Na channel subtypes. *J. Neurosci* 18: 4473-4481

78. Morton R.S. (1991). Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with the sodium channel. *Toxicon*. 29: 1051-1084.
79. Rogers J., Qu Y., Tanada T., Scheuer T., Catterall W.A. (1996). Molecular determinants of high affinity binding of alpha-scorpion toxin and sea anemone toxin in the S3-S4 extracellular loop in domain IV of the Na<sup>+</sup> channel alpha subunit. *J. Biol. Chem.* 271: 15950-15962.
80. Benzinger G.R., Kyle J.W., Blumenthal K.M., Hanck D.A. (1998). A specific interaction between the cardiac sodium channel and site -3 toxin anthopleurin B. *J. Biol. Chem.* 273: 80-84.
81. Meves H., Simard J.M., Watt D.D. (1986). Interactions of scorpion toxins with the sodium channel. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 479: 113-132.
82. Buisine E., Wieruszeski J.M., Lippens G., Wouters D., Tartar A., Sautiere P. (1997) Characterization of a new family of toxin-like peptides from the venom of the scorpion *Leiurus quinquestriatus habraeus*. 1H-NMR structure of leuropeptide II. *J. Pept. Res.* 49: 545-555.
83. Tejedor F.J., Catterall W.A. (1988). A site of covalent attachment of alpha-scorpion toxin derivatives in domain I of the sodium channel alpha subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8742-8746.
84. Thomsen W.J., Catterall W.A. (1989). Localization of the receptor site for alpha-scorpion toxins by antibody mapping: implications for sodium channel topology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 10161-10165.
85. Benzinger G.R., Drum C.L., Chen L.Q., Kallen R.G., Hanck D.A. (1997) Differences in the binding sites of two site-3 sodium channel toxins. *Pflügers Arch.* 434: 742-749.
86. Little M.J., Wilson H., Zappia C., Cestele S., Tyler M.I., Martin-Eauclaire M.F., Gordon D., Nicholson G.M. (1998). Delta-atracotoxins from Australian funnel-web spiders compete with scorpion alpha-toxins binding on both rat brain and insect sodium channels. *FEBS Lett.* 439: 246-252.
87. Fletcher J.I., Chapman B.E., Mackay J.P., Howden M.E.H., King G.F. (1997) The structure of versutoxin (delta-atracotoxin -Hv1). Provides insights into the binding of site 3 neurotoxins to the voltage-gated sodium channel. *Structure* 5: 1525-1535.
88. Pellaghy P.K., Neilsen K.J., Craik D.J., Noron R.S. (1997). Solution structure of robustoxin, the lethal neurotoxin from the funnel-web spider *Atrax robustus*. *Protein Sci.* 3, 1833-1839.
89. Sharkey R.G., Jover E., Couraud F., Baden D.G., Catterall W.A. (1987) Allosteric modulation of neurotoxin binding to voltage-sensitive sodium channels by *Ptychodiscus brevis* toxin 2. *Mol. Pharmacol.* 31: 273-278.
90. Wheeler K.P., Watt D.D., Lazdunski M. (1983) Classification of Na channel receptors specific for various scorpion toxins. *Pflügers Archiv. (Eur. J. Physiol.)* 397: 164-165.
91. Lazdunski M., Frelin C., Barhaim J., Lombet A., Meiri H., Pauron D., Romey G., Schmidt A., Schweitz H., Vigne P., Vijverberg H.P.M. al., (1986) Polypeptides toxins as tools to study voltage-sensitive Na<sup>+</sup> channels. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 479: 204-219.
92. Jablonsky M.J., Jackson P.L., Trent J.O., Watt D.D., Krishna N.R. (1999) Solution structure of a beta-neurotoxin from the New World scorpion *Centruroides sculpturatus* Ewing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254, 406-412.



93. Pintar A., Possani L.D., Delepierre M. (1999) Solution structure of toxin 2 from *Centruroides noxius* Hoffmann, a beta scorpion neurotoxin acting on sodium channels *J. Mol. Biol.* 287: 359-367.
94. Cahalan M.D. (1975). Modification of sodium channel gating in frog myelinated nerve fibres by *Centruroides sculpturatus* scorpion venom *J. Physiol.* 244: 511-534
95. Couraud F., Jover E., Dubois J.M., Rochat H. (1982). Two types of scorpion receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel. *Toxicon.* 20: 9-16
96. Meves H., Rubly N., Watt D.D. (1982) Effect of toxins isolated from the venom of the scorpion *Centruroides sculpturatus* on the Na currents of the node of Ranvier *Plügers Arch.* 393: 56-62
97. Yatani A., Kirsch G.E., Possani L.D., Brown A.M. (1988) Effects of New World scorpion toxins on single-channel and whole cell cardiac sodium currents *Amer. J. Physiol.* 254 (Hearst Circ. Physiol.) 23: H443-H451
98. Cestele S., Qu Y., Rogers J., Rochat H., Scheuer T., Catterall W.A. (1998) Voltage sensor-trapping: enhanced activation of sodium channels by beta-scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II *Neuron.* 21: 919-931
99. Dufton M.J., Rochat H. (1984). Classification of scorpion toxins according to amino acid composition and sequence. *J. Mol. Evol.* 20(2): 120-127.
100. Catterall W.A. (1986). Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 953-985.
101. Garcia M.L., Hanner M., Knaus H.G., Koch R., Schmalhofer W., Slaughter R.S., Kaczorowski G.J. (1997) Pharmacology of potassium channels. *Adv. Pharmacol.* 39: 425-471.
102. Debin J.A., Maggio J.E., Strichartz G.R. (1993). Purification, characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *Am. J. Physiol.* 264 (Cell Physiol) 33: C361-C369.
103. Valdivia H., Possani L.D. (1998) Peptide toxins as probes of Ryanodine receptor. *Trends Cardiovascular Med.* 8: 111-118.
104. Possani L.D., Becerril B., Delepierre M., Tytgat J. (1999a). Scorpion toxins specific for Na-channels. *Eur. J. Biochem.* 264: 287-300
105. Batista C.V.F., Gomez-Lagunas F., Lucas S., Possani L.D. (2000) Tc1, from *Tityus cambridgei*, is the first member of a new subfamily of scorpion toxin that blocks K<sup>+</sup>-channels. *FEBS Lett* 486: 117-120
106. Tytgat J., Chy K.G., Garcia M.L., Gutman G.A., Martin-Eauclaire M.F., Van del Walt J.J., Possani L.D. (1999). A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. *Trends in Pharmacol. Sciences.* 20: 444-447.
107. Possani L.D., Selisko B., Gurrola G.B. (1999b) Structure and function of scorpion toxins affecting K<sup>+</sup>-channels *Perspectives in Drug Discovery Design.* 1516: 15-40
108. Jover E., Couraud F., Rochat H. (1980) Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 95: 607-614.

109. Wheeler K.P., Watt D.D., Lazdunski M. (1983) Classification of Na channel receptors specific for various scorpion toxins. *Pflüegers Archiv.(Eur. J. Physiol)* 397: 164-165
110. Zlotkin E. (1987) Pharmacology of survival: insect selective neurotoxins derived from scorpion venom *Endeavour*.11(4): 168-174.
111. Gordon D, Martin-Eauclaire M F, Cestele S., Kopeyan C., Carrier E, Khalifa R B., Pelhate M, Rochat H. (1996) Scorpion toxins affecting sodium current inactivation bind to distinct homologous receptor sites on rat brain insect sodium channels. *J Biol Chem* 271(14): 8034-8045.
112. Martin-Euclaire M F, Couraud F (1995) Scorpion neurotoxins: Effects and mechanisms In *Book Neurotoxicology*, edited by L.W. Chang and R S Dier, p 683 Marcel Dekker. New York, N.Y.
113. Selisko B, García C, Becerril B, Delepierre M, Possani L.D. (1996). An insect-specific toxin from *Centruroides noxius* Hoffmann cDNA, primary structure, three-dimensional model and electrostatic surface potentials in comparison with other toxin variants. *Eur. J. Biochem.* 242 (2): 235-242.
114. Gurevitz M., Froy O., Zilberberg N., Turkov V, Anglister J, Shaanan B., Loret E., Stankiewicz M., Pelhate M., Gordon D., Chejanovsky N (1998). Sodium channel modifiers from scorpion venom: structure–activity relationship, mode of action and application. *Toxicon*. 36: 1671-1682.
115. Zamudio F, Saavedra R, Martin B M, Gurrola-Briones G, Herion P, Possani L.D. (1992) Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann *Eur J Biochem*. 204(1):281-92.
116. Valdivia H H., Martin B.M., Ramirez A.N., Fletcher P.L., Possani L.D (1994) Isolation and pharmacological characterization of four novel Na<sup>+</sup> channel-blocking toxins from the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *J Biochem (Tokyo)* 16(6):1383-91
117. Dehesa-Davila M, Ramirez A.N., Zamudio F.Z, Gurrola-Briones G, Lievano A, Darszon A., Possani L.D. (1996). Structural and functional comparison of toxins from the venom of the scorpions *Centruroides infamatus infamatus*, *Centruroides limpidus limpidus* and *Centruroides noxius*. *Comp Biochem. Physiol. Biochem Mol. Biol.* 113 (2):331-9
118. Possani L.D., Dent, M.A R., Martin, B.M., Maelicke, A. and Svendsen, I. (1981) The amino terminal sequence of several toxins from the venom of the Mexican Scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann, *Carlsberg Res Commun.* 46, 207-214
119. García C, Becerril B, Selisko B, Delepierre M, Possani L.D (1977). Isolation, characterization and comparison of a novel crustacean toxin with a mammalian toxin from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Comp Biochem. Physiol Biochem Mol. Biol* 116(3): 315-22.
120. Ramírez-Domínguez M.E., Olamendi-Portugal T., García U., García U., Aréchiga H., Possani L.D (2001) Cn11, first example of scorpion toxin that is a true channel blocker of Na<sup>+</sup> currents on crayfish neurons. *J. Exp Biol*. En prensa
121. Ausubel F.M, Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Truhk K. In *Current Protocols in Molecular Biology* Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, Inc. NY Vol 1, Ch 9.

122. Cestele S., Catterall W.A. (2000). Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* 82: 883-892.
123. Valdivia H.H., Martín B.M., Ramírez A.N., Fletcher P.L. Jr., Possani L.D. (1994). Isolation and pharmacological characterization of four novel Na<sup>+</sup> channel-blocking toxins from the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Biochem J. (Japan)* 116: 1383-1391
124. Baer M., Best P.M., Reuter (1976). Voltage-dependent action of tetrodotoxin in mammalian cardiac cells *Nature* 263:344-345
125. Salgado V.L., Yech J., Narahashi T. (1986). Use- and voltage dependent block of the sodium channel by saxitoxin. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 479: 84-95
126. Lönnendonker U., (1991) Use-dependent block with tetrodotoxin and saxitoxin at frog Ranvier nodes I Intrinsic channel and toxin parameters *Eur. Biophys.J.* 20:135-141.
127. Conti F., Gheri A., Push M., Moran O. (1996). Use dependence of tetrodotoxin block of sodium channels: a revival of the trapped-ion mechanism. *Biophys J.* 71: 1295-1312
128. Doyle D.D., Guo S.L., Lusting J., Satin R.B., Rogart B., Fozzard H.A. (1993). Divalent cation competition with [<sup>3</sup>H] saxitoxin binding to tetrodotoxin-resistant and -sensitive sodium channels: a two-site structural model of ion/toxin interaction. *J. Gen. Physiol* 101: 153-182.
129. Gordon D., Savarin P., Gurevitz M., Zinn-Justin S. (1998) Functional anatomy of scorpion toxins affecting sodium channels. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 17: 131-159.
130. Dudley S.C. Jr., Chang N., Hall J., Lipkind G., Fozzard H.A., French R.J. (2000)  $\mu$ -conotoxin GIIIA interactions with the voltage-gated Na(+) channel predict a clockwise arrangement of the domains. *J Gen Physiol* 116(5):679-90
131. Marban E., Yamagishi T., Tomasselli G.F. (1998) Structure and function of voltage-gated sodium channels. *J Physiol. (Lond)* 508, 647-657.
132. Pelhate M., Sattelle D.B. (1982) Pharmacological properties of insect axons: a review. *J. Insect Physiol.* 28, 889-903.
133. Bloomquist J.R., (1996) Ion channels as targets for insecticides. *Annu Rev. Entomol.* 41: 163-190.
134. Gordon D. (1997) A new approach to insect-pest control-combination of neurotoxins interacting with voltage sensitive sodium channels to increase selectivity and specificity *Invert. Neurosci* 3: 103-116.
135. Narahashi T., Ginsburg K.S., Nagata K., Song J.H., Tatebayashi H. (1998) Ion channels as targets for insecticides. *Neurotoxicology* 19, 581-590.
136. Zlotkin E. (1999) The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides *Annu. Rev. Entomol.* 44: 429-455.
137. Strong M., Gutman G.A. (1993). Missing link in ion channels. *Nature* 362(6415): 26.

133. Warmke J.W., Reenan R.A., Wang P., Qian S., Arena J.P., Wang J., Wunderler D., Liu K., Kaczorowski G.J., Van der Ploeg L.H., Ganetzky B., Cohen C.J. (1997) Functional expression of *Drosophila* para sodium channels. Modulation by the membrane protein TipE and toxin pharmacology. *J. Gen. Physiol.* 110(2): 119-33
139. Sattelle, D.B., Pelhate, M., Hue, B. (1979). Pharmacological properties of axonal sodium channels in the cockroach *Periplaneta Americana* L.I. Selective block by synthetic saxitoxin. *J. Exp. Biol.* 83, 41-48.
140. Wicher D, Penzlin H (1998).omega-Toxins affect Na<sup>+</sup> currents in neurosecretory insect neurons. *Receptors Channels.* 5(6):355-66.
141. Sheets M.F., Hanck D.A. (1999). Gating of skeletal and cardiac muscle sodium channels in mammalian cells. *J Physiol.* 514 ( Pt 2):425-36
142. Lipkind G. M., Fozzard H. A. (2000). KcsA Crystal structure as framework for a molecular model of the Na<sup>+</sup> channel pore. *Biochemistry.* 39 (28), 8161 -8170.
143. Sato Ch., Ueno Y., Asai K., Takahashi K., Sato M., Engel Ay Fujiyoshi Y. (2001). The voltage-sensitive sodium channel is a bell-shaped molecule with several cavities. *Nature.* 409(6823): 983-987
144. Altamirano M.M., Garcia C., Possani L.D., Fersht A.R. (1999) Oxidative refolding chromatography: folding of the scorpion toxin Cn5. *Nat. Biotechnol.* 17(2): 187-91.
145. Onetti C., Garcia U., Valdiosera R , Aréchiga H. (1990). Ionic currents in crustacean neurosecretory cells. *J. Neurophysiol.* 64 : 1514-1526.
147. Miller C (1995). The charibdotxin family of K<sup>+</sup>channel-blocking peptides. *Neuron.* 15: 5-10
148. MacKinnon R, Cohen S.L., Kuo A., Lee A., Chait B.T. (1998). Structural conservation in prokariotic and eukariotic potassium channels. *Science* 280: 106-109.
149. Cruz L.J., Gray W.R., Olivera B.M., Zeikus R.D., Kerr L., Yoshikami D., Moczydlowski E. (1985). *Conus geographus* toxin that discriminate between neuronal and muscle sodium channels. *J. Biol. Chem* 260: 9280-9288
150. Moczydlowski E., Olivera B.M., Gray W.R , Strichartz G.R. (1986) Discrimination of muscle and neuronal Na-channel subtypes by binding competition between [<sup>3</sup>H]saxitoxin and <sup>11</sup>C-conotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 5321-5325.
151. French R.J., Prusak-Sochaczewski E., Zamponi G.W., Becker S., Kularatna A.S., Horn R. (1996) Interactions between a pore-blocking peptide and the voltage sensor of the sodium channel: an electrostatic approach to channel geometry. *Neuron.* 16: 407-413.
152. French R.J., Horn R. (1997) Shifts of macroscopic current inactivation in partially blocked sodium channels. Interaction between the voltage sensor and m-conotoxin. In *From Ion Channels to Cell-to-Cell Conversations.* R. Latorre and Sáez J.C editors. Plenum Press, New York. 67-89.
153. Hui K., Lipkind G., Fozzard H.A., French R.J. (2002) Electrostatic and steric contributions to block of the skeletal muscle sodium channel by m-conotoxin. *J. Gen. Physiol.* 119: 45-54

**ANEXO .**

Note: Dear Editor/Printer!  
My corrections are done with pencil  
when your corrections are fine, I wrote OK

3741

Start/end page:	Page nos:	Landscape page:	MS order:	Page total:	Reprints:
-----------------	-----------	-----------------	-----------	-------------	-----------

The Journal of Experimental Biology 205, 000-000 (2002)  
Printed in Great Britain © The Company of Biologists Limited 2002  
JEB3741

Please return this Proof and your Manuscript.  
(Keep a photocopy of your proof for reference)

1

## Cn11, the first example of a scorpion toxin that is a true blocker of Na<sup>+</sup> currents in crayfish neurons

Martha E. Ramirez-Dominguez<sup>1</sup>, Timoteo Olamendi-Portugal<sup>1</sup>, Ubaldo Garcia<sup>2</sup>, Consuelo Garcia<sup>1</sup>, Hugo Arechiga<sup>3</sup> and Lourival D. Possani<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Recognition and Structural Biology, Biotechnology Institute, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Cuernavaca 62210, México, <sup>2</sup>Department of Physiology, Biophysics and Neurosciences, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. México DF 07000 and <sup>3</sup>Division of Graduate Studies and Research, Medical School, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México DF 04510

\*Author for correspondence (e-mail: possani@ibt.unam.mx)

Accepted 4 January 2002



### Summary

A novel crustacean toxin (Cn11) was isolated and characterized from the venom of the Mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. It contains 63 amino acid residues and is stabilized by four disulphide bridges. It is lethal to crustaceans (*Cambarellus montezumae*), less toxic to insects (crickets) and non-toxic to mammals (mice) at the doses assayed. In neurons isolated from the X organ-sinus gland system of the crayfish *Procambarus clarkii*, it blocks the Na<sup>+</sup> currents with an estimated K<sub>m</sub> of 320 nmol l<sup>-1</sup>, without affecting the Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> currents. The voltage-gated tetrodotoxin-sensitive Na<sup>+</sup> current was recorded from X organ neurons in culture 24 h after plating using the whole-cell clamp configuration. The Na<sup>+</sup>

current was isolated by blocking Ca<sup>2+</sup> currents with Cd<sup>2+</sup> and Cs<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> currents with tetraethylammonium and 4-aminopyridine. Under control conditions, the Na<sup>+</sup> currents were activated at -40 mV with a maximum amplitude at 0 mV. In the presence of 1 μmol l<sup>-1</sup> Cn11, the Na<sup>+</sup> current amplitude was reduced by 75% without apparent modifications to the gating mechanism. These findings suggest that Cn11 selectively blocks a Na<sup>+</sup> channel. It is the first representative of a new group of scorpion toxins specific for this molecular target.

Key words: amino acid sequence, *Centruroides noxius*, crayfish, neuron, Na<sup>+</sup> channel, *Procambarus clarkii*, scorpion/toxin.

### Introduction

The best-studied components of scorpion venom are the polypeptides that recognise ion channels and receptors in excitable membranes. They are harmful to a variety of organisms including man (for reviews, see Possani et al., 1999a, 2000). The molecules responsible for the toxicity of the scorpion venom are polypeptides of 4–8 kDa that have been classified according to their receptor targets. Four different families of toxin have been found to interact specifically with ion channels: Na<sup>+</sup> channels (for a review, see Catterall, 1996), K<sup>+</sup> channels (for a review, see Garcia et al., 1997), Cl<sup>-</sup> channels (Debin et al., 1993) and Ca<sup>2+</sup> channels (for a review, see Valdivia and Possani, 1998). Scorpion toxins that affect Na<sup>+</sup> channels are basic proteins with 60–76 amino acid residues, are stabilized by four disulphide bridges and are capable of specifically recognizing the Na<sup>+</sup> channels of mammals, insects and crustaceans (Possani et al., 1999a). Their molecular mechanism of action has been described as being one in which the gating function of the channel (opening and closing kinetics) is modified. In contrast to these long-chain peptides, the short-chain peptides (23–41 amino acid residues)

are specific blockers of K<sup>+</sup> channels (Batista et al., 2000) (for reviews, see Tytgat et al., 1999; Possani et al., 1999b).

Tetrodotoxin (TTX) and saxitoxin (STX) are small molecules with one and two guanidinium groups, respectively, and are known to block Na<sup>+</sup> currents by interacting with the outer entrance of the ion channel pathway. Since TTX and STX are small molecules, it is conceivable that their binding site within the channel protein is very close to the narrowest part of the pore, which is believed to be the selectivity filter (Terlau and Stühmer, 1998). These neurotoxins bind to receptor site 1 of the Na<sup>+</sup> channel, where the blocker toxins interact (Catterall, 1996). To date, the only peptide described as a blocker of Na<sup>+</sup> channels is μ-conotoxin GIII, a 22-amino-acid peptide isolated from the venom of the snail *Conus geographus*. This toxin acts in a similar manner to TTX and STX (McIntosh et al., 1999; Dudley et al., 1995).

Apart from the functional classification, there is also specificity in the toxins affecting Na<sup>+</sup> channels, in either mammals or arthropods (mostly insects and/or crustaceans). However, binding studies, correlated with toxicity towards

OK  
E/

OK

See ms.

delete comma

OK  
See ms.

OK

OK  
See ms.  
74

reactivity

mammals and insects, have revealed that even toxins known as mammal-specific can be toxic to insects and vice versa (Gordon et al., 1996). Therefore, the animal group specificity is only relative, and definite cross-reactivity exists (Selisko et al., 1996).

Scorpion toxins are classified according to their structure, mode of action and binding site on different channels or channel subtypes (Martin-Eauclaire and Couraud, 1995; Gordon et al., 1996). Each class consists of several peptides isolated from the venom of different species of scorpion. The long-chain toxins affecting  $\text{Na}^+$  channels have been subdivided primarily into two major sub-types,  $\alpha$ - and  $\beta$ -toxins (Jover et al., 1980; Wheeler et al., 1983). The  $\alpha$ -toxins bind to receptor site 3 of the voltage-gated  $\text{Na}^+$  channels of vertebrates in a membrane-dependent manner (Catterall, 1986). For these toxins, Tugarinov et al. (1997) and Zilberberg et al. (1997) have described the area of the surface (active site) of the toxin that is capable of interacting directly with the receptor. The  $\beta$ -toxins, initially isolated from American scorpions, bind to receptor site 4 on vertebrate  $\text{Na}^+$  channels, producing a shift to a more negative potential. Binding is independent of the membrane potential (Catterall, 1986; Couraud and Jover, 1984).

Two other distinct classes of toxin showing specificity for arthropods, termed depressant and excitatory, have been described (Zlotkin, 1987). These four classes of long-chain toxin share only 20–40% similarity of amino acid sequences (Dufton and Rochat, 1984; Martin-Eauclaire and Couraud, 1995).

Recently, Possani et al. (1999a) proposed a new classification, comprising 10 different groups, on the basis of structural and physiological effects and species-specificity. Toxins specific for mammals, insects and crustaceans and toxins with more than one specificity were placed in distinct groups. Below, we show that the toxin described here does not fit into any of the previously described groups.

The molecular basis of toxin specificity has been widely studied for various reasons: (i) to understand the toxic effects of scorpion venom as a pre-requisite for the development of more effective and safer antidotes or vaccines; (ii) to study ion channels, the target molecules of scorpion toxins, in order to understand their molecular structure and function; and (iii) to develop insect-specific toxins that can be used as insecticides. However, the existing information is still limited. Thus far, small differences, i.e. single amino acid modifications within or near the critical binding region between the toxin and its receptor, have been considered. Also, a significant number of natural ligands that recognize these receptor molecules are still to be identified and studied from the venom of scorpions, among other organisms (Possani et al., 1999a).

This paper describes the mechanism of action of a new  $\text{Na}^+$  channel toxin, relatively specific for crustaceans. Cn11 blocks the  $\text{Na}^+$  current in cultured neurons from the X organ-sinus gland of crayfish without modifying the gating mechanism, and it is the first example of a new group (the eleventh) of scorpion toxins with such a molecular effect.

## Materials and methods

### Scorpions and venom

Scorpions, *Centruroides noxius* Hoffmann, were collected in the State of Nayarit (México). The venom was recovered by electrical stimulation, as described previously (Possani et al., 1981). The crude venom was dissolved in double-distilled water and centrifuged at 15000g for 15 min. The soluble venom (supernatant) was freeze-dried and kept at  $-20^\circ\text{C}$  until use. Approximately 20 000 scorpions were needed to obtain 1 g of soluble venom.

### Purification procedures and lethality tests

Gel-filtration chromatography on Sephadex G-50 columns was used as a first step to separate the components, followed by ion-exchange chromatography (Possani et al., 1981). Further purification of subfractions by high-performance liquid chromatography (HPLC) was conducted as described previously (Selisko et al., 1996; García et al., 1997; Possani et al., 1999a). Briefly, 100 mg of soluble venom was applied to a Sephadex G-50 column (0.9 cm $\times$ 200 cm) in the presence of 20 mmol l<sup>-1</sup> ammonium acetate, pH 4.7, at a flow rate of 20 ml h<sup>-1</sup>. Toxic fractions were tested in animal models (mice, crickets and crayfish) and further separated on a carboxymethyl cellulose column (CM-Cellulose; 0.9 cm $\times$ 30 cm) equilibrated and developed in the presence of 20 mmol l<sup>-1</sup> ammonium acetate buffer, pH 4.7, with a continuous salt gradient from 0 mol l<sup>-1</sup> to 0.5 mol l<sup>-1</sup> NaCl. The third purification step was conducted by HPLC, with a Waters (Millipore Co., Milford, MA, USA) system, using a C4 or a C18 reverse-phase column (Vydac, Hesperia, CA, USA).

For lethality tests, three designations were used: non-toxic means that the animals showed no symptoms of intoxication within 24 h after injection, and the effect was similar to that of injecting phosphate-buffered saline or water alone. The toxic effect consisted of a host of symptoms such as salivation, lacrimation, dyspnoea, temporary paralysis of the limbs (mice) or paralysis (crickets and crayfishes). The toxic effect was termed lethal if at least one of the test animals died after injection.

### Determination of the primary structure of Cn11

The amino acid sequence of the toxin (SWISS-PROT accession no. P58296) was obtained (i) by direct sequencing of the native toxin, (ii) by sequencing the reduced and carboxymethylated toxin (RC-toxin) and (iii) by sequencing fragments generated by enzymatic cleavage of RC-toxin. Reduction of the toxin with dithiothreitol, alkylation with iodoacetic acid, enzymatic cleavage with trypsin, chymotrypsin and endoproteinase V8 and separation by HPLC of the sub-peptides were performed as described previously (Possani et al., 1999a). Microsequence determination was carried out by automatic Edman degradation using either a Millipore apparatus (ProSequencer model 6600) or a Beckman (LF 3000 Protein Sequencer) machine, as described previously (García et al., 1997). For the most C-terminal

OK

amino acid residues, mass spectrometry analysis (Scaloni et al., 2000) or a new strategy developed in our laboratory (Gurrola, ~~all initials and names to come~~, unpublished observations) was used. For the latter, a synthetic pentapeptide containing the sequence *N*-acetyl-Lys-Cys-Lys-Tyr-Lys was prepared to make a disulphide bridge with the terminal cysteine residue of the unknown peptide for sequencing. Since the *N*-terminal lysine residue of the synthetic peptide was blocked, only the unknown peptide containing a free thiol group would be sequenced, after preparing a heterodimer by mixed disulphide bridge formation, with the synthetic carrier pentapeptide.

#### Neuron culture techniques

Adult crayfish, *Procambarus clarkii*, were collected from Río Conchos, Chihuahua, México, and adapted to laboratory conditions for 1 week, under a 12h:12h light:dark photoperiod. Eystalks were excised and placed in chilled crayfish saline solution (in mmol l<sup>-1</sup>): 205 NaCl, 5.4 KCl, 13.5 CaCl<sub>2</sub>, 2.6 MgCl<sub>2</sub> and 10 Hepes, adjusted to pH 7.4 with NaOH. The exoskeleton, muscles and connective tissue surrounding the neural structures were carefully removed under a dissecting microscope to expose the neuronal somata. Isolated X organ neurons were incubated in collagenase/dispase (200 μl ml<sup>-1</sup>, Boehringer Mannheim) dissolved in modified Leibovitz L-15 (Gibco) culture medium for 60 min. The enzyme was washed out, and the X organ neurons were dissociated by gentle suction through fire-polished micropipettes, as described previously (García et al., 1990), and plated onto a 200 μl recording chamber precoated with Concanavalin A (Type III, Sigma). The ionic composition of the culture medium was increased to match that of the crayfish saline solution. In addition, 5.5 mmol l<sup>-1</sup> glucose, 2 mmol l<sup>-1</sup> L-glutamine, 16 μg ml<sup>-1</sup> gentamycin (Shering Plough) and 5 μg ml<sup>-1</sup> streptomycin (Sigma) were added. Cultured cells were kept in darkness for 24 h before the experiments were conducted.

#### Electrophysiology

Voltage-clamp experiments in the whole-cell configuration were performed using cultured X organ neurons. Na<sup>+</sup> current recordings were obtained using an Axopatch-200A amplifier (Axon Instruments). Pipettes were constructed from borosilicate capillaries (Sutter Instruments; CA, USA) using a horizontal puller (P-87 Flaming Brown, Sutter Instruments, USA). Pipettes were filled with a solution containing (in mmol l<sup>-1</sup>): 20 NaCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 210 CsCH<sub>3</sub>SO<sub>4</sub>, 5 EGTA-K and 10 Hepes, adjusted to pH 7.4 with CsOH. After being filled, the pipette tip resistance was 3.3 ± 0.2 MΩ. Series resistance was compensated at 65–80%. Na<sup>+</sup> currents were filtered at a frequency of 5 kHz and stored on hard disk using the DigiData 1200 hardware acquisition system and its software (pClamp6, Axon Instruments, USA). Transient capacitative and leak currents were subtracted using the P/4 protocol.

To isolate the Na<sup>+</sup> current, the neurons were superfused in

a solution containing (in mmol l<sup>-1</sup>): 190 NaCl, 5 KCl, 10 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 20 tetraethylammonium chloride (TEA-Cl), 5 4-amino pyridine (4-AP), 2 CdCl<sub>2</sub> and 10 Hepes at pH 7.4. The toxin samples were kept lyophilized and freshly prepared for each experiment by dissolving in saline solution at the desired concentration and using the solution immediately. The solution containing the toxin (10 ml) was continuously superfused in the experimental chamber (200 μl). The toxin assays were made in neurons with stable Na<sup>+</sup> currents.

## Results

### Purification and sequencing of Cn11

As reported previously (Possani et al., 1981), when applied to a Sephadex G-50 column, the venom of the scorpion *Centruroides noxius* resolves into three components, the second of which contains most of the peptides toxic to mice, crickets and crayfishes (García et al., 1997). This fraction, after ion-exchange column chromatography (Possani et al., 1981), gives rise to approximately 14 different components. Fraction II-5 (i.e. fraction II from Sephadex, sub-fraction 5 from CM-Cellulose) is not toxic to mice at doses up to 180 μg per 20 g mouse mass (see García et al., 1997), but is toxic to arthropods. After HPLC separation, as shown in Fig. 1, it resolves into approximately nine main sub-components.

The component numbered 4 contained the peptide under study and was finally obtained in homogeneous form after HPLC separation in a C18 reverse-phase column, set at 25% solvent B, as shown in the inset of Fig. 1. The fraction labelled with an asterisk in the inset was homogeneous, as determined by amino acid sequence and mass spectrometry analyses (relative molecular mass experimentally determined to be 6972). This peptide corresponds to 1.8% of the whole soluble venom. It is lethal to the crayfish *Cambarellus montezumae* (a freshwater species native to the ponds in the area of Cuernavaca, México) at doses of 15 μg per adult animal. It is also toxic, but not lethal, to crickets (*Acheta* spp.) at doses of approximately 20 μg per animal.

In Fig. 2, we summarize the results necessary to align the complete amino acid sequence of this novel crustacean toxin, termed Cn11 (Cn from the abbreviation for the species *Centruroides noxius* and 11 because it was the eleventh peptide specific for Na<sup>+</sup> channels purified to homogeneity from this venom).

Direct sequencing of native peptide resolved the first 20 amino acid residues (Fig. 2). This sequence was confirmed, including the location of cysteine residues, when the toxin was reduced and carboxymethylated before sequencing. The first 34 residues were unequivocally identified (under-labelled RCM in Fig. 2). Additional sequence was obtained by overlapping the sequences obtained from a series of peptides, after aspartic-*N*-endopeptidase digestion (labelled Asp-N), from residues 20–43, endopeptidase V8 digestion (corresponding to an elution time of 36.62 min in a column similar to that in the inset in Fig. 1; data not shown), which gave the sequence of amino acids in positions 48–59, and two



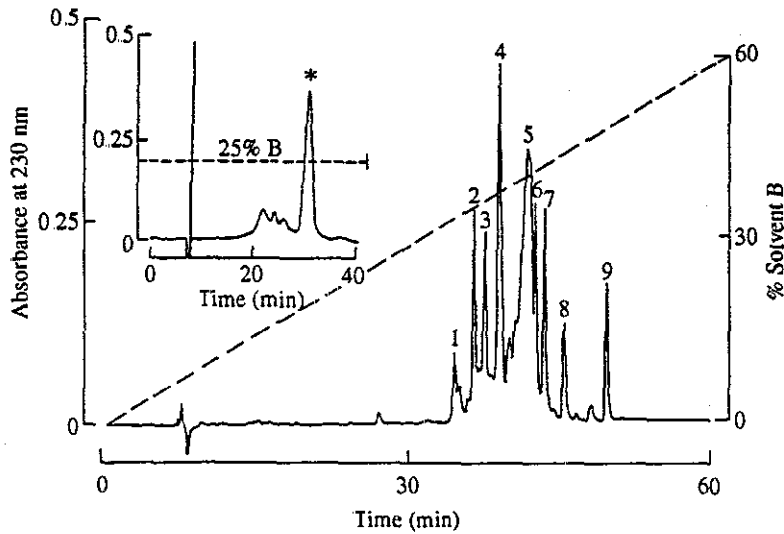
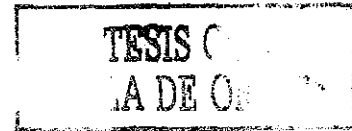


Fig. 1. Purification of toxin Cn11. Sub-fraction II-5 (1 mg), obtained by previous separation of soluble venom of the scorpion *Centruroides noxius*, was applied to an HPLC C4 reverse-phase column (Vydac, Hisperia, CA, USA) and eluted with a linear gradient of solvent A (0.12 % trifluoroacetic acid in water) to 60 % solvent B (0.1 % trifluoroacetic acid in acetonitrile) over 60 min. Component 4 (140  $\mu$ g) was further separated by HPLC using a C18 reverse-phase column (Vydac) by application of 25 % solvent B (inset). The asterisk indicates the elution position of the pure toxin.

tryptic peptides obtained after trypsin digestion. The tryptic peptides are under-labelled Tryp1 and Tryp2 (Fig. 2). The first corresponds to an elution time of 29.37 min and gave the position of residues 39–52, and the second (Tryp2) gave the sequence from Val at position 55 to the C terminus.

To complete the full sequence, two situations were also considered; the first concerns the peptide Tryp1, whose sequence starts with Thr at position 39, indicating that this enzyme had some residual chemotryptic activity contaminant because it cleaved at Tyr38. The second observation is that the second tryptic peptide, from residue Val55, gave unequivocal identification only up to residue Asn61. The molecular mass, experimentally determined to be 6972 Da, suggested that two additional residues were lacking, compatible with the presence of a Thr and a Cys. The latter was needed to complete the four disulphide bridges, since one cysteine was still missing. However, the exact positions of the missing Thr and Cys were not known. For this reason, a pentapeptide (described in Materials and methods) was synthesized and used to make a mixed disulphide heterodimer with Tryp2. The microsequencer results showed unequivocally that the amino acid in position 62 was Thr, leaving a cysteine at position 63. The theoretical relative molecular mass calculated for native Cn11 was 6973, close to the value determined experimentally.

Thus, Cn11 is a peptide that contains 63 amino acid residues, folded compactly by four disulphide bridges, similar to other  $\text{Na}^+$ -channel-specific scorpion toxins (for a review, see Possani et al., 1999a).

#### *Effects of Cn11 toxin on crayfish neuronal $\text{Na}^+$ channels*

To obtain better voltage-clamp control, the effect of Cn11 on the  $\text{Na}^+$  current was tested in neurons after 24 h in culture; at this time, the cells show discrete axonal regeneration, but the mean current amplitude at 0 mV was approximately 2 nA.

Fig. 3A shows a set of superimposed traces of inward  $\text{Na}^+$  currents obtained before and during Cn11 toxin ( $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) superfusion evoked in response to 0 mV depolarising voltage steps applied every 15 s from a holding potential of  $-60$  mV. The first three traces under control conditions were averaged (lowest trace, labelled control). In the presence of the toxin, the current amplitude was gradually reduced, the maximum blocking effect being reached 3.5 min later (75 % reduction in current amplitude). This effect was only partially reversible (not shown).

#### *Cn11 does not modify $\text{Na}^+$ channel gating*

The  $\text{Na}^+$  current elicited at 0 mV under control conditions reached a peak amplitude  $1.0 \pm 0.13$  ms after the onset of the

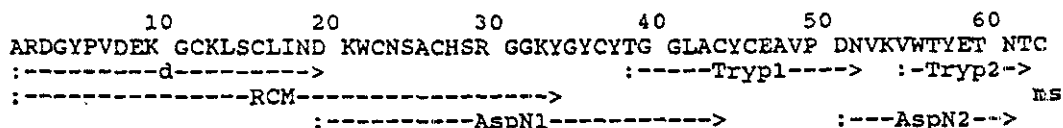


Fig. 2. Complete amino acid sequence of Cn11. The N-terminal amino acid sequence up to residue 20 (underlined d→) was obtained by direct sequencing of a sample of native peptide, whose sequence was confirmed up to residue 34 with a reduced and carboxymethylated sample (underlined RCM→). Four additional sub-peptides obtained by enzymatic cleavage of alkylated toxin, followed by HPLC separation (as in Fig. 1, data not shown), were sequenced. They are under-labelled Tryp1 (positions 39–52) and Tryp2 (positions 55–62), for trypsin digestion and AspN1 (positions 20–44) and AspN2 (positions 51–61), for aspartic-N endopeptidase digestion. The last residue in position 63 was determined by mass spectrometry (under-labelled ms).

OK  
#/  
OK  
See  
ms.  
77

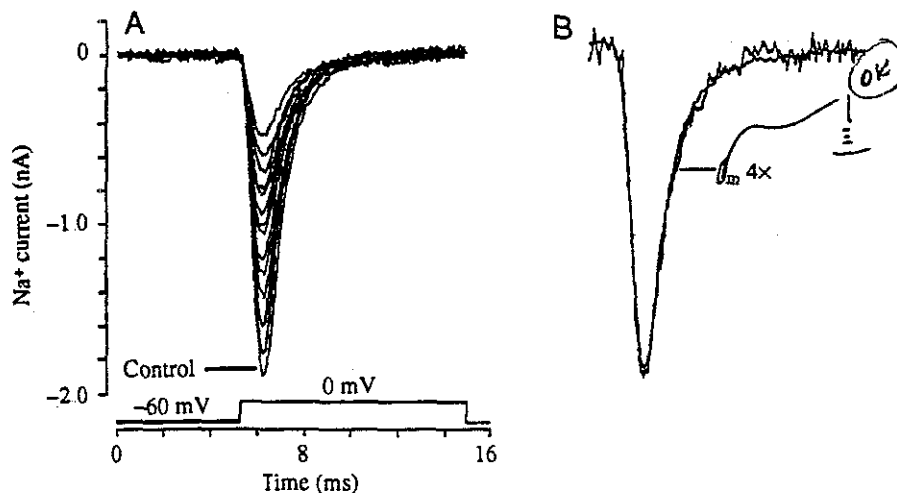


Fig. 3. Blockade of Na<sup>+</sup> currents by Cn11 in crayfish neurons. (A) After 3 min of establishing the whole-cell configuration, inward Na<sup>+</sup> currents were elicited by test depolarizations to 0 mV from -60 mV, each for 15 s. The first three traces were averaged and taken as the control value in the absence of toxin. Subsequent traces were obtained during perfusion of the preparation with 1  $\mu\text{mol l}^{-1}$  Cn11. The traces show how the current decreases over time. (B) Cn11 blocks the current without affecting its kinetics, as shown by superimposition of the time course of control Na<sup>+</sup> currents and those in the presence of toxin (scaled up fourfold), which blocked 75% of the control current (labelled  $I_m 4\times$ )

depolarizing step and then decayed with a half-decay time of  $0.86 \pm 0.05$  ms (means  $\pm$  S.E.M.,  $N=10$ ). The traces obtained at 75% blockade of the Na<sup>+</sup> currents were analysed and compared with those obtained under control conditions by scaling up the current traces in the presence of the toxin fourfold, as shown in Fig. 3B. The traces with and without Cn11 were very similar, showing that neither the time to peak nor the half-decay time was significantly modified. Thus, the toxin seems to be a *bona fide* blocker of the currents.

#### The effect of Cn11 is time- and concentration-dependent

To explore the concentration-dependence and the time course of the blockade induced by Cn11, the Na<sup>+</sup> current amplitude was monitored every 10 s using the pulse protocol described in Fig. 3A. Three current traces were obtained under control conditions; the cells were then superfused with the same external solution but with Cn11 added for 160 s. The toxin was then washed from the recording chamber and the current was recorded for a further 160 ms. As is shown in Fig. 4A, the current amplitude was normalized with respect to the mean value obtained under control conditions. In the absence of the toxin, the Na<sup>+</sup> current decreased by 10% during the first 160 s; this rundown was taken into account in the subsequent estimation of the Na<sup>+</sup> current amplitude in the presence of the toxin. After removal of the toxin from the recording chamber, the Na<sup>+</sup> current recovered slowly for the lowest concentration tested (50 nmol l<sup>-1</sup>).

To determine the  $K_m$  for the effect of Cn11 on X organ neurons, the amplitude of the Na<sup>+</sup> current was measured 70 s after exposure to the toxin. The percentage of current blockade was plotted as a function of the toxin concentration, assuming a rundown of 5%. The data were fitted to a Boltzman's function, giving a calculated  $K_m$  of 320 nmol l<sup>-1</sup> (Fig. 4B).

#### Cn11 does not modify the voltage-dependent activity of the neuronal Na<sup>+</sup> channels

The voltage-dependence of the blockage exerted by Cn11 on the Na<sup>+</sup> current was explored using command pulses to

voltages between -50 and 50 mV from a holding potential of -60 mV. Under control conditions, the apparent activation threshold of the current was always -40 mV, and the maximal current was consistently near 0 mV (Fig. 5, open circles). During superfusion of 1  $\mu\text{mol l}^{-1}$  (filled squares) or 3  $\mu\text{mol l}^{-1}$  (open squares) Cn11, neither the apparent activation threshold nor the potential giving the maximal current was modified after 3 min of exposure to toxin, suggesting that the mechanism of action of Cn11 is quite similar to those of TTX and STX.

#### Discussion

The purification of Cn11 followed a procedure similar to those used for Cn5, a crustacean toxin (García et al., 1997), and Cn10, an insect toxin (Selisko et al., 1996), purified from the same venom. The third major peak shown in Fig. 1 (labelled 3) corresponds to Cn10, the fourth peak to Cn11, and the fifth peak to Cn5 (see Selisko et al., 1996). An additional step was necessary to obtain Cn11 in homogeneous form (component labelled with an asterisk in the inset of Fig. 1). None of the three toxins thus far isolated, sequenced and studied from fraction II-5 of *C. noxius* is considered to be toxic to mammals. They are all arthropod-specific toxins. Furthermore, they are all long-chain peptides that, as shown by sequence similarities and functional analysis, correspond to the family of Na<sup>+</sup>-channel-specific peptides (see Possani et al., 1999a). However, the determination of the primary structure of Cn11, reported here, was not straightforward.

Several cleavages with different enzymes followed by HPLC separation of the corresponding fragments and individual sequencing were required to obtain the full amino acid sequence. The last two residues were identified only by using a synthetic carrier pentapeptide, as described in Materials and methods.

Before analyzing in detail the results presented here, it is important to discuss briefly the current state of knowledge of Na<sup>+</sup> channel blockade and permeability properties in the

presence of different ligands including scorpion toxins. The specificity of Cn11 for the  $\text{Na}^+$  channel was assayed using cultured neurons from the crayfish eyestalk. As mentioned above, Cn11 did not affect the kinetic properties of isolated  $\text{Ca}^{2+}$  currents or outward  $\text{K}^+$  currents. Surprisingly, a small  $\text{Na}^+$  current (5–15%) remained after blockade by Cn11 at high concentration and for a prolonged incubation time, suggesting that more than one type of  $\text{Na}^+$  channel is present in these cells. In a previous communication (Onetti et al., 1990), we showed

that, there are at least two types of  $\text{Na}^+$  channel in these cells, one sensitive and the other insensitive to TTX. Assuming that this is the case, Cn11, like TTX, can discriminate between these two types of  $\text{Na}^+$  current.

Voltage-gated  $\text{Na}^+$  channels are the molecular target for a broad range of neurotoxins that act at six or more distinct receptor sites on the channel protein. There are hydrophilic polypeptides, of either low or high molecular mass, that physically block the pore and prevent the conductance of  $\text{Na}^+$ . There also exist alkaloid toxins and related lipid-soluble toxins that alter the voltage-dependent gating of  $\text{Na}^+$  channels via an allosteric mechanism by binding to intramembranous receptor sites. In contrast, polypeptide toxins alter channel gating by voltage sensor trapping through binding to extracellular receptor sites. Studies defining the receptor sites and mechanisms of action of these diverse toxins were recently reviewed by Cestele and Catterall (2000).

If we analyze this review and that of Possani et al. (1999a), it is clear that none of the scorpion toxins studied thus far has a mechanism of action identical to that described here for Cn11. In Fig. 6, we show a comparative analysis of the identity found when comparing representative examples of each of the 10 proposed groups (Possani et al., 1999a). Pairwise comparisons with Cn11 were made separately between each of the 10 groups described. Gaps were introduced to enhance similarities and to place cysteine residues in equivalent positions. Only group 10, which is an insect toxin (AaHIT), has a disulphide pairing that does not fit exactly with the others, and it has been reported that the disulphide arrangement of this toxin is different from that of the others (for reviews, see

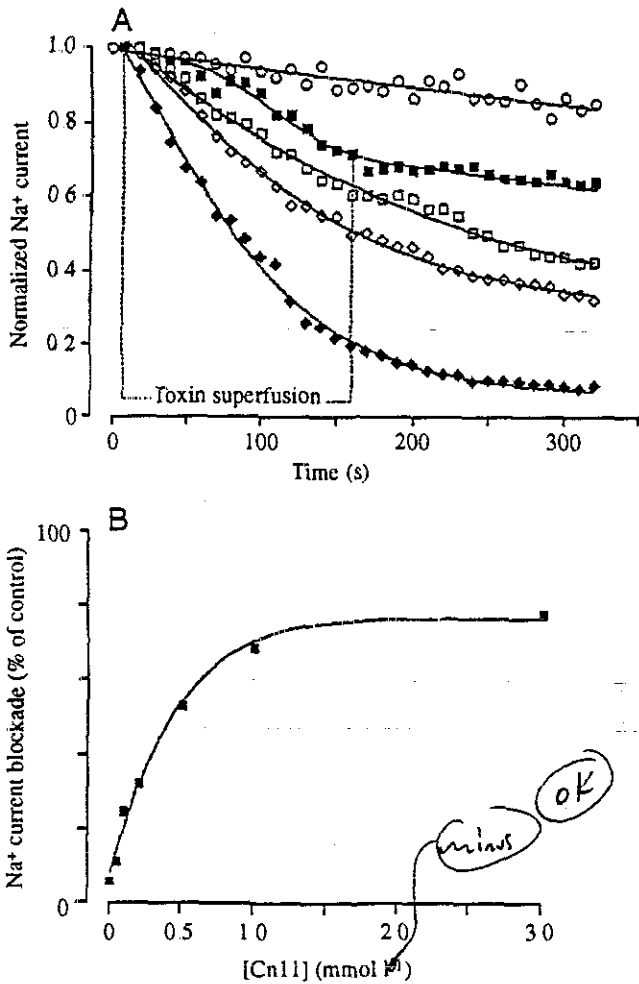


Fig. 4 Time course of the blockade of  $\text{Na}^+$  currents by Cn11 and determination of  $K_m$ . (A) Under control conditions, the current amplitude decreases steadily by approximately 10% during the first 160s, and this is taken as a normal rundown (open circles). Subsequent curves were obtained after superfusion with the toxin at various concentrations: filled squares,  $50 \text{ nmol l}^{-1}$ ; open squares,  $100 \text{ nmol l}^{-1}$ ; open diamonds,  $200 \text{ nmol l}^{-1}$ ; filled diamonds,  $500 \text{ nmol l}^{-1}$ . Normalized current ( $I_m$ ) was obtained as  $I/I_m$ . After 160s, the preparation was superfused with the external solution. The current amplitude decreased in a concentration-dependent manner, with no apparent recovery. (B) The percentage of  $\text{Na}^+$  current blockade plotted against Cn11 concentration 70s after application of the toxin, corrected for 5% rundown. The points were fitted to a Boltzman's equation, giving a  $K_m$  of approximately  $320 \text{ nmol l}^{-1}$ .

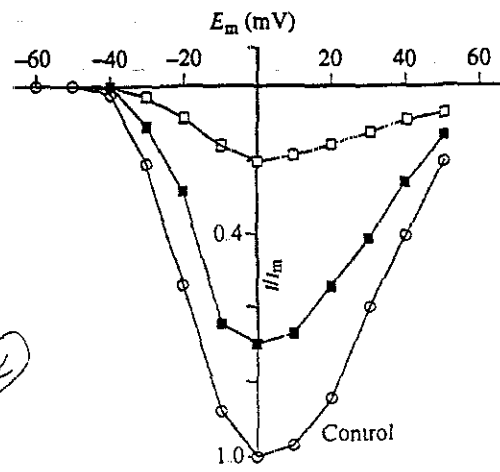


Fig 5 The blockade of the  $\text{Na}^+$  current by Cn11 is not voltage-dependent. Current/voltage relationships were obtained under control conditions (open circles) and 3 min after the application of  $1 \mu\text{mol l}^{-1}$  (filled squares) or  $3 \mu\text{mol l}^{-1}$  (open squares) Cn11. The inward currents were elicited by depolarizing from a holding potential of  $-60 \text{ mV}$  to  $+50 \text{ mV}$ , in increments of  $10 \text{ mV}$ , with pulses of  $10 \text{ ms}$  duration. Currents start at approximately  $-40 \text{ mV}$  and reach a maximum value of approximately  $0 \text{ mV}$ .  $I/I_m$ , normalized  $\text{Na}^+$  current.

OK  
 See ms.  
 79

Gp	Toxin	Amino acid sequence										Percentage identity																																																																
		1	10	20	30	40	50	60	70																																																																			
1	AaHII	VK	DG	YIV	DD	VN	CT	Y	FC	GR	---	NAY	CNE	E	CT	K	L	G	E	---	SG	Y	Q	W	A	S	P	Y	G	N	A	C	Y	C	Y	K	L	P	D	H	V	R	---	TK	G	P	G	R	C	R	36																									
2	CssII	-	K	E	G	L	V	S	K	S	T	G	C	K	Y	E	C	L	K	L	G	D	N	D	Y	C	L	R	E	C	K	Q	Y	G	K	S	S	G	Y	C	-	A	---	F	A	C	W	C	T	H	L	Y	E	Q	A	V	V	W	P	L	P	N	K	T	C	N	32									
3	Tsgamma	-	K	E	G	L	M	D	H	E	-	G	C	K	L	S	C	F	I	-	R	P	S	G	Y	C	G	R	E	C	G	I	K	K	---	S	S	G	Y	C	A	W	---	F	---	A	C	Y	C	G	L	P	N	W	V	X	V	W	D	R	A	T	N	K	C	-	46									
4	LqhIT2	---	D	G	Y	I	K	R	R	-	G	C	K	V	A	C	L	I	G	-	N	-	E	G	C	D	K	E	C	K	A	-	Y	G	---	S	Y	G	Y	C	W	T	---	G	L	A	C	W	C	E	G	L	P	D	D	-	K	T	W	K	S	E	T	N	T	C	G	56								
5	LqqIV	G	V	R	D	A	I	A	D	D	K	N	C	V	Y	T	C	G	S	---	N	-	S	Y	C	N	T	E	C	T	-	K	N	-	G	A	E	S	G	Y	C	Q	W	L	G	Y	G	N	A	C	W	C	I	K	L	P	D	K	V	---	P	I	R	I	P	G	K	C	R	34						
6	LqqIII	V	R	D	A	I	A	K	N	Y	-	N	C	V	Y	E	C	F	R	---	D	S	Y	C	N	D	L	C	T	-	K	N	-	G	A	S	S	G	Y	C	Q	W	A	G	Y	G	N	A	C	W	C	Y	A	L	P	D	N	V	P	I	---	R	V	P	G	K	C	H	37							
7	AaHIT4	-	E	H	G	L	L	N	K	Y	T	G	C	K	V	W	C	V	I	---	N	N	E	E	C	G	Y	L	C	N	-	K	R	R	G	Y	Y	G	Y	C	F	W	K	L	---	A	C	Y	C	Q	G	A	R	K	S	-	E	L	W	N	Y	K	T	N	K	C	D	L	42							
8	CsEv3	-	K	E	G	L	V	K	K	S	D	G	C	K	Y	C	L	K	L	G	E	N	E	C	D	T	E	C	K	A	R	N	Q	G	S	Y	C	Y	A	---	F	---	A	C	W	C	E	G	L	P	E	S	T	P	T	Y	P	L	P	N	K	S	-	35												
9	Cn10	-	K	E	G	L	V	N	K	S	T	G	C	K	Y	N	C	L	I	L	G	E	N	K	N	C	D	M	E	C	K	A	R	N	Q	G	S	Y	C	Y	K	---	L	---	A	C	W	C	E	G	L	P	E	S	T	P	T	Y	P	I	P	G	K	T	C	R	T	39								
10	AaHIT	K	K	N	G	Y	A	V	D	S	S	-	G	K	A	P	E	C	L	L	S	-	N	Y	-	C	Y	N	N	E	C	T	K	V	H	A	D	K	-	G	Y	C	L	-	L	---	S	C	Y	C	F	G	L	N	D	D	K	R	V	L	E	I	S	D	T	R	K	S	Y	C	D	T	T	I	N	28
11	Cn11	A	R	D	G	P	V	D	E	K	-	G	C	K	L	S	C	L	I	---	N	D	K	W	C	N	S	A	C	H	S	R	---	G	G	K	Y	G	Y	C	T	-	G	---	G	L	A	C	Y	C	E	A	V	P	D	N	V	K	V	W	T	Y	E	T	N	T	C	-	100							

Fig. 6. Pairwise comparison of identity between Cn11 and the other 10 representative groups of scorpion toxin specific for Na<sup>+</sup> channels. The amino acid sequence of the 10 representative examples of each sub-group of Na<sup>+</sup> channel scorpion toxin was compared with the amino acid sequence of Cn11 (the eleventh group proposed here). AaHII is toxin II from *Androctonus australis* Hector, the prototype of an α-scorpion toxin; CsslI is toxin II from *Centruroides suffusus suffusus*, the prototype of a β-scorpion toxin; Tsgamma is toxin gamma from *Tityus serrulatus*; LqhIT2 is insect toxin 2 from *Leiurus quinquestriatus hebraeus*; LqqIV is toxin IV from *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*; LqqIII is toxin III from the same scorpion; AaHIT4, toxin 4, is an insect toxin from *Androctonus australis* Hector; CsEv3 is variant 3 from *Centruroides sculpturatus* Ewing; Cn10, toxin 10, is an insect toxin from *Centruroides noxius* Hoffmann; AaHIT is an insect toxin from *Androctonus australis* Hector; and Cn11 is from this study (data from Possani et al., 1999a, 2000, 2001). Gaps (dashes) were introduced to enhance similarities. Cysteine residues are in bold type. The right-hand column indicates the percentage identity of the pairwise comparison

Gordon et al., 1998; Possani et al., 1999a). The most closely related group (group 4) has only 56% identity with Cn11. All the other toxins have identities ranging from only 28 to 46% (see Fig. 6). The two consensus (signature) sequences CXXXC and CXC, where C stands for cysteine and X for any residue, that serve to stabilize the three-dimensional structure by linking the α-helix stretch with the β-sheet segments are conserved, except in AaHIT, as discussed. However, the most important argument in classifying Cn11 as a distinct group resides in its function. Cn11 blocks the Na<sup>+</sup> currents of crayfish neurons in culture without apparently affecting the gating mechanism of the channels, an effect known to occur for the other groups of scorpion toxins.

Indeed, the blocking effect is time- and concentration-dependent, with a K<sub>m</sub> of 320 nmol<sup>-1</sup>. The effect of Cn11 is similar to the blocking effects of TTX and STX, which physically block the passage of ions by binding to the channels, acting on the channel like a cork in a bottle, with the guanidinium group of the toxin being the cork. The only other peptide described as a potent Na<sup>+</sup> channels blocker is the 22-amino-acid peptide μ-conotoxin from a marine snail (McIntosh et al., 1999; Dudley et al., 1995).

Cn11 is quite specific for crustaceans, having no detectable effect on mammals at the relatively high concentration used (more than 500 μg per 20 g mouse) (all initials and names to come unpublished). Cn11 could be a valuable tool in the investigation of the shape and structure of the outer vestibule of Na<sup>+</sup> channels, as has been reported for other systems (Frech and Dudley, 1999; Marban et al., 1998; Chahaine et al., 1998; Dudley et al., 1995; Li et al., 1997; Fozzard and Lipkind, 1996).

This study was partially supported by grants CONACyT 31691-N and Z-005, DGAPA-UNAM IN216900 and Howard Hughes Medical Institute 55000574. M.E.R.D. was the recipient of a scholarship from CONACyT.

References

Batista, C. V. F., Gomez-Lagunas, F., Lucas, S. and Possani, L. D. (2000). Tc1, from *Tityus cambridgei*, is the first member of a new subfamily of scorpion toxin that blocks K<sup>+</sup> channels. *FEBS Lett* 486, 117-120.

Catterall, W. A. (1986). Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 953-985.

Catterall, W. A. (1996). Ion channels in plasma membrane signal transduction. *J. Bioenerg. Biomembr.* 28, 217-218.

Cestele, S. and Catterall, W. A. (2000). Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* 82, 883-892.

Chahaine, M., Sirois, J., Marcotte, P., Chen, L. Q. and Kailen, R. G. (1998). Extrapore residues of the S5-S6 loop of domain 2 of the voltage-gated skeletal muscle sodium channel (rSkM1) contribute to the μ-conotoxin GIIIA binding site. *Biophys. J.* 75, 236-246.

Couraud, F. and Jover, E. (1984). [Title of article to come]. In *Insect Poisons, Allergens and other Invertebrate Venoms. Handbook of Natural Toxins* (ed A.J. Tu), pp. 659-711. New York: Basel: Marcel Dekker

Debin, J. A., Maggio, J. E. and Strichartz, G. R. (1993). Purification and characterization of chlorotoxin a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *Am. J. Physiol* 264, C361-C369.

Dudley, S. C., Jr, Todd, H., Jr, Lipkind, G. M. and Fozzard, H. A. (1995). A μ-conotoxin-insensitive Na channel mutant: possible localization of a binding site at the outer vestibule. *Biophys. J.* 69, 1657-1665.

Dufton, M. J. and Rochat, H. (1984). Classification of scorpion toxins according to amino acid composition and sequence. *J. Mol. Evol.* 20, 120-127.

Fozzard, H. A. and Lipkind, G. (1996). The guanidinium toxin binding site on the sodium channel. *Jap. Heart J.* 37, 683-692.

Frech, R. J. and Dudley, S. C., Jr (1999). Pore-binding toxins as probes of voltage-dependent channels. *Methods Enzymol* 294, 575-605.

García, C., Becerril, B., Schisko, B., Delepiere, M. and Possani I. D. (1997). Isolation, characterization and comparison of a novel crustacean toxin with a mammalian toxin from the venom of the scorpion *Centruroides*

OK  
see ms.

OK  
see ms.

OK  
see ms.

To come  
xl  
678

come

S.F. Serrano-Hernández and T. Olamendi-Portugal

Mechanism of action of 80

Biochem. Mol. Biol

116B

8 M. E. Ramirez-Dominguez and others

See ms.

See (OK) ms.

See (x2) 716

noxius Hoffmann. *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.* 116, 315-322

García, M. L., Hanner, M., Knaus, H. G., Koch, R., Schmalhofer, W., Slaughter, R. S. and Kaczorowski, G. J. (1997). Pharmacology of potassium channels. *Adv. Pharmacol.* 39, 425-471.

García, U., Grambacher-Reinert, S., Bookman, R. and Reuter, H. (1990). Distribution of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> currents in soma, axons and growth cones of leech Retzius neurons in culture. *J. Exp. Biol.* 150, 1-17.

Gordon, D., Martin-Eauclaire, M. F., Cestele, S., Kopeyan, C., Carlier, E., Khalifa, R. B., Pelhate, M. and Rochat, H. (1996). Scorpion toxins affecting sodium current inactivation bind to distinct homologous receptor sites on rat brain and insect sodium channels. *J. Biol. Chem.* 271, 8034-8045

Gordon, D., Savarin, P., Gurevitz, M. and Zinn-Justin, S. (1998). Functional anatomy of scorpion toxins affecting sodium channels. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 17, 131-159

Jover, E., Couraud, F. and Rochat, H. (1980). Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95, 607-614.

Li, R. A., Tsushima, R. G., Kallen, R. G. and Backx, P. H. (1997). Pore residues critical for mu-CTX binding to rat skeletal muscle Na channels revealed by cysteine mutagenesis. *Biophys. J.* 73, 1874-1884.

Marban, E., Yamagishi, T. and Tomassell, G. F. (1998). Structure and function of voltage-gated sodium channels. *J. Physiol. Lond.* 508, 647-657

Martin-Euclaire, M. F. and Couraud, F. (1995). Scorpion neurotoxins: Effects and mechanisms. In *Handbook of Neurotoxicology* (ed L. W. Chang and R. S. Dier), pp. 683-716. New York: Marcel Dekker.

McIntosh, J. M., Olivera, B. M. and Cruz, L. J. (1999). Conus peptides as probes for ion channels. *Methods Enzymol.* 294, 605-624.

Onetti, C., Garcia, U., Valdiosera, R. and Aréchiga, H. (1990). Ionic currents in crustacean neurosecretory cells. *J. Neurophysiol.* 64, 1514-1526

Possani, L. D., Becerril, B., Delepiere, M. and Tytgat, J. (1999a). Scorpion toxins specific for Na channels. *Eur. J. Biochem.* 264, 287-300.

Possani, L. D., Becerril, B., Tytgat, J. and Delepiere, M. (2001). High affinity scorpion toxins for studying potassium and sodium channels. In *Ion Channel Localization Methods and Protocols* (ed. A. Lopatin and C. C. Nichols), pp. 145-165. Totowa, NJ: Humana Press Inc.

Possani, L. D., Dent, M. A. R., Martin, B. M., Maelicke, A. and Svendsen, I. (1981). The amino terminal sequence of several toxins from the venom

of the Mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Carlsberg Res Commun.* 46, 207-214.

Possani, L. D., Merino, E., Corona, M., Bolivar, F. and Becerril, B. (2000). Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion channels. *Biochimie* 82, 861-868.

Possani, L. D., Selisko, B. and Gurrola, G. B. (1999b). Structure and function of scorpion toxins affecting K<sup>+</sup> channels. *Perspect. Drug Discovery Design* 1516, 15-40.

Scaloni, A., Bottiglieri, C., Ferrara, L., Corona, M., Gurrola, G. B., Wanke, E. and Possani, L. D. (2000). Disulphide bridges of Ergtoxin, a member of a new sub-family of peptide blockers of the ether-a-go-go-related K<sup>+</sup> channel. *FEBS Lett.* 479, 156-157.

Selisko, B., Garcia, C., Becerril, B., Delepiere, M. and Possani, L. D. (1996). An insect-specific toxin from *Centruroides noxius* Hoffmann. cDNA, primary structure, three-dimensional model and electrostatic surface potentials in comparison with other toxin variants. *Eur. J. Biochem.* 242, 235-242.

Terlau, H. and Stühmer, W. (1998). Structure and function of voltage-gated ion channels. *Naturwissenschaften* 85, 437-444

Tugarinov, V., Kustanovich, I., Zilberberg, N., Gurevitz, M. and Anglister, J. (1997). Solution structures of a highly insecticidal recombinant scorpion beta-toxin and a mutant with increased activity. *Biochemistry* 36, 2414-2424

Tytgat, J., Chandy, K. G., Garcia, M. L., Gutman, G. A., Martin-Eauclaire, M. F., Van del Walt, J. J. and Possani, L. D. (1999). A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 444-447.

Valdivia, H. and Possani, L. D. (1998). Peptide toxins as probes of ryanodine receptor. *Trends Cardiovasc. Med.* 8, 111-118

Wheeler, K. P., Watt, D. D. and Lazdunski, M. (1983). Classification of Na channel receptors specific for various scorpion toxins. *Pflügers Arch.* 397, 164-165

Zilberberg, N., Zlotkin, E. and Gurevitz, M. (1992). Molecular analysis of a transcript encoding the depressant insect selective neurotoxin of the scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 22, 199-203

Zlotkin, E. (1987). Pharmacology of survival: insect selective neurotoxins derived from scorpion venom. *Endeavour* 11, 168-174.

Zlotkin, E., Miranda, F. and Rochat, H. (1978). ~~Full of article to come~~ In *Arthropods Venoms* (ed. S. Beutling), pp. 317-370. Berlin: Springer-Verlag.

See ms

See ms

See ms

To come

Delete last reference!

