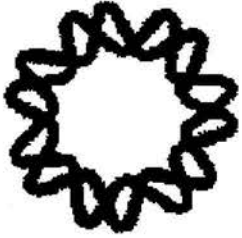


00391



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**Caracterización bioquímica y funcional de la
fosfolipasa A₂ heterodimérica Phaiodactylipina
perteneciente al grupo III**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS
P R E S E N T A
Q.F.B. Norma Adriana Valdez Cruz

Cuernavaca, Mor., 2004



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.

**ESTA TESIS DOCTORAL SE REALIZÓ BAJO LA DIRECCIÓN DEL
DR. LOURIVAL DOMINGOS POSSANI POSTAY
EN EL INSITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

Financiado en parte por los donativos: CONACyT Z-005, DGAPA-UNAM IN216900, Howard Hughes Medical Institute 75197-527107 concedidos al Dr. Lourival Possani Postay. La estudiante recibió el apoyo económico del CONACyT (registro 128495) y de la Dirección General de Estudios de Posgrado DGEP-UNAM.

ASESOR DEL TEMA

Dr. Lourival Domingos Possani Postay

SINODALES:

Presidente: Dr. Mario Soberón Chávez
Secretario: Dr. Lourival Domingos Possani Postay
Vocal: Dr. Enrique Merino Pérez
Vocal: Dra. Adela Rodríguez Romero
Vocal: Dr. Alejandro Alagón Cano
Suplente: Dra. Clarita Olvera Carranza
Suplente: Dr. Lorenzo Segovia Forcella

COMITÉ TUTORAL:

Dr. Federico Sánchez
Dr. Miguel Ángel Cevallos
Dr. Alejandro Alagón Cano

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
LISTAS DE:	
ABREVIATURAS	5
FIGURAS	6
TABLAS	6
PRESENTACION	7
RESUMEN	8
SUMMARY	9
1 INTRODUCCION	10
1.1 Generalidades	10
1.2 Fosfolipasas	11
1.2.1 Fosfolipasas A ₂	12
1.2.2 Clasificación de las fosfolipasas A ₂	12
1.2.3 Estructura de fosfolipasas A ₂ de bajo peso molecular	14
1.2.4 Fosfolipasas A ₂ de bajo peso molecular purificadas de mamífero	14
1.2.5 Fosfolipasas A ₂ de bajo peso molecular purificadas de venenos animales	17
1.2.6 Receptores para fosfolipasas A ₂ de bajo peso molecular	20
2 ANTECEDENTES	21
2.1 Fosfolipasas A ₂ heterodiméricas unidas covalentemente	21
2.1.1 β- Bungarotoxina	21
2.1.2 Conodipina-M	22
2.1.3 Imperatoxina I	23
2.1.4 Fosfolipina	23
3 HIPÓTESIS	23
4 OBJETIVOS	24
5 MATERIALES Y METODOS	24
5.1 Obtención del veneno	
5.2 Purificación de la fosfolipasa A ₂ Phaiodactylipina	24
5.3 Determinación de la estructura primaria de la FLA ₂ Phaiodactylipina	25
5.4 Determinación de peso molecular	26
5.5 Determinación de la glicosilación de la subunidad pequeña	26
5.6 Ensayos de actividad fosfolipásica y determinación de actividad A ₂	27
5.7 Determinación de las condiciones óptimas de actividad de la fosfolipasas Phaiodactylipina	28
5.8 Ensayos de letalidad	28
5.9 Prueba de actividad hemolítica	29
5.10 Prueba de actividad anticoagulante	29
5.11 Prueba de edema en músculo	30
5.12 Síntesis de subunidades pequeñas usando la estrategia f-moc	30

5.13	Clonación del gene codificante para la enzima Phaiodactylipina a partir de cDNA	30
5.14	Clonación del gene codificante para la Phaiodactylipina e isoformas, a partir de DNA genómico	31
5.15	Análisis de secuencia y filogenéticos	32
5.16	Búsqueda de receptores	32
5.17	Expresión de la fosfolipasa Phaiodactylipina fusionada a la proteína Trp-LE en <i>E. coli</i> recombinante	33
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
6.1	RESULTADOS PUBLICADOS	36
6.1.1	Purificación de la Phaiodactylipina	36
6.1.2	Determinación de la secuencia primaria de la Phaiodactylipina	38
6.1.3	Determinación de la glicosilación de la subunidad pequeña	39
6.1.4	Clonación y secuenciación de la Phaiodactylipina a partir de cDNA	40
6.1.5	Caracterización enzimática de la enzima Phaiodactylipina	41
6.1.6	Pruebas de letalidad	42
6.1.7	Efecto inflamatorio de la Phaiodactylipina	43
6.1.8	Actividad hemolítica	43
6.1.9	Efecto anticoagulante de la Phaiodactylipina	45
6.1.10	Comparación de la secuencia de la Phaiodactylipina con otras fosfolipasas A ₂	45
6.1.11	Análisis filogenético de la Phaiodactylipina	46
6.2	RESULTADOS NO PUBLICADOS	48
6.2.1	Pruebas de toxicidad de péptidos sintéticos	48
6.2.2	Clonación y secuenciación de isoformas de la Phaiodactylipina a partir de cDNA	49
6.2.3	Clonación del gene codificante para la enzima Phaiodactylipina e isoformas a partir de DNA genómico	49
6.2.4	Búsqueda de receptores	53
6.2.5	Expresión de la fosfolipasa Phaiodactylipina fusionada a la proteína Trp-LE en <i>E. coli</i> recombinante	55
7	CONCLUSIONES	58
8	PERSPECTIVAS	61
9	BIBLIOGRAFÍA	62
10	ANEXO	66

ABREVIATURAS

Ca ²⁺	Ión calcio
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
Da	Dalton
DCM	Diclorometano
DIPEA	Dimetil-N,N-diisopropiletlenamina
DPPE	1,2 diphytanoyl-sn-glycero-3 phosphoethanolamine
DPPC	1,2 diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DPPS	1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine]
DSPE	1,2-distearoyl-sn-glycero-3 phosphoethanolamine
DSPC	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DSPS	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-Serine]
DTT	Dithiotreitol
ES	Electrospray
FLA ₂ s	Fosfolipasas de tipo secretorio
FLA ₂	Fosfolipasa A ₂
IpTxI	Imperatoxina I
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HBTU	2-(1 H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato
HBOt	N-hidroxibenzotriazol
HCl	Ácido clorhídrico
HERG	Gene relacionado al canal <i>éter a-go-go</i> humano
K ⁺	Ión potasio
K	Constante de inhibición
K _d	Constante de disociación
LPL	Lipopolisacáridos
mm	Milímetros
MS	Mass spectrometry
nm	Nanómetros
OVA	Ovalbúmina
pb	Pares de bases
PC	Phosphocholine
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (“Polimerase chain reaction”)
PE	Phosphoethanolamine
PPP	Plasma pobre de plaquetas
PRP	Plasma rico de plaquetas
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PS	Phospho-L-serine
SAPE	1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
SAPC	1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
SAPS	1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-Serine]
TA	Temperatura ambiente
TFA	Ácido trifluoroacético
u.m.a	Unidad de masa atómica
vFLA ₂	Fosfolipasas A ₂ purificadas de venenos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cladograma de familias de alacranes.	11
Figura 2. Corte específico de las fosfolipasas A ₁ , A ₂ , B, C y D.	11
Figura 3. Diagrama en listones de la fosfolipasa KPLA ₂ (<i>Bungarus caeruleus</i>).	14
Figura 4. Sitios farmacológicos.	18
Figura 5. Estructura de la fosfolipasa heterodimérica β-bungarotoxina	22
Figura 6. Purificación de la fosfolipasa Phaiodactylipina	37
Figura 7. Estructura primaria de la Phaiodactylipina y el gene que la codifica.	38
Figura 8. Determinación de los carbohidratos de la subunidad pequeña.	40
Figura 9. Caracterización de la actividad enzimática de la Phaiodactylipina.	41
Figura 10. Efecto inflamatorio de la Phaiodactylipin sobre músculo de ratón.	43
Figura 11. Actividad hemolítica y anticoagulante de la Phaiodactylipina.	44
Figura 12. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la Phaiodactylipina con fosfolipasas del grupo III.	45
Figura 13. Filograma de diferentes fosfolipasas A ₂ alineadas con el programa Clustal X.	46
Figura 14. Alineamiento de las secuencias traducidas a partir de secuencias nucleotídicas que codifican para isoformas de la Phaiodactylipina (Phai).	49
Figura 15. Alineamiento de la secuencias nucleotídicas de genes correspondientes a fosfolipasas del grupo III.	50
Figura 16. Representación esquemática de las estructuras de fosfolipasas A ₂ de los grupos I, II, III y XII .	52
Figura 17. Transferencia tipo Bosan en membranas de acocil con péptidos sintéticos 18S4, 23S4 y 23C4 marcados con biotina.	53
Figura 18. Transferencia tipo Bosan de péptidos sintéticos 18S4, 18C4, 23S4 y 23C4 marcado con biotina y en competencia con péptido sintético sin marca.	55
Figura 19. Expresión de la fosfolipasa Phaiodactylipina fusionada a la proteína Trp-LE.	56

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de fosfolipasas A ₂ .	13
Tabla 2. Características moleculares de los receptores de fosfolipasas A ₂ .	21
Tabla 3. Preferencia lipídica de la fosfolipasa Phaiodactylipina en presencia de diferentes sustratos.	42
Tabla 4. Efecto de la Phaiodactylipina sobre insectos y crustáceos.	42
Tabla 5. Efecto de los péptidos sintéticos 18S4, 18C4, 23S4 y 23C4, en mamíferos (ratones), insectos (grillos), crustáceos (cochinillas).	48

PRESENTACIÓN

Esta tesis está enfocada al estudio bioquímico y funcional de la fosfolipasa denominada Phaiodactylipina, aislada a partir del veneno del alacrán *Anuroctonus phaiodactylus*, colectado en Maneadero, Baja California. La importancia de este estudio reside en el hecho de que se conoce una amplia variedad de funciones tóxicas de moléculas similares por lo cual la relevancia de su estudio.

La tesis se halla dividida en diez partes: la primera es una introducción acerca de la amplia gama de fosfolipasas estudiadas hasta ahora y su interacción con algunos receptores; en la segunda parte se hace una descripción de los antecedentes que fueron tomados en cuenta para formular la hipótesis de éste trabajo y diseñar los objetivos del mismo, los cuales comprenden las partes tres y cuatro; en la quinta parte se describen las metodologías usadas para la realización de este trabajo; en la sexta sección se muestran los resultados publicados, los no publicados y la discusión de cada uno de ellos; en la séptima parte se formuló una conclusión de los mismos. En la octava sección se discuten las perspectivas del trabajo. En la novena parte se encuentra la bibliografía y por último el anexo con las publicaciones de los trabajos en los cuales participé.

RESÚMEN

Las fosfolipasas A₂ de tipo secretorio (sFLA₂) son enzimas que catalizan la hidrólisis de el enlace éster de la posición dos de glicerofosfolípidos, son de bajo peso molecular y han sido asociadas con diferentes procesos tóxicos, fisiológicos o patológicos. En el presente trabajo se reporta la caracterización bioquímica y funcional de la fosfolipasa A₂ heterodimérica denominada Phaiodactylipina, purificada del veneno del alacrán *Anuroctonus phaiodactylus*. La Phaiodactylipina tiene un peso molecular de 19,172 u.m.a. y sufre dos eventos de modificación postraduccional: glicosilación y la eliminación de un hexapéptido. La eliminación del hexapéptido genera la separación de la molécula en dos subunidades, una subunidad grande conformada por 108 aminoácidos y una subunidad pequeña de 18 residuos, las cuales permanecen unidas por un puente disulfuro. En la secuencia se encuentran tres sitios putativos de glicosilación, dos en la subunidad grande y una en la subunidad pequeña, la cual fue caracterizada. Esta glicosilación consiste de tres hexosas, dos N-acetilhexosas y dos deoxihexosas. La molécula completa presenta entre el 36% y 50% de identidad con las fosfolipasas: Imperatoxina I y Fosfolipina. Con las otras fosfolipasas del grupo III, conserva alrededor del 28% de identidad.

La Phaiodactylipina es expresada por un solo RNA mensajero. La secuencia del gene que codifica para dicha enzima tiene una longitud de 769 pares de bases (pb), de los cuales 99 pb pertenecen a la región 5' no traducida y 196 pb a la región 3' no codificante. El péptido señal putativo esta codificado por 75 pb y la región madura por 399 pb, que codifican para la subunidad grande, la subunidad pequeña y el hexapéptido de la posición de aminoácidos 109 a 114 que es removido durante la maduración. La estructuración exon/intrón del gene que codifica para la Phaiodactylipina se halla conformada por cuatro exones y tres intrones. El tercer intrón separa la subunidad pequeña de la subunidad grande. El gene es similar al gene de la fosfolipasa de abeja. Sin embargo, es diferente a la estructuración genómica de las fosfolipasas del grupo I, II y XII.

La enzima presenta una actividad específica de 172 U/mg, su actividad depende de Ca²⁺ a concentración mM, pH 8.0 y de la temperatura a 37°C. Presenta preferencia lipídica por fosfolípidos que en la posición sn-2 tienen ácido araquidónico de manera similar a la Imperatoxina I, con respecto al grupo de la posición 3 prefiere PC>PE>PS. La Phaiodactylipina no es tóxica a concentraciones de 20 µg/20 g de ratón cuando es inyectada intraperitonealmente, pero cuando se inyecta de forma intramuscular causa edema sin provocar daño celular, presenta actividad hemolítica directa sobre eritrocitos humanos, y retarda la coagulación por minutos al ser adicionada a preparaciones plaquetarias de suero humano. La Phaiodactylipina es letal para insectos y crustáceos a dosis de 5µg y 3µg por animal respectivamente. El péptido sintético de la subunidad pequeña es tóxico para grillo o cochinilla a concentraciones de 25 µg/g por animal.

SUMMARY

Secreted phospholipases A₂ (sPLA₂) are structurally related enzymes that catalyze the hydrolysis of the sn-2 acyl bond of glycerophospholipids. They have been associated with several toxic, physiological or pathological processes. In this thesis, the biochemical and functional characterization of the heterodimeric phospholipase A₂ purified from the *Anuroctonus phaiodactylus* venom, denominated as Phaiodactylipin are reported. Its molecular mass is 19,172 atomic mass units and it undergoes two events of postraductional modification: glycosilation and the removal of an internal hexapeptide. The removal of a hexapeptide gives rise the formation of heterodimeric structure formed by the large subunit formed by 108 amino acids residues and the small subunit of 18 residues, linked by a disulfide bridge. The sequence displays three putative sites of glycosylation, two situated in the large subunit and one in the small subunit region, which was determined. This glycosilation consist of three hexoses, two N-acetyl hexoses and two deoxyhexoses. The complete molecule presents 36% to 50% identity with the phospholipases Imperatoxin I and Phospholipin, respectively. Compared with the others phospholipases of group III, it conserves less than 28% identity.

The Phaiodactylipin is expressed from a single messenger containing 769 base pairs (bp) that comprise 99 bp of the region 5' and 196 bp of the non-codificant region. The putative signal peptide is codified by 75 bp and the mature region by 399 bp, that comprise the large and small subunit, and the hexapeptide corresponding at amino acids 109 to 114, that is eliminated during maturation. The genomic structure exon/intron that codifies for Phaiodactylipin is formed by four exons and three introns. The third intron separates the small subunit to the large subunit. The structure of the gene conserves homology with the genomic gene of the bee phospholipase. Nevertheless, it is different from genomic structure of phospholipases from groups I, II and XII.

The specific activity of the enzyme is 172 U/mg. The activity is calcium dependent at mM concentration, the optimum pH for activity is close to pH 8.0, and at 37°C the activity is maximal. The lipidic preference of the enzyme was higher when the position sn-2 is occupied by arachidonic acid, in a similar way of Imperatoxin I, with respect to the group of position three it prefers PC>PE>PS.

Phaiodactylipin is not toxic to mammals using doses up to 20 µg/20 g mouse body weight when is injected intraperitoneally, but when is injected intramuscular, causes edema without cellular damage. It has hemolytic effect in human erythrocytes and slows down the coagulation per minutes. Phaiodactylipin is lethal to insects and crustaceans at doses of 5 µg and 3 µg by animal respectively. Also the synthetic peptide of the small subunit is toxic to crickets and crustaceans at doses of 25 µg/g.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES

Los alacranes son artrópodos quelicerados, miembros de la clase Arácnida, de los que se conocen fósiles correspondientes al periodo Silúrico, con una antigüedad aproximada de 365 millones de años. Los alacranes que conocemos actualmente han variado poco desde entonces con respecto a su morfología y costumbres (Sissom, W. D, 1990). El modesto grupo de alacranes conocido hasta ahora comprende 1259 especies, las cuales se hayan agrupadas en 9 familias (Fig. 1) y 155 géneros (Fet y cols., 2000). Los alacranes se encuentran distribuidos entre los 52° latitud Norte y 42° latitud Sur de nuestro planeta (Sissom, W. D, 1990). La sobrevivencia de los alacranes y su amplia distribución indica que éstos animales han mantenido una evolución exitosa principalmente en su veneno que es su arma principal, el cual les ha permitido defenderse de predadores y obtener sus presas para sobrevivir en los difíciles ambientes terrestres. En particular, en la región de Baja California (México), y California (USA), que es una zona de constante especiación, se han descrito 4 familias de alacranes, divididas en 11 géneros, 61 especies y 12 subespecies (Williams, 1980), entre las cuales se halla la familia Iuridae (Fig. 1) que comprende la especie *Anuroctonus phaiodactylus*. El veneno de ésta especie de alacranes fue la fuente biológica para el estudio descrito en ésta tesis.

En los últimos 40 años numerosos estudios acerca de la bioquímica, biología molecular y evolución de los componentes activos que se hallan en el veneno de los alacranes, han permitido encontrar herramientas nuevas en el estudio de enfermedades, descripción de diferentes moléculas, determinación de los blancos de sus venenos y evolución de los mismos, así como avances en la forma de tratamiento de la picadura y el desarrollo de nuevos sueros. Cada especie de alacrán presenta en su veneno distintos componentes moleculares como péptidos tóxicos, fosfolipasas, hialuronidasas, proteasas, mucoproteínas, lípidos, nucleótidos, sales y otros componentes aún desconocidos (Zlotkin, E.,y cols. 1978; Possani, L.,1983). Los componentes del veneno mejor conocidos son los polipéptidos tóxicos que reconocen canales iónicos como: canales de sodio

(Caterall, 1980), potasio (Carbone, E., y cols., 1982) cloro (DeBin, J., y cols., 1993) y calcio (Chuang, R. S., 1998; Olamendi, T., y cols., 2002). Dichas moléculas principalmente han sido caracterizadas a partir de venenos provenientes de especies pertenecientes a la familia Buthidae.

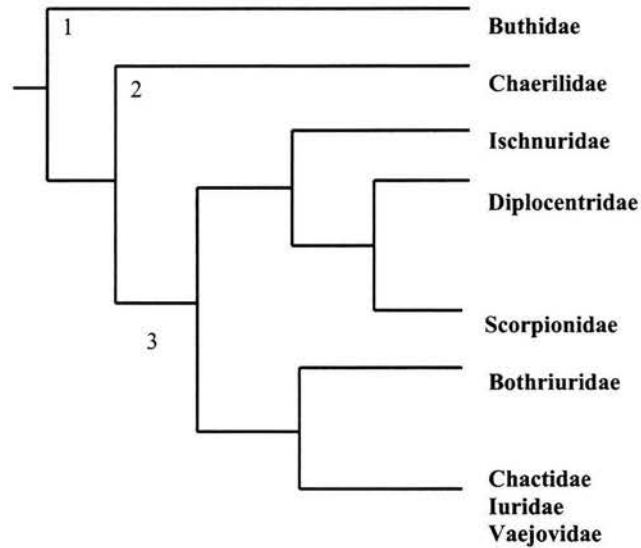


Figura 1. Cladograma de familias de alacranes (propuesto por Fet et al., 2000). Estudio sistemático basado en el análisis de DNA, en el cual se hipotetizan las diferentes ramas evolutivas de las familias de alacranes. 1, buthidos, 2, chaerilidos, 3, diplocentroides.

1.2 FOSFOLIPASAS

Las fosfolipasas son enzimas ubicuas pertenecientes al grupo de las esterases, que actúan sobre los enlaces éster de los fosfolípidos, generando ácidos grasos libres. Las fosfolipasas según su sitio específico de corte se dividen en A₁, A₂, B, C y D (Fig. 2) (Rosenberg, 1990).

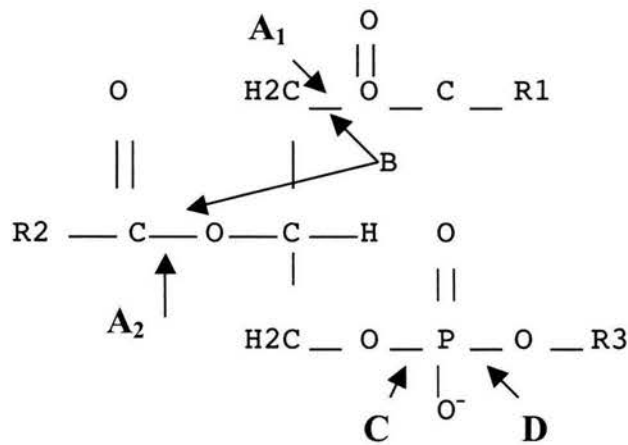


Figura 2. Corte específico de las fosfolipasas A₁, A₂, B, C y D.

1.2.1 Fosfolipasas A₂ (FLA₂)

La superfamilia de fosfolipasas A₂ (E.C.3.1.1.4) consiste de un gran número de enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza. Las FLA₂ catalizan la hidrólisis del enlace acil-éster de la posición 2 de un fosfoglicérido (revisado por Six and Dennis, 2000). Los productos liberados por la hidrólisis son ácidos grasos y lisofosfolípidos (revisado por Van Deenen y Den Hass, 1963) los cuales tienen importantes funciones biológicas.

1.2.2 Clasificación de las fosfolipasas A₂

En las últimas 2 décadas se han caracterizado cinco distintas formas de FLA₂: secretorias (sFLA₂) o de bajo peso molecular, citosólicas (cFLA₂) o de alto peso molecular, fosfolipasas independientes de calcio (iFLA₂), acilhidrolasas que catalizan específicamente el factor activador de plaquetas (PAF) (Dennis, E., 1997) y fosfolipasas lisosomales (Hiraoka, M. y cols., 2002). Hasta ahora se han descrito 13 grupos diferentes los cuales guardan más del 30% de identidad. Esto se requiere para definir las dentro de un mismo grupo. Dichas enzimas participan en los procesos de transducción de señales, remodelación de membranas, digestión, síntesis de eucosanoides, en el mecanismo de defensa en infecciones, proliferación celular, apoptosis y oncogénesis (Six y Dennis, 2000; Capper E.A., 2001). Sin embargo, las funciones biológicas de algunas de ellas aún son desconocidas.

Las FLA₂ se han clasificado según su patrón de cisteínas, peso molecular, secuencia de aminoácidos, dependencia de calcio y localización celular (Dennis, 1997, Valentin y Lambeau, 2000). El reciente aumento de reportes sobre las características bioquímicas y estructurales de las FLA₂ exige ampliar la categorización (Six y Dennis, 2000, Rouault M., 2003, Cnaan, y cols., 2004 (Tabla 1).

Los criterios propuestos para clasificar las fosfolipasas dentro de estos 13 grupos son: 1) la enzima debe catalizar el enlace éster de la posición 2 de un fosfolípido. 2) La secuencia de aminoácidos

debe ser completamente caracterizada. 3) Las secuencias deben mostrar un alto grado de homología debiendo conservar más del 30% de identidad. Los parálogos deben ser clasificados en subgrupos. Los homólogos de diferentes especies deben ser clasificados en el mismo subgrupo según Six y Dennis (2000).

Tabla 1. Clasificación de fosfolipasas A₂ (Six D.A., y Dennis, E.A., 2000).

Grupo		Fuente	Localización S/C	Tamaño (KDa)	Ca ²⁺ Conc.	Disulfuros	Función	Aminoácidos conservados en el sitio catalítico
I	A	Cobras	S	13-15	MM	7	Nerótóxicas, mitoóxicas, hemolíticas, anticoagulantes	His-Asp
	B	Páncreas humano/porcino	S	13-15	MM	7	Digestión	His-Asp
II	A	Víbora de cascabel, líquido sinovial, plaquetas	S	13-15	MM	7	Artritis, inflamación, choque séptico, colitis ulcerativa, tumorigénesis, bactericida	His-Asp
	B	Víbora de Gabón	S	13-15	mM	6	Neurotóxicas, citolíticas	His-Asp
	C	Testículos de ratón	S	15	mM	8	Espermatogénesis	His-Asp
	D	Páncreas, timo, pulmón	S	14.2		7	ND	His-Asp
	E	Utero, tiroides, testículo	S	14.4		7	ND	Hist-Asp
	F	Embrión, testículo	S	16.8		15	ND	Hist-Asp
III	A	Abejas y lagartos	S	16	mM	5	Miotóxica y neurotóxica	His Asp
		Alacrán <i>Pandinus imperator</i>	S	16		5	ND	His-Asp
HGIII		Riñón, corazón e hígado	S		μM	10	ND	His-Asp
IV		Hígado de ratón, plaquetas	C	85	μM		ND	Ser 228 Arg200 y Asp549, Ser 505
V		Corazón, pulmón de Humano, rata y ratón, macrófagos	S	14	M	6	Participa en periodos de inflamación	His-Asp
VI		Macrófagos	C	80-85	No		ND	GlyXSerXGly
VII		Plasma humano	S	45	No		ND	GlyXSerXGly, Ser 273, Asp296, His 351
VIII		Plasma humano	C	104	No		ND	
IX		Caracol marino	S				ND	His-Asp
X		Humano y ratón	S	14	mM		Participa en la respuesta del sistema inmune, inflamación.	ND
XI		Arroz	S	12			ND	ND
XII		Humano, <i>Drosophila melanogaster</i>	S				No es catalítica, ND	ND
XIII		Virus	S	14		Ninguno	Infección de la célula hospedera	His-Asp

S, secretoria; C, citosólica, N.D. no determinado

1.2.3 Estructura general de las fosfolipasas A₂ de bajo peso molecular

La diversidad molecular de fosfolipasas A₂ de bajo peso molecular es grande; hasta ahora se conocen mas de 170 fosfolipasas de las cuales se han determinado más de 20 estructuras tridimensionales. La mayoría presenta entre 120 a 145 aminoácidos y contiene de 5 a 7 puentes disulfuro, los que definen un plegamiento bien conocido. Todas las fosfolipasas A₂ de bajo peso molecular presentan un sitio de unión a calcio (en la región amino terminal) y un sitio catalítico bien conservado (entre los amino ácidos 30 a 52). El plegamiento general de las fosfolipasas consiste en tres hélices alfa bien definidas, en las cuales se hallan embebidos los residuos catalíticos y los residuos encargados de unir al ión calcio. Entre la segunda y la tercera hélice alfa se halla una hoja beta conocida como ala-β (Arni et al., 1995).

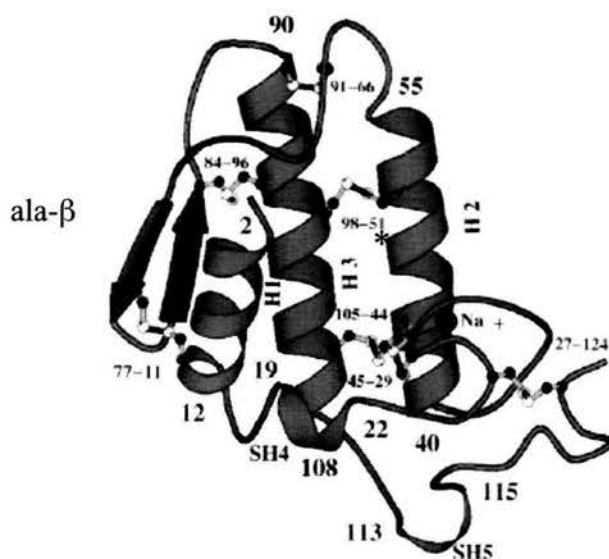


Figura 3. Diagrama en listones de la fosfolipasa KPLA₂ (*Bungarus caeruleus*). Las tres hélices se indican como H1, H2 y H3 y las hélices cortas se muestran como SH4 y SH5. El ala-β y los puentes disulfuros también son mostrados. El sitio de unión a calcio se halla ocupado por el ión sodio. El sitio catalítico se halla marcado con un asterisco (*) (Singh y cols., 2000).

1.2.4 Fosfolipasas A₂ endógenas de mamífero de bajo peso molecular

La primera enzima A₂ caracterizada fue la FLA₂ pancreática. Dicha enzima fue purificada de páncreas de mamífero y posteriormente se aisló de otros tejidos como: pulmones, riñones, hígado,

ovarios y próstata, la cual fue clasificada en el grupo IB. Este grupo de fosfolipasas se ha involucrado directamente con la digestión, sin embargo su amplia distribución sugiere funciones adicionales (Tischfield, J., 1997). Las fosfolipasas pertenecientes al grupo IIA se encuentran relacionadas con la inflamación. Estas FLA₂s son expresadas en diferentes tejidos de pacientes con artritis reumatoide, choque séptico, colitis ulcerativa (Murakami, M., y cols., 1997), cáncer en órganos digestivos y después de la isquemia de varios tejidos, incluyendo el cerebro (Lauritzen, y cols., 1994, Leugen, y cols, 2002). Las fosfolipasas A₂ de este grupo son activadas en respuesta a hormonas, factores de crecimiento o agonistas relacionados con un gran número de tipos celulares. Los inductores de su expresión son citocinas proinflamatorias como la interleucina IL-1a, IL-1b, el factor de necrosis tumoral y endotoxinas como lipopolisacáridos (LPS). Por otro lado existen citocinas antiinflamatorias y factores de crecimiento como el factor de crecimiento semejante a insulina, que suprimen la inducción de las fosfolipasas de éste grupo (Murakami, M., y cols., 1997; Jacques, C., y cols., 1997). Todos estos datos indican entonces la gran participación de estas fosfolipasas en la patogénesis y en la progresión de la inflamación (Capper, E., y Marshall, L., 2001). El ácido araquidónico es el ácido graso más comúnmente liberado por la catálisis, el cual es usado en la síntesis de eicosanoides (prostaglandinas, troboxanos y leucotrienos), los cuales modulan la contracción muscular y la respuesta inflamatoria (Kishino, J., y cols., 1994; Ohara, O., y cols., 1995; Capper, E., y Marshall, L., 2001).

Las fosfolipasas IIA además se relacionan con la destrucción de bacterias gram negativo (*E. coli*) y su deficiencia causa alteraciones en la respuesta a la infección (Harwig, S., y cols., 1995). En 1997 se demostró que la deficiencia de este tipo de fosfolipasas IIA provoca el incremento de tumores en ratones propensos y su sobreexpresión genera resistencia (Cormier, R., y cols., 1997). De igual forma se comprobó que su expresión en humanos se correlaciona con la sobrevida en personas con cáncer gástrico, así como el arresto en las etapas primarias del cáncer (Leung, S., 2002). Las fosfolipasas correspondientes a los grupos IIC, IIE y IID, fueron clonadas a partir de tejido de rata y ratón. La fosfolipasa clasificada en el grupo IIC parece corresponder a un pseudo gene humano,

el cual es expresado de manera importante en testículos de rodente y se ha propuesto que tiene una función específica en la espermatogénesis (Chen, J., y cols., 1997). La fosfolipasa perteneciente al grupo V se expresa de manera importante en el corazón, pulmón, y placenta. Además es expresada por células inflamatorias como mastocitos y macrófagos, proponiéndose que juega un importante papel en la inflamación (Balboa, M., y cols., 1996). La fosfolipasa del grupo X se expresa en riñón, timo y leucocitos periféricos; se conoce que participa en la respuesta del sistema inmune en contra de infecciones o en la inflamación (Cupillard, L., y cols., 1997).

La fosfolipasa hGIII fue caracterizada en el año 2000 (Valentin, E., y cols., 2000). El hallazgo de la secuencia codificante de esta enzima fue relevante, ya que anteriormente no había sido caracterizada ninguna fosfolipasa de mamífero que presentara similitud con fosfolipasas de grupo III. Las fosfolipasas clasificadas en el grupo III solo habían sido obtenidas a partir de veneno de abeja, avispa, monstruo de Gila y alacrán. La secuencia encontrada, codifica para un propéptido de 19 residuos, seguidos de 490 aminoácidos, en la parte central del gene existe una región que codifica para una proteína con el 43 y 46% de homología con las fosfolipasas purificadas del veneno del monstruo de Gila. Este dominio incluye 10 cisteínas y un péptido idéntico al encontrado en la IpTxI que es eliminado postranscripcionalmente (Zamudio, F., y cols., 1997). El gene consta de 7 exones y mapea en el cromosoma 22q. El transcrito de éste gene fue hallado en riñón, corazón, hígado y músculo esquelético. La fosfolipasa hGIII es calcio dependiente, prefiere fosfatidilglicerol sobre fosfatidilcolina y su actividad óptima se presenta a pH 8.0. El hallazgo de esta fosfolipasa enmarca una pregunta importante: ¿Cuál es su función biológica? La pregunta surge debido a que su distribución no parece redundante con respecto a las fosfolipasas endógenas de tipo I y IIA, V y X (Valentin, E., y cols., 2000) lo que sustenta el estudio bioquímico y caracterización de la función de las fosfolipasas del grupo III.

1.2.5 Fosfolipasas A₂ de bajo peso molecular purificadas de venenos (vFLA₂)

Los animales venenosos además de contener toxinas, pueden presentar una variedad de vFLA₂, que participan en la digestión de la presa y la toxicidad del veneno. Hasta ahora alrededor de 150 vFLA₂ han sido caracterizadas (Valentin y Lambeau, 2000), las cuales se presentan en diversas formas como monómeros, homomultímeros, (Valentin y Lambeau, 2000), heteromultímeros (Possani, y cols., 1992) o heterodímeros (Valentin y Lambeau, 2000). Dichas fosfolipasas se han clasificado en los grupos IA, IIA, IIB, IIIA, III y IX de acuerdo a sus características moleculares.

Las vFLA₂ varían considerablemente en cuanto a estructura primaria y cuaternaria, así como en su toxicidad y actividad enzimática. Independientemente de la actividad enzimática de las fosfolipasas, algunas de ellas ejercen una amplia gama de efectos deletéreos (Valentin y Lambeau, 2000), proponiéndose que las vFLA₂ se unen de forma selectiva en sitios específicos (Lambeau, y Lazdunski, 1999). Durante la evolución, las fosfolipasas han adquirido una gran variedad de actividades fisiológicas y farmacológicas. El conocimiento de diversas secuencias y estructuras ha permitido proponer algunos sitios involucrados en diferentes efectos farmacológicos. Sin embargo, la relación entre la conformación y la letalidad aún no ha sido completamente definida (Singh G., y cols., 2001). Singh, propuso un análisis estructural con el cual dilucida algunas de las regiones de la molécula que participan en los tan variados efectos farmacológicos. Dichas regiones se encuentran localizadas en las asas de la molécula, como se aprecia en la figura 3. Este estudio fue realizado solo con estructuras de FLA₂ de los grupo I y II purificadas de serpiente.

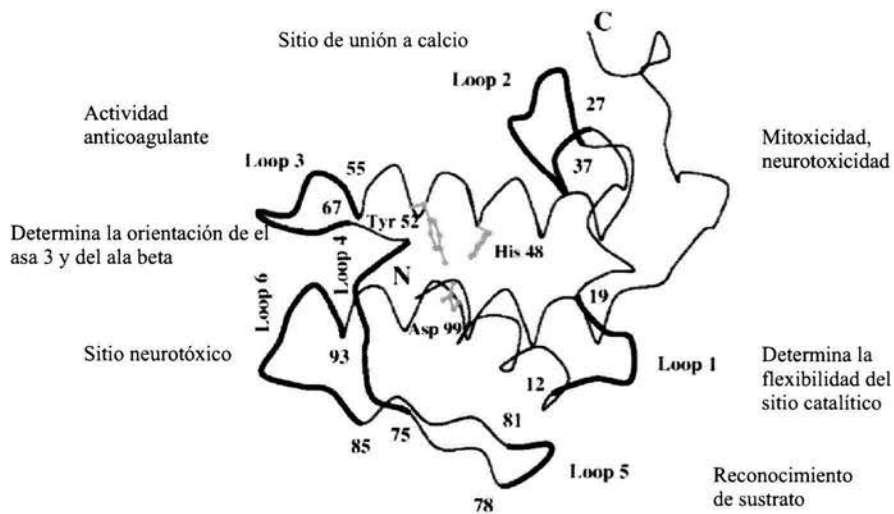


Figura 4. Sitios farmacológicos propuestos por Singh y cols., 2001. Las asas se presentan marcadas en rojo y sus diferentes funciones están marcadas en cada uno de ellos. (Figura tomada de Singh, G., y cols., 2001).

Las enzimas clasificadas en el grupo I han sido separadas del veneno de serpientes de las familias Elapidae e Hydrophidae; la clase II está presente en veneno de las serpientes de las familias Crotalidae y Viperidae. Los miembros del primer grupo poseen un puente disulfuro entre las cadenas laterales, conformado por la cisteína 11 y la 80. Las enzimas correspondientes al segundo grupo presentan una extensión de 5 a 7 residuos de aminoácidos en la región C-terminal, la cual establece un puente disulfuro con la cisteína de la posición 50. Los otros seis puentes disulfuro son conservados en ambos grupos.

En los últimos años se han caracterizado fosfolipasas monoméricas y heterodiméricas con actividad neurotóxica, que actúan a nivel presináptico o postsináptico (Harris, J., y cols., 1973; Bon, C., y cols., 1979; Chang, C., 1985; Delot, E., y Bon, C., 1993). Algunas de estas moléculas han sido modificadas químicamente en el sitio catalítico para eliminar las posibilidad de que dicho efecto dependa de la catálisis. Sin embargo se ha encontrado que éste tratamiento disminuye el efecto neurotóxico entre un 40 a un 60% (Tang, L., y cols., 1998). Por otro lado, ejemplos de fosfolipasas monoméricas, inactivas enzimáticamente ya que carecen de la histidina que conforma la diada

catalítica (H48K), son capaces de provocar efecto mitotóxico (Francis, B., y cols., 1991 Gutiérrez, J., y Lomonte, B., 1995). Dentro de las vFLA₂'s heterodiméricas u oligoméricas tóxicas se han reportado cuatro: la β -bungarotoxina, Crotoxina, taipoxina y taicatoxina, las cuales causan efectos neurotóxicos de manera específica a nivel presináptico y postsináptico respectivamente (Chang, G., y cols., 1973; Bon, C., y cols., 1979; Lind, P., y Eaker, D., 1982; Possani, L., y cols., 1992).

Las fosfolipasas purificadas del veneno de abeja, avispas, monstruo de Gila y del alacrán *Pandinus imperator* fueron clasificadas en el grupo III por sus características moleculares diferentes a las fosfolipasas del los grupos I y II (Lambeau, G., y Lazdunski, M., 1999). La fosfolipasa de abeja ha sido una de las fosfolipasas más estudiadas debido a que sus características moleculares en cuanto a secuencia, estructura y función son diferentes a las fosfolipasas de los grupos I y II. En 1990, la estructura tridimensional de ésta enzima fue descrita (Scott, D., y cols., 1990). Se encontró que los sitios de unión a calcio (X-Cys-Gly-X-Gly) y el catalítico se encuentran conservados pero recorridos hacia la región amino terminal. La histidina del sitio catalítico corresponde a la posición 34 y no la posición 48 de las fosfolipasas del grupo I y II. El canal hidrofóbico en donde se lleva a cabo la catálisis presenta una conformación igual que a las fosfolipasas del grupo I y II. Esta enzima se encuentra glicosilada en una sola posición con al menos 16 isoformas de carbohidrato (Chien-Chan, L., y Guor-Rong, H., 2002), la forma no glicosilada también se encuentra en el veneno (Scott, 1990). La fosfolipasa A₂ de abeja tiene efecto mitotóxico (Ownby, c., y cols., 1997), neurotóxico (Rodríguez de Truco y cols., 2002), e inhibe el desarrollo del parásito de la malaria (Moreira, L., et al., 2002). Además de estos efectos, también presenta una potente actividad anti-HIV bloqueando la entrada del virus en leucocitos (Fernard, D., 1999; 2001). Las fosfolipasas heterodiméricas aisladas del veneno del alacrán *Pandinus imperator* denominadas Imperatoxina I (Zamudio, F., y cols., 1997) y Fosfolipina (Conde, R., y cols., 1999) también fueron agrupadas en el grupo III. Estas presentan características moleculares diferentes a las encontradas en el veneno de serpientes, lagartos, insectos y caracoles (tabla 1). En 1995, la enzima Conodipine-M aislada del caracol marino *Conus magus* fue caracterizada y clasificada en el grupo IX (McIntosh et al., 1995).

1.2.6 Receptores para fosfolipasas A₂ de bajo peso molecular

Las vFLA2 han servido en el estudio y caracterización de las fosfolipasas endógenas de mamífero, así como para el estudio de su función y de sus receptores. Entre los años 1989 a 1991, los receptores de fosfolipasas denominados N y M fueron caracterizados por el grupo de Lazdunski (Lambeau, y cols., 1989, 1990 y 1991), usando como ligandos las fosfolipasas purificadas de diferentes venenos de serpiente y abeja. Se demostró que las fosfolipasas caracterizadas de dichos venenos se unen con alta afinidad a los receptores, los cuales están relacionados con la toxicidad de las fosfolipasas A₂ secretorias (Lambeau, G., y Lazdunski, M., 1999). El hallazgo de estos sugiere entonces la importancia del estudio bioquímico y la caracterización de ligandos que permitan profundizar el conocimiento tanto de su topología como de su funcionalidad. Obsérvese que muchos de éstos todavía no han sido completamente descritos. Las fosfolipasas de mamíferos IIA, V y X son los ligandos endógenos del receptor de tipo M, compartiendo esta afinidad con fosfolipasas purificadas del veneno de serpientes (Lambeau, G., y cols., 1989; Lambeau, G., y Lazdunski, M., 1999; Cupillard, L., y cols., 1999).

A pesar de que la búsqueda de ligandos endógenos para el receptor de tipo N ha sido exhaustiva, solo la fosfolipasa purificada del veneno de abeja lo reconoce con alta afinidad, a diferencia de las fosfolipasas A₂ del tipo I y II (Tabla 2) (Lambeau, G., y Lazdunski, M., 1999). Datos recientes apuntan a que el efecto neurotóxico de esta fosfolipasa se debe al reconocimiento de dicho receptor (Lambeau y cols., 1989, Kolko, M., y cols., 1996; Rodríguez de Turco y cols., 2002). Estos hallazgos validan la relevancia del estudio de fosfolipasas tipo III, las cuales están altamente relacionadas en cuanto a secuencia primaria. Además de los receptores N y M se han caracterizados otros receptores como: R180, PLA2R, NPR y TCBP-49. Los receptores R180 y PLA2R son similares al receptor tipo M, presentan el mismo peso molecular. El receptor NPR y TCBP-49 son atípicos en cuanto a peso molecular pero son reconocidos con alta afinidad por la fosfolipasa Taipoxina. El canal de potasio tipo T dependiente de voltaje también participa como receptor de la

subunidad pequeña que conforma la β -bungarotoxina. El receptor R25 reconoce con alta afinidad a la fosfolipasa A₂ Atrotoxin y es el más pequeño que se conoce (Krizaj, I., y Gubensek, F., 2000).

Tabla 2. Características moleculares de los receptores de fosfolipasas A₂.

Propiedades	Receptores							
	N	M	R180	NPR	PLA2R	TCBP-49	Canal iónico K+	R25
Fuentes	Cerebro Corazón Pulmón Riñón	ME Riñón Pulmón Hígado	Cerebro porcino	Cerebro rata	Osteoblastos de ratón	RE ubicuo	Membrana presináptica	Cerebro Membrana Intracelular
Masa Molecular KDa	3 36-51	180	180	65	180	49	~460 heteropolímero	25
Dependencia a Ca²⁺	1 85-88	No	No	No	No	10nM	No	10nM
IC₅₀ = pM	3mM- 2mM							
OS₁	1 500 000	34						
pp-PLA₂	2 000 000	30000	78000					
Taipoxina	68	180	5000	Ki 200nM		100nM		
OS2	6	10	2000					
Crotoxina	9	10	10,000000					
Notexina	190	10000						
Abeja	80	300000						
β-Btxn			10,000000				100nM	
Atrototoxin								10nM

IC50, constante de inhibición 50%; Ki, Constante de inhibición

2 ANTECEDENTES

2.1 Fosfolipasas A₂ heterodiméricas unidas covalentemente

Hasta ahora se han publicado cuatro fosfolipasas heterodiméricas unidas covalentemente, una purificada de la serpiente *Bungarus multicinctus*, una purificada del veneno del caracol *Conus magus* y dos purificadas del veneno del alacrán *Pandinus imperator*.

2.1.1 β -Bungarotoxina

En 1982 se purificó y secuenció la β -bungarotoxina, que fue clasificada en el grupo II. Este es un heterodímero que se compone de una subunidad grande de 120 residuos (azul y verde) y una subunidad pequeña (rojo y amarillo) (Fig. 5) de 61 aminoácidos unidos por un puente disulfuro (Kondo, K., y cols., 1982 a y b). La subunidad pequeña, también conocida como inhibidor de proteasas tipo Kunits, le confiere especificidad ya que bloquea el canal de potasio tipo T sensible a voltaje (Benishin, C., 1990). Dicha subunidad además sirve de guía a la toxina para posicionarla

sobre membranas presinápticas con alta afinidad ($K_d \approx 10 \text{ nM}$), en donde inhibe la liberación de neurotransmisores (Chang, C., y cols. 1973; Benishin, C. 1990) postulándose un importante mecanismo de regulación de la actividad in vivo de la molécula. Existen varias isoformas de β -bungarotoxinas ($\beta 1$ - $\beta 6$) (Kondo, K., y cols., 1982b) y aunque las subunidades de este tipo de fosfolipasa tengan una secuencia altamente parecida a los inhibidores de proteasas tipo Kunits, no presentan dicha actividad (Kondo, K., 1982 a y b).

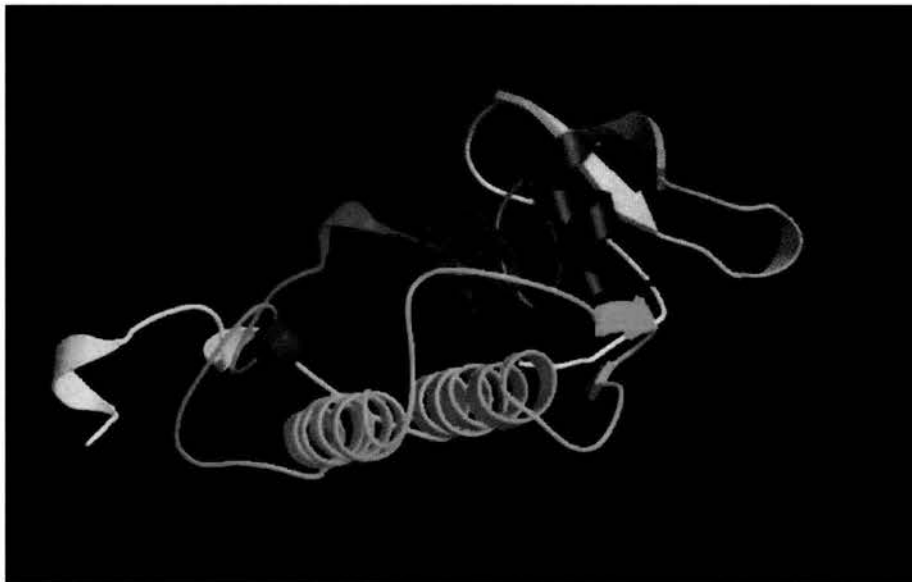


Figura 5. Estructura de la fosfolipasa heterodimérica β -bungarotoxina. En colores azul y verde se muestra la subunidad grande, el ión Ca^{2+} , se presenta como esfera en color azul. La subunidad pequeña se presenta en color rojo y amarillo (1BUN, PDB).

2.1.2 Conodipina-M

En 1995 se publicó una nueva fosfolipasa purificada del veneno del caracol *Conus magus*. Esta fosfolipasa es atípica ya que además de presentar actividad fosfolipásica A_2 , también cataliza la hidrólisis de triglicéridos en la posición 2. La Conodipina-M consiste de dos subunidades (8,571 y 5,036 Da) unidas por un puente disulfuro (McIntosh, y cols., 1995). La subunidad grande presenta actividad de FLA_2 y la pequeña aún no se le ha encontrado función alguna, ni similitud con algún

péptido (McIntosh, y cols., 1995). En 1997 esta fosfolipasa fue clasificada por Dennis en un nuevo grupo denominado IX (Dennis, 1997).

2.1.3 *Imperatoxina I*

En 1997 nuestro grupo reportó la primera fosfolipasa de tipo A₂ purificada del veneno del alacrán *Pandinus imperator*, a la cual se le denominó Imperatoxina I (IpTxI). Dicha proteína consta de dos subunidades, una tiene actividad fosfolipásica de tipo A₂ y es de 104 residuos mientras que la subunidad pequeña es de 27 aminoácidos. La secuencia de FLA₂ presenta alta similitud con las FLAs A₂ del tipo III, mientras que la subunidad pequeña no presentó similitud con ningún péptido reportado. La IpTxI inhibe de forma indirecta el pegado de la ryanodina a su receptor, el cual es un canal de calcio modulado por ligando presente en músculo esquelético. El estudio realizado con la IpTxI concluye que el efecto de inhibición del pegado de ryanodina al canal sucede por la competencia de los ácidos grasos liberados (esencialmente ácido araquidónico) a causa de la actividad de fosfolipásica A₂ (Zamudio, F., y cols., 1997).

2.1.4 *Fosfolipina*

En un trabajo posterior de nuestro grupo, Conde, R. (1999) reportó la purificación de la fosfolipina, separada del veneno del alacrán *Pandinus imperator*. Encontraron que al igual que la IpTxI, presenta dos subunidades (108 y 17aa) que son codificadas por el mismo RNA mensajero, separadas por un pentapéptido que es procesado durante la maduración (Conde, R., y cols., 1999). Esta proteína a diferencia de la IpTxI presentó muy poco efecto o casi nulo, sobre el efecto de inhibición de ryanodina por su receptor (Conde, R., y cols., 1999).

3 **HIPÓTESIS**

A partir del estudio bioquímico de nuevos venenos de alacranes tóxicos para insectos no pertenecientes a la familia Buthidae, podremos caracterizar nuevas moléculas, conocer su función y

la participación que tienen en la interacción con la membrana celular. En especial la búsqueda de moléculas con actividad fosfolipásica en el veneno del alacrán *Anuroctonus phaiodactylus* que pertenece a la familia Iuridae, se torna importante ya que es un alacrán que bioquímicamente jamás ha sido estudiado pero que guarda cercanía filogenética con el alacrán *Pandinus imperator*, cuyo veneno contiene dos fosfolipasas A₂ heterodiméricas que conservan similitud con la fosfolipasa neurotóxica de abeja.

4 OBJETIVO

Global:

Caracterizar bioquímica y funcionalmente ambas subunidades de la fosfolipasa heterodimérica Phaiodactylipina.

Específicos:

1. Determinar la estructura primaria de la enzima Phaiodactylipina.
2. Clonar la fosfolipasa Phaiodactylipina a partir de cDNA.
3. Determinar la actividad específica de la fosfolipasa Phaiodactylipina.
4. Caracterizar la preferencia lipídica de la fosfolipasa Phaiodactylipina.
5. Determinar la actividad farmacológica de esta fosfolipasa.
6. Marcar y probar si la Phaiodactylipina presenta afinidad por algún receptor ubicado en preparaciones de membrana.
7. Sintetizar las subunidades pequeñas, para ser probadas en diferentes preparaciones de membranas y sistemas animales, con el fin de conocer alguna posible actividad funcional.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Obtención del veneno

Los alacranes fueron colectados en Maneadero Baja California. Los alacranes fueron anestesiados con CO₂ y fueron ordeñados por estimulación eléctrica. El veneno se recuperó y centrifugó a 15000

r.p.m. por 10 min. (centrífuga Beckman J2-21 equipada con un rotor JA-20). Posteriormente el sobrenadante fue liofilizado y guardado a -20°C.

5.2 Purificación de la fosfolipasa A₂ Phaiodactylipina

El veneno fue disuelto en acetato de amonio 20 mM y se fraccionó mediante exclusión molecular utilizando una columna (0.9 x 190 cm) Sephadex G-50 medio, (Pharmacia Fine Chemicals). La fracción I, la cual presentó actividad fosfolipásica, fue sometida a una separación por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) en una columna C-18 semipreparativa de fase reversa Vydac usando un gradiente de 0 a 60% de acetonitrilo al 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA), en un aparato Waters 600E equipado con un detector 996 de Millipore (Milford, MA, USA.). Las subfracciones obtenidas a partir de la fracción I y que mostraron actividad fosfolipásica fueron repurificados en una columna C-18 analítica (Novapack de Waters) utilizando el mismo gradiente. La repurificación de la enzima Phaiodactylipina se realizó utilizando la misma columna pero variando el gradiente de 15 a 40% de acetonitrilo 0.1% TFA en 60min.

5.3 Determinación de la estructura primaria de la FLA₂ Phaiodactylipina

La estructura primaria de la proteína fue determinada por secuenciación de aminoácidos por el método de degradación de Edman usando un secuenciador de proteínas automático (LF-3000/Beckman, Palo Alto, CA. USA) y por espectrometría de masas. Para la secuenciación la proteína fue adsorbida en membranas de inmobilón-CD como es descrito por el fabricante. Posteriormente la proteína fue reducida con DTT (Dithiotreitol) y los componentes separados por CLAR con un gradiente de 0 a 60% de acetonitrilo 0.1% TFA, en 60 min. De esta separación se obtuvieron dos componentes, uno de los cuales fue la subunidad pequeña de la molécula la cual fue secuenciada de forma directa hasta el aminoácido 14. La proteína además fue digerida con las enzimas Lisina-C (Lys-C), Endopeptidasa V8, y Arginina-C (Arg-C) (Behering, USA). Cada proteólisis fue llevada a cabo por separado usando los amortiguadores correspondientes para cada

enzima. Las incubaciones se realizaron por periodos de 12 horas a 25°C. Los fragmentos obtenidos de cada digestión fueron separados por CLAR con el protocolo ya descrito. Los segmentos restantes de la proteína fueron obtenidos mediante una digestión con Tripsina (Promega, WI, USA). El producto de la digestión fue aplicado directamente en una columna C18 capilar (100 x 0.5 mm, Vydac) utilizando un gradiente de 0% de ácido acético a 60% de acetonitrilo que contenía 0.1% de ácido acético en 60 minutos. Dicha separación resolvió diferentes pesos moleculares de fragmentos que dilucidaron las regiones faltantes de la secuencia y los cuales empalmaron con los aminoácidos deducidos a partir de la secuencia nucleotídica. Algunos de los componentes separados fueron secuenciados por espectroscopía de masas, utilizando la técnica de fragmentación MS/MS. Las secuencias obtenidas por MS/MS fueron analizadas manualmente y automáticamente con el software SEQUEST y la deconvolución fue realizada utilizando el software Xcalibur.

5.4 Determinación del peso molecular de la enzima Phaiodactylipina

El peso molecular de la Phaiodactylipina fue determinada por espectrometría de masas MALDI - TOF, utilizando el equipo: Voyager-DE PRO MALDI-TOF Workstation (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), por el Dr. Brian Martin del NIH de Bethesda, en Maryland USA. El peso molecular de la subunidad pequeña fue analizado por espectrometría de masas por ES (MS/MS).

5.5 Determinación de la glicosilación de la subunidad pequeña

El carbohidrato unido a la subunidad pequeña fue determinado por espectrometría de masas, usando un aparato ESI/MS. La proteína completa fue separada por cromatografía en gel y posteriormente fue digerida con tripsina (Promega, Madison, WI). Los productos fueron reconstituidos en 500 picomoles de *circa* en 5 µl de agua con el 1% de ácido acético, y fueron directamente aplicados en un sistema de cromatografía líquida que se encuentra acoplado a la trampa de iones (LCQ^{DUO}) del espectrómetro de masas, de Finnigan (San José, CA) siguiendo el protocolo descrito por Batista, y cols., (2002).

5.6 Ensayos de actividad fosfolipásica y determinación de actividad A_2

La identificación rápida de actividad fosfolipásica se realizó en base a la técnica descrita Haberman y Hardt (1972), el cual consiste en utilizar fosfolípidos de la yema de huevo de gallina en medio sólido de agarosa al 0.3%. Los experimentos se hicieron en presencia de 10 mM de calcio.

La especificidad de corte tipo A_2 , se verificó usando fosfolípidos marcados radioactivamente, conforme al método descrito por Opperdooes y cols., 1987. Se utilizó L-1,2-dipalmitoil-[14 C]-sn-2-palmitoyl fosfatidilcolina a una concentración final de 27 nM en un volumen final de 20 μ l, con una concentración específica de 1800 μ Ci/mole. El sustrato fue incubado con 1 μ g de fosfolipasa pura en presencia de 10 mM de Tris-HCl a pH 8.0, y 0.04% de Tritón X-100. La reacción fue incubada 37°C, y los tiempos de incubación fueron variables. En diferentes intervalos de tiempo la reacción fue detenida con 25 μ l de TFA al 5% en butanol, ácido linoleico (1 mg/ml) y lisofosfolípidos (1 mg/ml). La reacción fue aplicada en placa fina de sílica (Whatman de borosilicato, 10 por 10 cm) para ser separados usando disolventes para lípidos polares (cloroformo-metanol-ácido acético- agua, 170:40:16:8). Una vez que los productos migraron en la placa se dejó secar y se sometió a una cámara de yodo, lo que reveló las manchas lipídicas. Las manchas amarillas se rasparon y colectaron en viales de borosilicato de 20 ml y se adicionó líquido de centelleo (2-5-difeniloxzole PPO, 6% en tolueno). La cuantificación se realizó en un espectrómetro de centelleo (Beckman Ins. Inc. Modelo LS9800 Irvine, Cal. USA).

La actividad de la enzima Phaiodactylipina se probó con el método de titulación descrito por Shiloah y cols., 1973. Se utilizó yema de huevo diluida 1:20 en una solución salina como sustrato. La liberación de ácido graso fue medido a pH 7.5 y 37°C, titulando con NaOH 10 mM, bajo un flujo constante de N_2 . Una unidad de enzima se definió como la cantidad de enzima que libera 1mmol de ácido graso por minuto bajo las condiciones descritas.

La preferencia lipídica de la Phaiodactylipina fue determinada mediante el uso del método colorimétrico descrito por Lobo de Araujo y Radvanyi (1987). En este microensayo se utiliza una

solución de 0.055 mM de rojo de fenol pH 7.6, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ y 3.5 mM de diferentes sustratos solubilizados con 7 mM de Tritón X-100 y 2 microgramos de enzima por cada ensayo. Los sustratos utilizados fueron: 1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, 1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-Serine], 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine], 1,2 diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine]. La reacción se llevó a cabo en micropozos en un volumen de 1ml y fueron incubados a 25°C bajo flujo de nitrógeno. La reacción ácido base se corroboró con la variación de absorbancia, leyendo a 558 nm. La actividad enzimática se expresa como la disminución de la absorbancia por minuto y por mg de fosfolipasa.

*5.7 Determinación de las condiciones óptimas de actividad de la fosfolipasa *Phaiodactylipina**

La determinación del pH óptimo de actividad de la fosfolipasa se realizó con diferentes amortiguadores: 100 mM de acetato de sodio pH 5.0, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 y 100 mM de glicina – HCl, pH 10.0. La actividad de la enzima fue medida a 37°C en 10 mM de CaCl₂, 7 mM de Tritón X-100, en un volumen de 250 µl, que contienen 3.5 mM de 1-esteroyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-fosfatidilcolina, como sustrato. La neutralización de la liberación de ácido graso fue hecha con NaOH 50 mM. Para determinar la dependencia de calcio de la enzima, se usaron diferentes cantidades de CaCl₂ (0.1 mM hasta 10.0 mM) siguiendo el protocolo descrito por Shiloah y cols., (1973).

5.8 Ensayos de Letalidad

La *Phaiodactylipina* fue ensayada en diferentes modelos animales, mamíferos (ratones), insectos (grillos) y crustáceos (cochinillas). La *Phaiodactylipina* fue inyectada en concentraciones mayores de 20 µg por 20 g de ratón, y ésta inyección no causó ningún efecto. Insectos (*Achaeta spp*) y

crustáceos (*Armadillidium vulgare*) fueron inyectados con 5 µg de enzima. Cuatro grillos fueron inyectados en el penúltimo segmento de la región posterior, cercano a las patas. Ocho cochinillas fueron inyectadas en la región blanda de los interdígitos. Dos grillos y dos cochinillas fueron inyectados con 3 µl de PBS como controles y este no causó ningún efecto.

5.9 Prueba de actividad hemolítica

La actividad hemolítica de la Phaiodactylipina fue determinada basándonos en el protocolo descrito por Condrea E. y cols (1981a), utilizando eritrocitos humanos, frescos. De igual forma ensayamos la actividad hemolítica directa de la fosfolipasa IpTxI.

Para preparar el ensayo, la sangre se lavó tres veces con amortiguador salino de fosfatos (PBS), a pH 7.4; cada vez se centrifugó por 15 minutos a 900 x g. Se hizo una suspensión al 0.5% con PBS. Se incubaron 195 µl de esta suspensión en microplacas de ensayo de 96 pozos con 1 µg de enzima en 5 µl de solución amortiguadora. Se utilizó como control positivo (100% de lisis) una solución al 1% del detergente Tritón X-100. El porcentaje de hemólisis fue determinado midiendo a 540 nm la cantidad de hemoglobina liberada de los eritrocitos en suspensión en presencia de diferentes concentraciones de enzima.

5.10 Prueba de actividad anticoagulante

La actividad anticoagulante de la enzima fue ensayada sobre plasma rico en plaquetas (PRP) y pobre en plaquetas (PPP). Las plaquetas fueron obtenidas por centrifugación como es descrito por Condrea y cols., (1981). Las alícuotas de plasma se incubaron a 37°C adicionando la proteína inhibidora en Tris-HCl 10 mM pH 7.4. Después de 60 s las muestras fueron recalificadas con NaCl₂ 0.25 M. El volumen de la reacción fue de 500 µl. Posterior a esto se midió el tiempo de coagulación (Condrea E., y cols., 1981).

5.11 Prueba de Edema en músculo

La enzima Phaiodactylipina (5 µg) fue inyectada en el músculo de la pata trasera de ratones CD1 en un volumen de 10 µl de PBS pH 7.4. Como control se inyectó el mismo volumen de PBS en la otra pata. Este experimento se realizó por duplicado. Después de una hora el músculo fue disectado y congelado a -70°C. Los tejidos fueron cortados en rebanadas de 10 micras. El tejido teñido con hematoxilina de Harris - eosina, fue observado microscopio (Zeiszz, Axioskopen) campo claro con una magnificación 100X.

5.12 Síntesis de subunidades pequeñas usando la estrategia de f-moc

La síntesis química de la subunidad pequeña de la fosfolipasa Phaiodactylipina se realizó por el método de fase sólida siguiendo la estrategia de f-moc (Atherton and Sheppard, 1989). Se utilizaron aminoácidos Fmoc-L- Ala- OH, Fmoc-Pro- OH, Fmoc-L- Lys(Boc)- OH, Fmoc-L- Cys(Trt)-OH, Fmoc-L- Phe- OH, Fmoc-L- Met- OH, Fmoc-L- Gln(Trt)- OH, Fmoc-L- Asn(Trt)-OH, Fmoc-L-Thr(OtBu)-OH, Fmoc-L- Gly- OH, Fmoc-L- His(Trt)- OH, Fmoc-L- Asp-(OtBu) OH, Fmoc-L- Glu- (OtBu)- OH, Fmoc-L- Arg(Pbf)- OH y Fmoc-L-Val-OH.

En cada acoplamiento los aminoácidos se activan en forma de éster en presencia de la mezcla de los activadores N-hidroxibenzotriazol (HBOt), 2-(1 H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HBTU) y dimetil-N,N-diisopropiletlenamina (DIPEA), en una proporción 1:1:2. La reacción se agita entre 45 o 60 min. en cada acoplamiento. Al finalizar cada acoplamiento se acetiló con anhídrido acético en presencia de DIPEA por 30 min., para facilitar la purificación del producto final. Al termino del acoplamiento del último aminoácido se lavó 10 veces con diclorometano (DCM) y tres veces con metanol absoluto. La humedad se eliminó usando un rotaevaporador (Savant). Una vez la resina seca fue solvatada con la solución K (TFA 85%, tiofenol 5%, agua 5%, anisol 5% y etanoditiol 1%). La proporción de esta reacción es 15 mg por 1 ml de solución K. Se deja evaporar por 90 min.

El péptido se separó de la resina por filtración, y se lavó en éter isopropílico frío, fue separado por centrifugación y se disolvió en un volumen mínimo de ácido acético al 20%. Los péptidos obtenidos fueron purificados por CLAR con un gradiente de 0 a 60% de acetonitrilo 0.1% TFA, en 60 minutos.

5.13 Clonación del gene codificante para la enzima *Phaiodactylipina* a partir de cDNA

El RNA total se obtuvo homogenizando 1 telson de alacrán *Anuroctonus phaiodactylus*; se extrajo con el estuche de extracción de RNA total (Promega). El mRNA sirvió como templado para preparar cDNA usando el oligo T22NN (10 mM), por medio de la enzima reverso transcriptasa MMV (200U) y dNTP's 5 mM con un protocolo de: 5 min a 65°C, 5 min 45°C, 30 min 40°C. Posteriormente el cDNA fue amplificado con un oligo degenerado diseñado en base a la secuencia amino terminal conocida de la *Phaiodactylipina* y con un oligo poliT22NN (descrito por Corona y cols, 2001). La amplificación se llevó a cabo con las enzimas Taq (Beringher) y Vent (Biolabs).

Para obtener el gene completo correspondiente a la región 5' no codificante de la *Phaiodactylipina* usamos el kit RLM-RACE de Ambion (Austin USA). El cDNA se sintetizó con la enzima reverso transcriptasa M-MLV. Posteriormente el cDNA se unió por medio de una ligación con el adaptador provisto por el estuche en la región 5' no codificante. El cDNA modificado fue usado como templado para la amplificación por PCR con oligos diseñados de la región del adaptador y regiones específicas de la *Phaiodactylipina*. La amplificación final con oligos específicos de la región 5' no codificante y la región 3' no traducida fue amplificada con oligos específicos. Dicha región fue clonada en *E. coli* DH5 α , en el plásmido Pks- de 3 Kbases, por electroporación.

5.14 Clonación del gene codificante para la *Phaiodactylipina* e isoformas, a partir de DNA genómico

El DNA genómico fue purificado a partir de un alacrán *Anuroctonus phaiodactylus* sacrificado y pulverizado en nitrógeno líquido, con el estuche DNeasy de Qiagen (USA). La extracción se realizó en presencia de Proteinasa K (Boehringer Mannheim) y SDS. El precipitado obtenido fue

resuspendido en solución TE provista por el estuche. El mismo protocolo fue utilizado para extraer DNA genómico de abeja.

La amplificación a partir de DNA genómico se realizó utilizando oligos específicos de la secuencia nucleotídica conocida de la *Phaiodactylipina* (oligos descritos en el artículo de la sección 10). Para amplificar los segmentos fueron necesarios dos rondas de amplificación. En la primera amplificación se utilizó el siguiente protocolo: 94°C por 60 s, 47°C por 90 s, y 72°C por 120 s, por 30 ciclos. En la segunda amplificación el protocolo fue: 94°C por 60 s, 47°C por 90 s y 72°C por 120 s, por 28 ciclos.

5.15 Análisis de secuencia y filogenéticos

Los análisis de homología de secuencia fueron realizados utilizando el programa BLAST usando las bases de datos del GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Los alineamientos fueron elaborados con el programa Clustal-X del paquete PHYLIP (Felsenstein, J., 1995). Las secuencias obtenidas fueron editadas y alineadas usando Clustal X del paquete PHYLIP. Los árboles fueron construidos usando algoritmos de neighbor-joining (Felsenstein, J., 1995). Los árboles fueron visualizados usando el programa Tree-View de la universidad de Glasgow (<http://taxonomy.zoologi.gla.ac.uk/lod/treeview.htm/>).

5.16 Búsqueda de receptores

Los péptidos sintéticos 18S4, 23C4, 23S4 (100 µg) así como 10 µg de la fosfolipasa fueron biotinilados. Por otro lado disectamos cuatro tejidos de diferentes partes del acocil. La primera fue el músculo que conforma la cabeza, la segunda los nervios de los ojos, la tercera fue el intestino y por último el músculo del cuerpo el cual contiene la corda neuronal. Parte de los tejidos fueron usados inmediatamente y los restantes están conservados a -70°C en PBS 1X con inhibidores de proteasas. Los tejidos fueron homogenizados y disgregados sonicando por 5

segundos dos veces a 5 W. La fosfolipasa y los péptidos marcados fueron probados en membranas de acocil siguiendo un protocolo de unión tipo Bosan (Bosch, D., y cols., 1994). Posteriormente se realizaron ensayos de competencia utilizando los péptidos sintéticos marcados mezclados con péptido sintético no marcado a la misma concentración, los cuales fueron mezclados con los diferentes tejidos por una hora en solución de unión. Posteriormente se realizaron los lavados de los productos del reconocimiento por centrifugación y se corrieron en un gel de agarosa al 9 % en condiciones desnaturalizantes.

5.17 Expresión de Phaiodactylipina fusionada a la proteína Trp-LE en E. coli recombinante

La clona de la Phaiodactylipina fue subclonada en el vector PKS-. El inserto fue cortado usando las enzimas de restricción ECORI y CLAI. El producto fue clonado en el vector de expresión pPI3. A la clona se adicionó una metionina en el amino terminal para que posteriormente fuera separada de la proteína de fusión (Trp-LE) mediante proteólisis con bromuro de cianógeno. El plásmido obtenido fue electroporado en células *E. coli* W3110. Las colonias positivas fueron seleccionadas por su resistencia a tetraciclina. Las células fueron crecidas en medio mínimo (BYNB-DIFCO) con glucosa al 2%, por 36 horas. Posteriormente fueron centrifugadas y resuspendidas en agua tetradestilada, sonicadas y por último se realizó otra centrifugación a 14000 rpm lo cual enriqueció los cuerpos de inclusión de la proteína Trp-LE fusionada con la Phaiodactylipina.

5.18 Obtención de anticuerpos anti-subunidad pequeña de la Phaiodactylipina

Para detectar la expresión de la fosfolipasa fusionada con la proteína Trp-LE se obtuvieron anticuerpos anti-subunidad pequeña de la fosfolipasa Phaiodactylipina

El anticuerpo N418 (Wang, H., y cols., 2001) fue modificado con periodato de sodio (NaIO_4). Cincuenta μg de subunidad pequeña fueron unidos a 50 μg de N418; la mezcla se agitó suavemente por 15 min a temperatura ambiente (TA) en PBS pH 7.4 y se adicionó el NaIO_4 (Sigma) disuelto en fosfato de sodio (Na_2HPO_4) 10 mM, pH 7.4 para tener una concentración final de 50 mM, para activar los carbohidratos de la región constante de los anticuerpos se dejó

reaccionar por 1 h a TA. La reacción se detuvo con 100 ml de etilenglicol y El conjugado fue separado de la sal de la reacción una columna Superdex 75 (Pharmacia Biotech) eluyendo con PBS pH 7.4, con un flujo de 0.5 mL/min en un equipo Beckman con un controlador 412A, acoplado a un detector Waters modelo 481.

El conjugado fue inyectado a dos ratones BALB-B de forma intraperitoneal. Al cabo de 7 días los ratones fueron sangrados y el suero recuperado. El reconocimiento del suero por la subunidad pequeña y la fosfolipasa completa fue probado mediante un ensayo inmunoenzimático, usando placas de polivinilo (COSTAR 2596), las cuales fueron saturadas con 100 μ l de proteína, a una concentración de 3 μ g/ml, disuelto en 20 mM de bicarbonato de sodio pH 9.4, toda la noche a 4°C. Los pozos fueron bloqueados con OVA 1.0% en PBS pH 7.5 e incubados por 3 h a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas con PBS Tween-20 0.1% (Solución de lavado). Las diluciones de suero correspondientes, fueron aplicadas a la placa, la reacción fue incubada por 3 h a temperatura ambiente (TA). La dilución de los sueros se realizó en PBS, Tween-20 al 0.05% y ovoalbúmina bovina (OVA) al 0.1%, por 3 h a TA. Las placas fueron lavadas 6 veces con la solución de lavado. Para detectar la unión de los sueros al antígeno pegado a la placa, este se reveló con 50 μ l de anticuerpo anti-ratón acoplado a peroxidasa (dilución 1:2000). La reacción fue revelada con ortofenildiamina y H₂O₂ como sustrato. La reacción fue detenida con HCl 6N y las placas fueron leídas en el lector de ELISA modelo 1550 EIA (Bio-Rad) a 492 nm.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo se presentan en dos partes: resultados publicados y resultados no publicados. En el anexo se muestra el artículo publicado como primer autor, en el cual se describe parte del trabajo realizado durante el entrenamiento doctoral.

Valdez-Cruz, Norma A., Batista C.V.F. and Possani Lourival D. “Phaiodactylipin, a glycosilated heterodimeric phospholipase A₂, from the venom of the scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*”. Eur. J. Biochem. (en prensa).

En el anexo se incluyen las carátulas y resúmenes de dos artículos que se encuentran sometidos, en los cuales participo como primer autor. De igual forma se presentan dos artículos en los cuales funjo como co-autor. Aunque estos artículos no forman parte central de esta tesis, el trabajo fue realizado durante el periodo comprendido en el desarrollo de este entrenamiento doctoral. Sin embargo, todo el trabajo reportado se halla relacionado ya que describe el estudio de venenos de alacranes provenientes de la zona norte del estado de Baja California, México y California, USA, la cual se sabe que es una región de gran biodiversidad. Las especies de alacranes de esta región solo habían sido estudiadas desde el punto de vista de Sistemática (revisado por Fet., 2000), y muy poco se conocía acerca de la bioquímica y genómica de sus venenos.

Valdez-Cruz, Norma A., Batista, C.V.F. , Zamudio, F.Z. Bosmans, F., Tytgat, J., and Possani, L.D., “Phaiodotoxin, a novel structural class of insect-toxin isolated from the venom of the Mexican scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*”, Eur. J. Biochem. Sometido

Valdez-Cruz, Norma A., Dávila, S., Licea, A., Corona, M., Zamudio, F. Z. García-Valdes, J., Boyer, L., and Possani, L.D. Biochemical, genetic and functional characterization of venom components from two species of scorpions: *Centruroides exilicauda* Wood and *Centruroides sculpturatus* Ewing, *Biochemie*. En revisión, prácticamente aceptado.

Corona, M. Valdez-Cruz, N.A. Merino, E. Zurita, M. and Possani, L. D. “Genes and peptides from the scorpion *Centruroides sculpturatus* Ewing, that recognize Na(+)-channels”. *Toxicon* 39 1893-1898 (2001).

Corona, M. Gurrola, G. B. Merino, E. Cassulini, R. R. Valdez-Cruz, N. A. Garcia, B. Ramirez-Dominguez, M. E. Coronas, F. I. Zamudio, F. Z. Wanke, E. and Possani, L. D. “A large number of novel Ergotoxin-like genes and ERG K(+) -channels blocking peptides from scorpions of the genus *Centruroides*”. *FEBS Lett.* 532 121-126 (2002).

6.1 Resultados publicados

Los datos presentados en la introducción y en los antecedentes sustentaron el estudio de nuevos venenos de alacranes con actividad fosfolipásica A₂. El veneno del alacrán mexicano *Anuroctonus phaiodactylus* perteneciente a la familia *Iuridae* fue el modelo escogido por presentar dicha actividad, además de ser un veneno que jamás había sido estudiado y provenir de un alacrán que pertenece a una familia de la cual solo se tenían conocimientos de Sistemática.

6.1.1 Purificación de la Phaiodactylipina

El veneno total extraído de alacranes *Anuroctonus phaiodactylus* fue purificado por exclusión molecular en una columna Sephadex G-50 medio en cuatro fracciones. La actividad fosfolipásica se halló en la fracción I (figura 6A), la cual se sometió a CLAR. En esta separación se encontraron cuatro componentes con actividad enzimática los cuales eluyen entre los 37 y 39 minutos (figura 6B). El componente que eluye a los 39 minutos fue denominado Phaiodactylipina (figura 6B) y fue obtenido en forma homogénea (figura 6C). La enzima corresponde al 0.5% del total de proteína contenida en el veneno soluble, lo que significó alrededor del 20% de la actividad fosfolipásica del veneno total. El peso molecular de dicho componente fue de 19,172 Da.

La secuencia de aminoácidos fue obtenida por diferentes vías. Primeramente la Phaiodactylipina se sometió a secuenciación directa por degradación de Edman, en la cual se obtuvo una secuencia doble, lo que indicó que la enzima se hallaba compuesta por dos subunidades. La enzima fue reducida con DTT y sometida a CLAR (Fig. 6D), procedimiento con el cual, se separó en dos componentes. El primero eluye a los 24.14 min, y correspondió a la subunidad pequeña cuyo peso molecular es de 3242.5 a.m.u.. El otro componente eluye a los 34.82 min, y corresponde a la subunidad larga, pero al ser separada de la subunidad pequeña se precipitó.

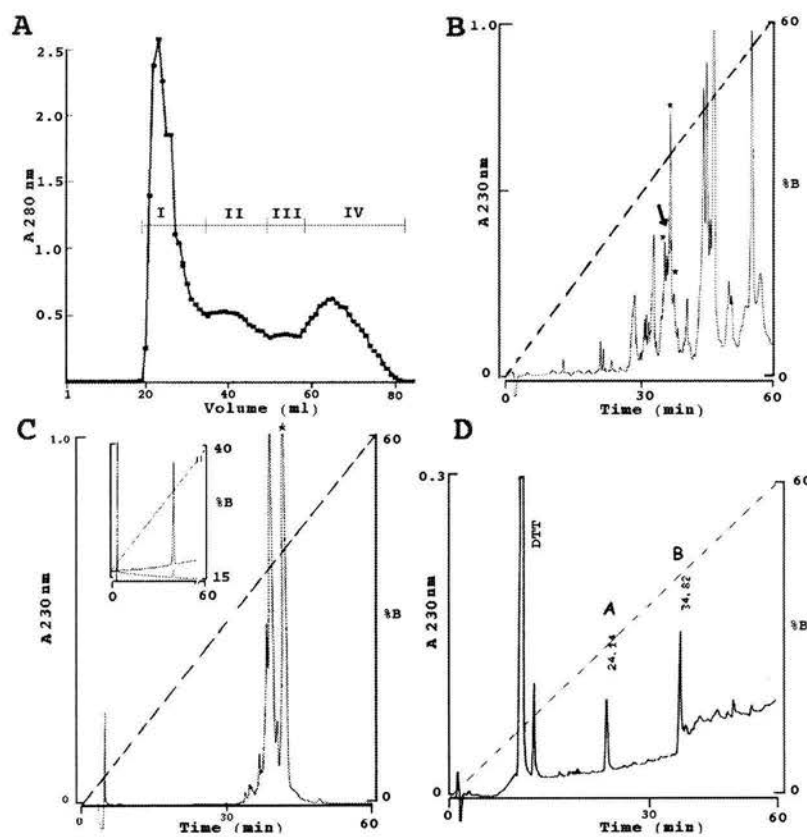
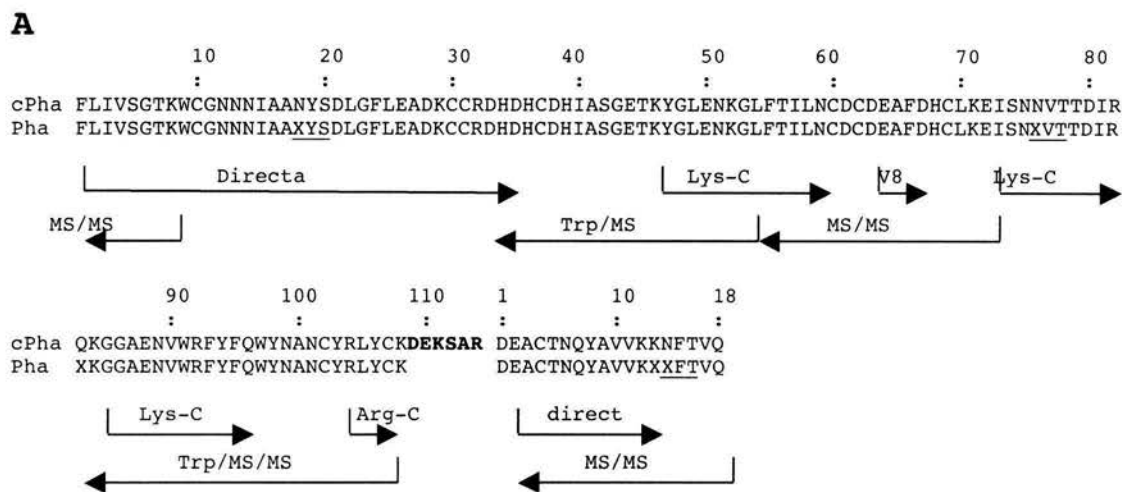


Figura 6. Purificación de la fosfolipasa Phaiodactylipina. A, La fracción soluble de veneno del alacrán *Anuroctonus phaiodactylus* (61 mg) fue aplicada en una columna de Sephadex G-50 medio. Fracciones de un ml fueron colectadas y se le hizo la prueba de actividad fosfolipásica. B, En la fracción I se encontró dicha actividad por lo cual fue nuevamente sometida a CLAR en una columna de fase reversa. C, El componente que eluye a los 40.53 min (marcado con una flecha) fue sometido a una separación en una columna C-18 analítica en las mismas condiciones de B. Los componentes marcados con asterisco también presentan actividad fosfolipásica. Dicho componente fue obtenido en forma homogénea como se observa en el inserto de la figura C, el cual fue denominado Phaiodactylipina. El gradiente usado fue de 15% a 40% de solución B durante 60 min. D, Reducción de la Phaiodactylipina con DTT.

6.1.2 Determinación de la secuencia primaria de la Phaiodactylipina



B

tgataaaaaataaataagtgtagattggttactgctgaaaaccaagaatctatttctaactgttatgaaatagccaggaaga	80
aaacaattttccagaagat ATG GTT AAG AGA GTT TCC AAA GAA GAA ATG GAT GCT TTG GAG AGA	144
<i>M A K R A S K E E M D A L E R</i>	-15
AGT TGT TCT CAA CCG TTT GAG GAG GAA CGC TTC CTC ATC GTA TCA GGT ACG AAA TGG TGT	204
<i>S C S Q P F E E E R F L I V S G T K W C</i>	10
GGT AAC AAT AAC ATA GCA GCA AAT TAT TCT GAT CTT GGA TTT CTA GAA GCA GAT AAG TGT	264
<i>G N N N I A A N Y S D L G F L E A D K C</i>	30
TGC CGC GAT CAC GAT CAC TGT GAT CAT ATT GCG TCA GGG GAA ACT AAA TAT GGC CTA GAA	324
<i>C R D H D H C D H I A S G E T K Y G L E</i>	50
AAT AAA GGA TTG TTT ACA ATA TTG AAC TGT GAT TGC GAT GAA GCT TTC GAT CAT TGT TTG	384
<i>N K G L F T I L N C D C D E A F D H C L</i>	70
AAG GAA ATC TCA AAT AAT GTT ACG ACG GAT ATT AGG CAA AAA GGT GGC GCC GAG AAT GTT	444
<i>K E I S N N V T T D I R Q K G G A E N V</i>	90
TGG AGA TTT TAC TTC CAA TGG TAC AAT GCA AAT TGT TAT CGT TTA TAT TGT AAA GAC GAA	504
<i>W R F Y F Q W Y N A N C Y R L Y C K D E</i>	110
AAG TCT GCC AGA GAT GAA GCC TGC ACT AAT CAA TAT GCT GTT GTA AAG AAG AAT TTC ACA	564
<i>K S A R D E A C T N Q Y A V V K K N F T</i>	130
GTA CAA TAG tatgcgagagtgatgagagatgatgtacaattgatcttctacaagtcaaattcagtaaaattgatg	643
<i>V Q stop</i>	132
atgaataattataactgtatatattttcttctaattggtttatgtacgacatagaacaatctataaataaagtatcctttgatag	726
gatctatatattaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	

Figura 7. Estructura primaria de la Phaiodactylipina y el gene que la codifica. A, Empalme de las secuencias obtenidas por secuenciación directa, digestiones enzimáticas (Lys-C, V8 y Arg-C) y determinación por espectrometría de masas por peso molecular (MS) o por fragmentación (MS/MS). El hexapéptido que es eliminado se marcó en negritas, y la numeración representa la posición de los aminoácidos. B, Secuencia nucleotídica de la Phaiodactylipina. La secuencia de aminoácidos se muestra debajo cada codon. El péptido señal putativo se indica en letras cursivas, el primer aminoácido de cada subunidad en negritas. El hexapéptido que es removido se muestra subrayado y el codón de término se indica como stop.

La subunidad pequeña se secuenció y los primeros 15 aminoácidos de la región amino terminal fueron identificados. Esta información nos permitió de deducir la secuencia de la subunidad grande (35 aminoácidos) a partir de la secuencia doble obtenida al principio

Información adicional acerca de la secuencia fue obtenida a partir de cortes enzimáticos realizados con las enzimas Lys-C, V8, y Arg-C, (figura 7A).

Estas digestiones nos permitieron conocer el 70% de la secuencia de aminoácidos de la enzima. El 30% restante de la secuencia fue determinada por espectrometría de masas, así como por fragmentación por MS/MS. La secuencia obtenida se muestra alineada con la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia nucleotídica obtenida de cDNA, que codifica para la Phaiodactylipina (figura 7A).

6.1.3 Determinación de la glicosilación de la subunidad pequeña

La posición 18 y 76 de la subunidad grande, así como la posición 14 de la subunidad pequeña jamás fueron secuenciadas pero fueron deducidas a partir de la secuencia nucleotídica identificada a partir cDNA, correspondiendo a asparinas (Figura 7B). Al estudiar la secuencia encontramos que en dichas posiciones se encuentran motivos estructurales correspondientes a la secuencia NXT ó S los cuales sugieren modificaciones de glicosilación, (ver Figura 7A). El peso molecular teórico de la subunidad pequeña corresponde a 2058.3 Da teóricos y el experimental correspondió a 3242.5, existiendo una diferencia de 1184.5 a.m.u. Por espectrometría de masas y fragmentación MS/MS, se determinó que en la posición 14 que corresponde a la secuencia NFT se encuentra una glicosilación conformada por tres Hexosas, dos N-acetil hexosas (HexNAc) y dos deoxyhexosas (Figura 8) que corresponde a un peso molecular de 1184.4 a.m.u., con lo que comprobamos que la secuencia de aminoácidos es correcta y que la asparina de la posición 14 esta modificada con una glicosilación. Sin embargo, la estereoquímica exacta de cada uno de los carbohidratos no fue identificada, al menos sabemos que las hexosas o algunas de ellas son manosas, ya que la Phaiodactylipina es

retenida en una columna de afinidad en presencia de Sepharosa-concavalina A. El peso molecular de la subunidad larga teórico es de 12440 Da, por lo que podemos predecir que la subunidad grande está glicosilada y que dicha modificación le confiere una masa molecular adicional de 3489.5 a.m.u.

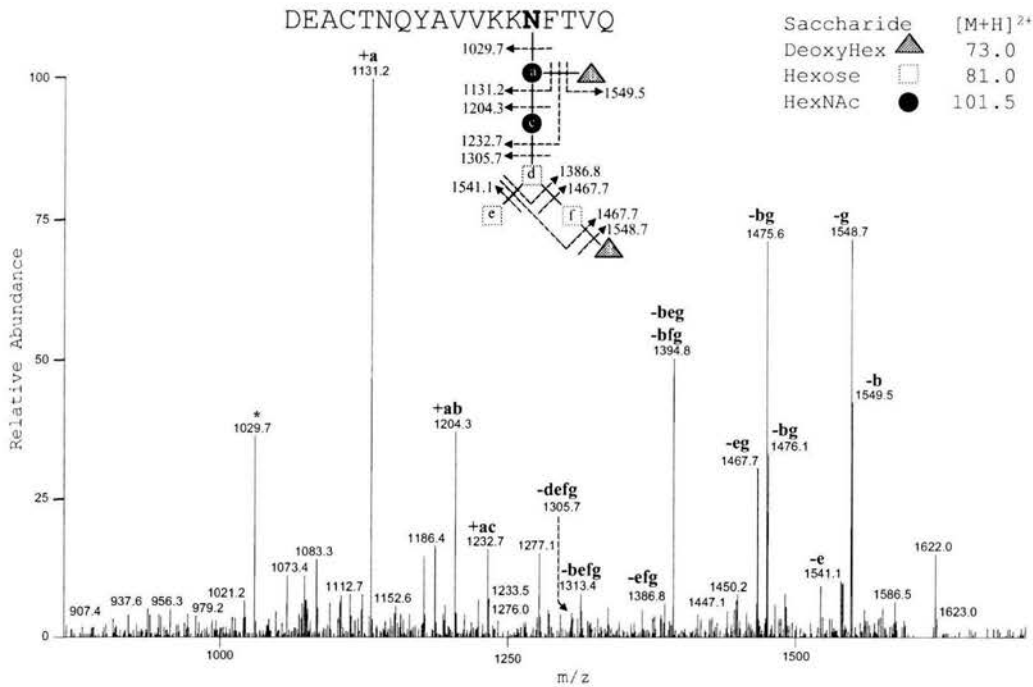


Figura 8. Determinación de los carbohidratos de la subunidad pequeña. Se realizó por fragmentación MS/MS. Los pesos moleculares correspondientes los se hallan indicados. Los círculos muestran de forma gráfica la presencia de hexosamina, los triángulos deoxihexosa y los cuadrados hexosas. La letras internas representan la masa molecular encontrada experimentalmente.

6.1.4 Clonación y secuenciación de la *Phaiodactylipina* a partir de cDNA

La secuencia nucleotídica obtenida se compone de 769 pares de bases (pb), incluyendo una región de 99 pb de la región 5' no codificante y 196 pb en la región 3' no traducida. Ambas subunidades de la molécula se hallan codificadas en la misma secuencia lo que indica que son codificadas por un mismo RNA y que sufre un proceso de modificación postranscripcional cuando el hexapéptido de la posición 109 a 114 es eliminado, dejando las dos subunidades unidas por un puente disulfuro (Fig. 7B). La *Phaiodactilipina* se compone de 108 aminoácidos de la subunidad grande y 18 de la subunidad pequeña. La región -26 o -16 que precede la proteína madura lo denominamos como

péptido señal putativo. En ambas posiciones se halla un metionina, sin embargo esta región no guarda similitud con las secuencias usualmente conocidas para organismos eucariotes. El péptido señal putativo guarda similitud con péptidos señales y propéptidos de secuencias descritas para las toxinas de la araña *Phoneutria nigriventer* Pn2-1A y Tx2-1 (Kalapotahkis, E., y cols., 1998).

6.1.5 Caracterización enzimática y funcional de la enzima Phaiodactylipina

Se comprobó que la proteína Phaiodactylipin es una fosfolipasa de tipo A₂ ya que corta de manera específica la posición 2 de su sustrato. Esto fue comprobado utilizando L-1,2-dipalmitoil-[palmitoil-2-14C] fosfatidilcolina, marcados radioactivamente en la posición 2. La actividad específica de la Phaiodactylipina es de 172 U/mg a pH 8.0, 37°C, usando yema de huevo como sustrato.

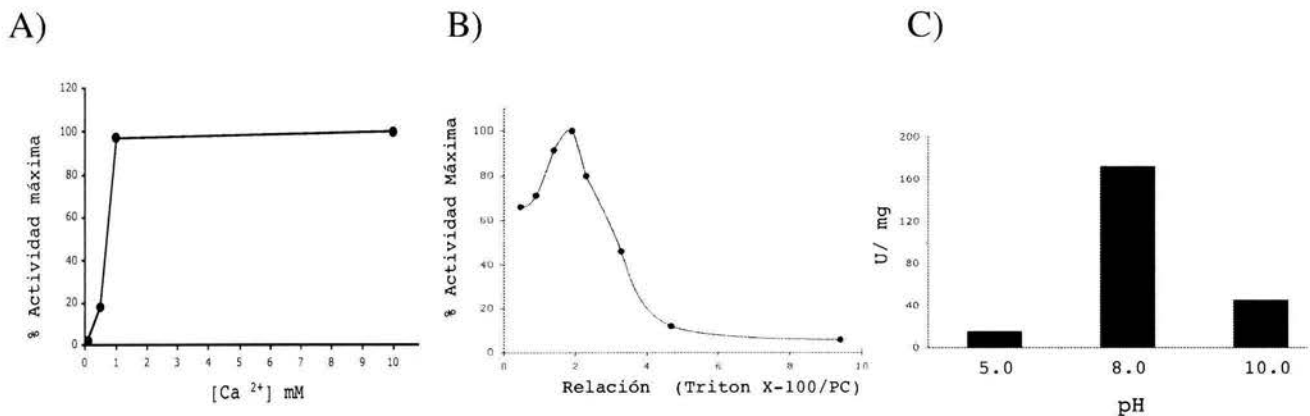


Figura 9. Caracterización de la actividad enzimática de la Phaiodactylipina. A, Actividad calcio dependiente. B, Actividad máxima en presencia de Tritón X-100. C, Dependencia del pH para la catálisis.

La catálisis de la Phaiodactylipina es dependiente de calcio a una concentración 1 a 10 mM (Fig. 9A), la actividad óptima de la enzima se desarrolla a pH 8.0 (Fig. 9C). Esta actividad se incrementa en un 20 % con la adición de Tritón X-100 0.1 % y disminuye con Tritón X-100 al 1.0% (Fig 9B).

La preferencia lipídica de la Phaiodactylipina fue determinada por el método de Lobo de Araujo y Radvanyi (1987). Usamos 6 sustratos diferentes con el fin de conocer la importancia del grupo fosfatídico de la posición R3 así como del ácido graso en la posición R2, usando Rojo de Fenol como indicador del cambio de pH mediado por la liberación de ácido. La Phaiodactylipina presenta

preferencia por fosfolípidos con ácido araquidónico en la posición R2 y que en la posición R3 mantengan colina o etanolamina (PC>PE>PS) (Tabla 3).

Tabla 3. Preferencia lipídica de la fosfolipasa Phaiodactylipina en presencia de diferentes sustratos, siguiendo el protocolo de Lobo de Araujo y Radvanyi (1987).

Fosfolípido	AE (U/mg)	Fosfolípido	AE (U/mg)	Fosfolípido	AE (U/mg)
SAPE	211 ± 20	DSPE	51 ± 2	DPPE	48 ± 2
SAPC	142 ± 13	DSPC	149 ± 7	DPPC	67 ± 3
SAPS	84 ± 4	DSPS	63 ± 5	DPPS	32 ± 7

AE, actividad enzimática. Los sustratos utilizados fueron: 1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (SAPC), 1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (SAPE), 1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-Serine] (SAPS), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DSPE), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine] (DSPS), 1,2 diphtanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), 1,2-diphtanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DPPE), 1,2-diphtanoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine] (DPPS).

6.1.6 Pruebas de letalidad

Cinco microgramos de enzima Phaiodactylipina inyectada en insectos (grillos) de 100 mg, o 3 µg inyectados en crustáceos (cochinillas) de 50 mg, son letales. Animales controles fueron inyectados con 3 µl de PBS, procedimiento al cual sobreviven (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de la Phaiodactylipina sobre insectos y crustáceos

Espécimen	Componente inyectado	Dosis (µg/g)	Efecto	No de ensayos
Insecto	Phai	8.3	ninguno	1
	Phai	25	tóxico	2
	Phai	42	letal	4
Crustáceo	Phai	17	ninguno	2
	Phai	50	letal	8

Efecto tóxico se definió como el efecto paralizante, pérdida del equilibrio o efecto aletargante que sufren los animales después de la inyección de la fosfolipasa. Letal significa la muerte de los animales ensayados. Phai significa Phaiodactylipina.

6.1.7 Efecto inflamatorio de la *Phaiodactilipina*

La *Phaiodactilipina* además fue inyectada en ratones intraperitonealmente, en una dosis de 20 μg / 20 g de peso de ratón lo cual no causó ningún efecto. Cuando 5 μg de enzima en un volumen mínimo de PBS fueron inyectados de forma intramuscular en la pata posterior del ratón le causó inflamación. En la otra pata del ratón se inyectó el mismo volumen de PBS. Los músculos inyectados fueron disectados y congelados a -70°C . Se hicieron láminas de tejido de 10 micras, las cuales fueron teñidas con hematoxilina de Harris/eusina y fueron observadas en un microscopio de campo claro. Como se puede observar no existe daño citolítico de las células (Fig. 10) como el caso de las mitoxinas reportado por Lomonte y cols. (1999), pero si inflamación.

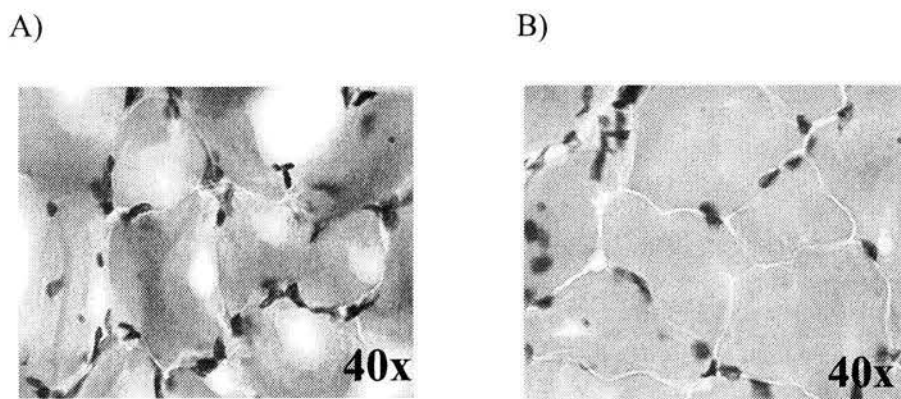


Figura 10. Efecto inflamatorio de la *Phaiodactilipin* sobre músculo de ratón. A, Control de la inyección de PBS en músculo de ratón. B, Efecto de 5 μg de enzima pura después de 60 min de tratamiento.

6.1.8 Actividad hemolítica

La *Phaiodactilipina* (5 μg) tiene actividad hemolítica directa sobre eritrocitos humanos, la cual ocurre en los primeros minutos (Fig. 11A). La figura 11B muestra la cinética del efecto de la enzima a los 10 min. Los eritrocitos toman forma de esferocitos que es la formación de proyecciones alargadas de la membrana de dichas células cuando son sometidos a modificadores de la membrana (Fig. 11A). Para comprobar la actividad hemolítica, la hemoglobina liberada al medio fue medida a una absorbancia de 540 nm y seguida en diferentes intervalos de tiempo (Fig.11B) lo que muestra la permeabilidad de la célula cuando se pone en contacto con la enzima. Para que

suceda la hemolysis no es necesaria la adición de lípidos para activar dicha enzima, lo que sugiere que la Phaiodactylipina al igual que la enzima IpTxI presenta actividad hemolítica directa.

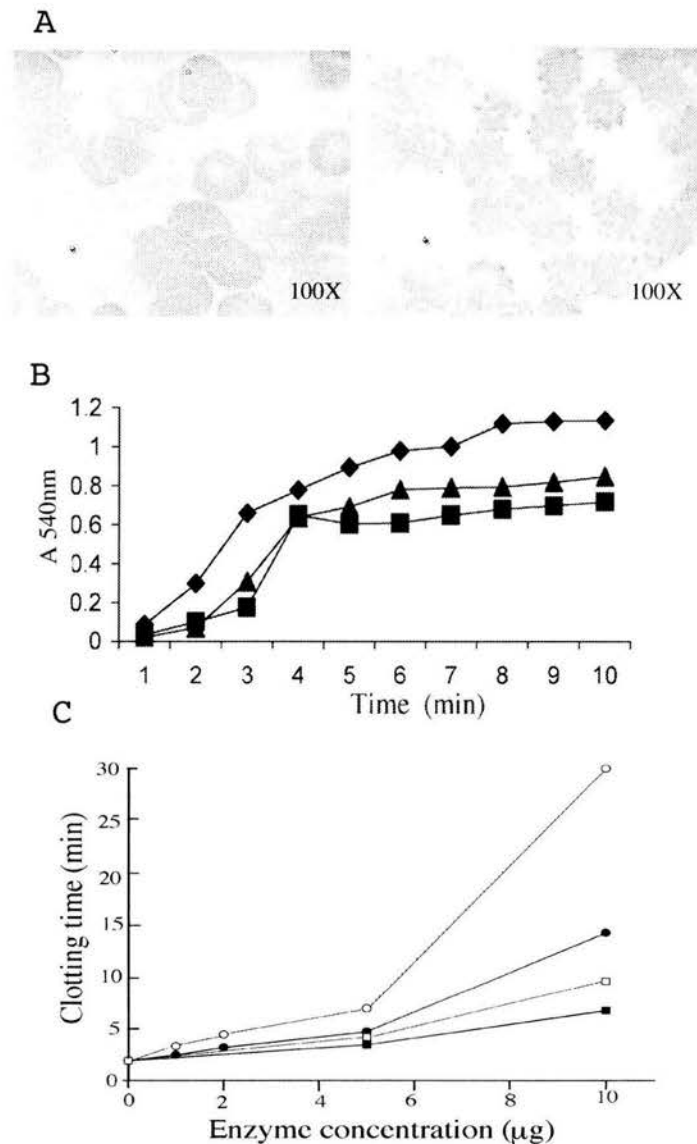


Figura 11. Actividad hemolítica y anticoagulante de la Phaiodactylipina. A, en el panel izquierdo se muestran los eritrocitos control y en el derecho el efecto de 5 μg de Phaiodactylipin sobre la preparación de eritrocitos humanos. B, Cinética de liberación de hemoglobina, al aplicar 5 μg de enzima, (Triángulos) comparado con el efecto de Tritón X-100 (rombos) e IpTxI (cuadros). C, tiempo de coagulación de plasma rico de plaquetas (PRP) y pobre de plaquetas (PPP). PPP (círculos) y PRP (cuadros) fueron mantenidas a 37°C en presencia de diferentes concentraciones de Phaiodactylipina (llenos). Los ensayos control se hicieron con IpTxI (vacíos). El tiempo control de recalcificación fue de 1 min y 51 segundos.

6.1.11 Análisis filogenético de la *Phaiodactilipina*

Con los resultados anteriores se realizó un filograma el cual se muestra en la figura 13, en el cual además involucramos diversas fosfolipasas de los grupo I, II y III IX y XII.

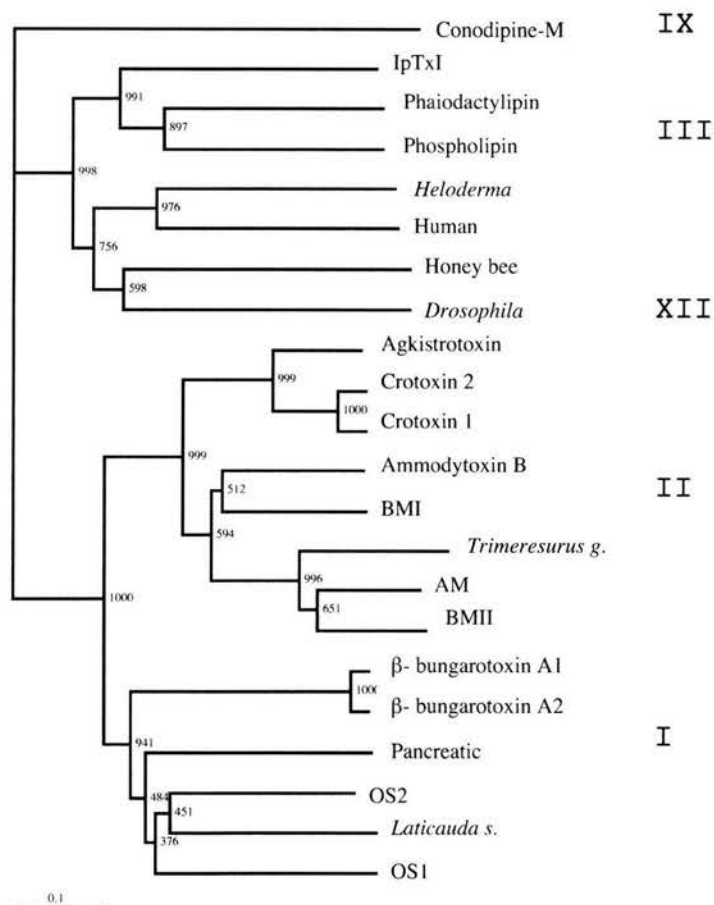


Figura 13. Filograma de diferentes fosfolipasas A₂ alineadas con el programa Clustal X. Las secuencias maduras de diferentes fosfolipasas de los grupo I, II, III, IX y XII, fueron alineadas usando Clustal-X y el filograma fue generado usando Tree-view (algoritmo neighbor-joining). Las secuencias fueron tomadas del banco de datos: Conodipine-M (A59047); Imperatoxin I (Zamudio, F., y cols., 1997); Phospholipin (Conde, R., y cols., 1999); *Drosophila melanogaster* (AY219032); Honeybee (AAL30844); *Heloderma* (P80003); Human (Q9NZ20); Agkistrotoxin (P14421); Crotoxin 1 (P07517); Crotoxin 2 (P24027); Ammodytoxin B (P14424); *Bothrops asper* Myotoxin 1 (P20474); *Trimeresurus gramineus* (P70089); *Agkistrodon contortrix* Myotoxin I (AM)(P49121); *Bothrops asper* Myotoxin II (BMII) (P24605); β -bungarotoxin 1 (P00617); β -bungarotoxin 2 (P00618); Pancreatic (PSHU); *Laticauda semifaciata* (PSLT4E); bye 1 (OS1) (AAB33759); *Oxyuranus scutellatus* 2 (OS2) (AAB33760).

En este árbol se muestra la separación de cada uno de los grupos, de igual forma se presenta una lejanía importante de la Fosfolipina, IpTxI y Phaiodactylipina con respecto a las secuencias de abeja y Heloderma agrupadas en el grupo III. Pero con una similitud por arriba del 30% en cuanto a estructura primaria. De igual forma se observa que la fosfolipasa de *Drosophila melanogaster* agrupada en el grupo XII se encuentra más relacionada con las anteriores. Como se observa en la figura 13 los grupos I , II y III se hallan bien definidos. La Conodipina-M correspondiente al grupo IX es la fosfolipasa A₂ más divergente, por lo cual la consideramos como grupo externo.

6.2 Resultados no publicados

6.2.1 Pruebas de toxicidad de péptidos sintéticos

Con el antecedente de la función endógena de la subunidad pequeña de la fosfolipasa β -bungarotoxina, la cual por si misma es capaz de bloquear específicamente el canal de potasio dependiente de voltaje tipo T, decidimos probar algún efecto que pudiera presentar la subunidad pequeña que conforma la fosfolipasa Phaiodactylipina. Cuatro péptidos fueron sintetizados (18C4, 18S4, 23C4 y 23S4) a partir de las dos secuencias nucleotídicas de las subunidades pequeñas encontradas. Cada péptido fue sintetizado por f-moc como se describe en Materiales y Métodos. Los péptidos fueron probados en tres sistemas animales. Los resultados del péptido 18S4 son interesantes, ya que en mamíferos causa reacción alérgica que se describe como comezón generalizada, además fue tóxico para grillos y crustáceos. De forma interesante el péptido 18C4 cuyo peso molecular y secuencia son muy similares, no causa el mismo efecto. Sin embargo éste péptido tiene problemas al ser resuspendido en PBS. Por otro lado los péptidos 23S4 y 23C4 tienen efecto tóxico en grillos y el efecto es diferente sobre crustáceos como se observa en la tabla 5.

Tabla 5. Efecto de los péptidos sintéticos 18S4, 18C4, 23S4 y 23C4, en mamíferos (ratones), insectos (grillos) y crustáceos (cochinillas). Los animales control fueron inyectados con PBS, los cuales no presentaron ningún síntoma.

COMPONENTE	INYECCIÓN	MODELO	DOSIS (mg/Kg)	EFEECTO	LETALIDAD
18S4	IP	Ratón	5	Ninguno	NA
18S4	SC	Ratón	5	Comezón generalizada	NA
18S4	Postabdominal	Grillo	10	Ninguno	NA
18S4	Postabdominal	Grillo	25	Pérdida de movimiento	NA
18S4	Abdominal	Cochinilla	25	Pérdida de movimiento	4/4
18C4	IP	Ratón	5	Ninguno	NA
18C4	SC	Ratón	5	Ninguno	NA
18C4	Postabdominal	Grillo	10	Ninguno	NA
18C4	Postabdominal	Grillo	25	Ninguno	NA
18C4	Abdominal	Cochinilla	25	Ninguno	NA
23S4	IP	Ratón	5	Ninguno	NA
23S4	SC	Ratón	5	Comezón genralizada	NA
23S4	Postabdominal	Grillo	10	Poco tóxico	0/2
23S4	Postabdominal	Grillo	25	Parálisis	0/2
23S4	Abdominal	Cochinilla	25	Ninguno	NA
23C4	IP	Ratón	5	Ninguno	NA
23C4	SC	Ratón	5	Comezón	NA
23C4	Postabdominal	Grillo	10	Poco tóxico	0/2
23C4	Postabdominal	Grillo	25	Pérdida de movimiento	2/2 a las 6 h
23C4	Postabdominal	Grillo	50	Pérdida de movimiento	2/2 a las 3 h
23C4	Abdominal	Cochinilla	25	Parálisis	4/4 a las 2 h

IP, intraperitoneal, SC, subcutánea, NA, no aplica.

6.2.2 Clonación y secuenciación de isoformas de la *Phaiodactylipina* a partir de cDNA

Amplificamos y clonamos 5 isoformas de la fosfolipasa *Phaiodactylipina*, las cuales se muestran en la figura 14. Para dicha amplificación se usaron oligos específicos de la posición –16 ó N-terminal y del C-terminal. Se observa que la región 5' previa a la región amino de las proteínas se halla altamente conservada. Las secuencias correspondientes a las proteínas maduras presentan una similitud de alrededor del 90%. Las variaciones en las isoformas se presentan fuera del sitio de unión a calcio y del sitio catalítico.

```
Phai MDALERSCSQPFEEERFLIVSGTKWCGNNNIAANYSDLGFLEADKCCRDHDHCDHIASGETKYGLENKGLFTILNDCDEAFDHCLKEISNNV
2311 -----FLIVPDTKWCGNNNIAANYSDLGFLEADKCCRDHDHCDHIASGETKYGLENKGLFTILNDCDEAFDHCLNEISNNF
2172 MDALERSCSQSFEERFLIVPDTKWCGNNNIAANYSDLGFLEADKCCRDHDHCDHIASGETKYGLENKGLFTILNDCDEAFDHCLKEISNNF
2178 MDALERSCSQPFEEERFLIVPGTKWCGNNNIAANYSDLGFLEADKCCRDHDHCDHIASGETKYGLENKGLFTILNDCDEAFDHCLNEISNNF
2328 MDALERSCSQPFEEERFLIVPGTKWCGNNNIAANYSDLGFLEADKCCRDHDHCDHIASGETKYGLENKGLFTILNDCDEAFDHCLNEISNNF
59 -----VPGTKWCGNNNIAANYSDLGFLEADKCCRDHDHCDHIASGETKYGLENKGLFTILNDCDEAFDHCLNEISNNF

Phai TTDIRQKGAENVVRFYFQWYNANCYRLYCKDEKSARDEACTNQYAVVKKNFTVQ
2311 TMDIRQKGAENVWSYFQWYNANCYRLYCKDEKSARDEACTNQYAVVKKENFTVQ
2172 TMDIRQKGAENVWSYFQWYNANCYRLYCKDEKSARDEACTNQYAVVKKNFTVQ
2178 TMDIRQKGAENVWSYFQWYNANCYRLYCKDEKSARDEACTNQYAVVKKNFTVQ
2328 TMDIRQKGAENVWSYFQWYNANCYRLYCKDEKSARDEACTNQYAVVKKNFTVQ
59 TMDIRQKGAENVW-----QLLLPTKSPARDEACTNQYAVVKK-----
```

Figura 14. Alineamiento de las secuencias traducidas a partir de secuencias nucleotídicas que codifican para isoformas de la *Phaiodactylipina* (Phai). En negritas se muestran los aminoácidos diferentes. La clona de la *Phaiodactylipina* sirvió para alinear las isoformas.

6.2.3 Clonación del gene codificante para la enzima *Phaiodactylipina* e isoformas a partir de DNA genómico

El DNA genómico fue purificado utilizando el estuche de Quiagen (USA). Las secuencias nucleotídicas obtenidas se muestran en la figura 15, las cuales se alinean superpuestas con las secuencias de aminoácidos correspondientes. En esta figura se presentan los datos correspondientes a los tamaños de los intrones, las secuencias donadoras yceptoras que conservan la regla GT/AG, así como los aminoácidos interrumpidos. La secuencia genómica de la isoforma 2328 de la fosfolipasa *Phaiodactylipina*, que presenta el 97% de identidad se muestra en la figura 15A. La secuencia de la *Phaiodactylipina* muestra el mismo arreglo de intrones y exones así como los mismos tamaños, sin embargo no se muestra pues falta determinar la región del péptido señal putativo. Debido a que no se conocía ninguna secuencia genómica de fosfolipasas del grupo III, amplificamos el gene codificante para la fosfolipasa de abeja que se muestra en la figura 15B.

A)

```

1          31          61          91
ATG GAT GCT TTG GAG AGA AGT TGT TCT CAA CCG TTT GAG GAG GAA CGC TTC CTC ATC GTA CCA GGT AAA ATT AGT TAT TAT ATT TGA TGT AAT GGG AAA GAT AAT CGT TTT CAT ATT TCC
M D A L E R S C S Q P F E E E R F L I V P G

121          151          181          211
CCT ACT GTA CAT CTT CCT CTT TCC ACT TGA ATA ACT CGG TTC TTC TAA TTG AAG TGT TGA AAG ACA TAG AAC CAT GCG TAC CTT TAC TTC TCT CAT AAT TAC TAT GAA TGT TTG TTA ATT
241          271          301          331
TAT TAC CTT TAT TTA AAG TTC CCT GTG AGG AAA TGA GAA TAA AGG TTT AAT TCT TAA ACT ATT ACT TAC AGA TAT TCT TAC CCC TTT TAT ATA GGT ACA AAA TGG TGT GGT AAC AAT AAC
T K W C G N N N

361          391          421          451
ATA GCA GCA AAT TAT TCT GAT CTT GGA CCT CTA GAA GCA GAT AAG TGT TGC CGC GAT CAC GAT CAC TGT GAT CAT ATT GCG TCA GGG GAA ACT AAA TAT GGC CTA GAA AAT AAA GGA TTG
I A A N Y S D L G F L E A D K C C R D H D H C D H I A S G E T K Y G L E N K G L

481          511          541          571
TTT ACA ATG TTA GTA CTT TTT TAA CAT AGA TTC AGA ATT TCC AAT TAT TTC TTA CCT TTC AAT TTG TCT GAT TGA GGC TCG TCT TGT TTA ATA AGA TGC ATT TAT GGA AAC TGT TTA ACA
F T I

601          631          661          691
TAA GTT AAG AAA ATT GTT TTT TAA AAT TAT TTG ATT TTT TAT CTT TTA ATA TAGA TTG AAC TGT GAT TGC GAC GAA GCT TTC GAT CAT TGT TTG AAC GAA ATC TCA AAT AAT TTT ACA ATG
L N C D C D E A F D H C L N E I S N N F T M

721          751          781          811
GAT ATT AGG CAA AAA GGT GGC GCC GAG AAT GTT TGG AGT TAT TAC TTC CAA TGG TAC AAT GCA AAT TGT TAT CGT TTA TAT TGT AAG GAC AAG AAG TCT GCC AGG T AAG TCT GTT GAT TA
D I R Q K G G A E N V W S Y Y F Q W Y N A N C Y R L Y C K D E K S A R

841          871          901          931
CTG ATT TCC ATA ATA AAA CCT AAA ATA ATT ATC TAT CAC AAA CTT CAT CTT TGA TAT AAG CAA ATA TGA TCA TGA GTT AAG CAA TTT CTT GGT GAT CGC TGA TCA CTA TAA AAT ATT TGC

961          991          1021          1051
TTT CTG CTT TCA CTT TCT TAT AAT ATT GCT TAT AAA AAT GAC AAT GAT CTA TTC TTC ATT TCA GA GAT GAA GCC TGC ACT AAT CAA TAT GCT GTT GTA AAG AAG AAT TTC ACA GTA CAA T
D E A C T N Q Y A V V K K N F T V Q *

1081          1111          1141
AAG TAT GCG AGA GAT GAT GTA TCG AAT TCC TGC AGC CCG GGG GAT CCA CTA GTT CTA GAG CCG CCG CCA CCG CCG TGG AG

```

Secuencia donadora	Intrón no.	Longitud	Secuencia receptora	aa interrumpido
ACCGGtataa	I	271	tatagGTACA	Gly 6
ACAATgttag	II	166	tatagATTGA	Ile 57
GCCAGgtaag	III	200	ttcagAGAGA	Arg 114

B)

```

1          31          61          91
ATG CAA GTC GTT CTC GGA TCC TTG TTC CTT CTC CTC CTC TCT ACC TCT CAC GGA TGG CAA ATC AGG GAT AGG ATC GGG GAT AAC GAG TTG GAG GAA CCG ATA ATA TAT CCA GGT ATA GAG
M Q V V L G S L F L L L L S T S H G W Q I R D R I G D N E L E E R I I Y P G

121          151          181          211
AGA GCG ATT GAT AGA GGA GAT GAA TCG TCT CTT CAC ACA TTC CTC TTT GCG TGA TTT TCA TTT TGT TGT GTC A GGA ACG TTA TGG TGC GGG CAT GGT AAC AAG TCG TCA GGC CCG AAC GAG
G T L W C G H G N K S S G P N E

241          271          301          331
CTA GGT CCG TTC AAG CAC ACG GAT GCA TGC TGT CGA ACC CAC GAC ATG TGC CCG GAC GTG ATG TCA GCT GGT GAA TCG AAG CAC GGC CTG ACC AAC ACG GCC TCC CAC ACC AGT CTC CC
L G R F K H T D A C C R F H D M C P D V M S A G E S K H G L T N T A S H T R

361          391          421          451
TTC TCC AGC CTC TCT CTC TCT CTC AGC TTT CCG TCC TCT CCC ATT TCG CGC GGC TTT CTT TCC AAG AGC CAC TTT CTT CCC CCT TCG GAG GCG AGG AAC ACG CTC TCG ACT TTT CAA CTT
481          511          541          571
TTC ACG CGA AAA CCG AAC CCT TTC TCT TAT CTA CGT TGG TGG ACC CAC GCG ACC CAC GCA GGA GGG TTC CAT TCC ATT CCG ACT GCA CCG GGC GGT *AC GAT CGC CGC GGT TAA TGC CCG
601          631          661          691
GCG CTC GCG TGA ACG CCC ACG GGA AAA TTT TTC CTA CCG ATC GAA TTG CCC ACG GGA CGT GAG AAA TTG CGA GCG ATT AGG CGT AAC GCC CCG CGC GAA TTG TAG GCG TGA CTG GTG GCC
721          751          781          811
GGC TGC CAC CTC GCA TGA ATC ACT C*T GAA TAT CGA GCG TGC AGC GGA AAA TGA AAG GG* CCG AGA GTT CTT TTC TTT GGA AAT TTG CGA GGA GAA AAG AGA AAC GTT GTT ATT ATT ATT
841          871          901          931
TTA TTA TTG TTA TTA TTA TAT GGA TGG AGA AGA TGG TAA CGA AAG AAT ATT GGG GGA TAT TTT CCA AC ACG TTG TCG TGC GAC TGC GAC GAC AAG TTC TAT GAT TGT CTT AAA AAT TCG
R L S C D C D D K F Y D C L K N S
961          991          1021          1051
GCG GAC ACG ATT AGC TCG TAT TTC GTA GGG AAG ATG TAC TTC AAT CTG ATA GAC ACG AAG TGT TAC AAG CTG GAG CAT CCT GTC ACC GGG TGC GGT GAG AG* TAA G TGT GCG ATT TGC GTT
A D T I S S Y F V G K M Y F N L I D T K C Y K L E H P V T G C G E R *

1081          1111          1141          1171
TAC *AA TCT TTC GAA TCA TGT GAA ACA TGT GAA AGT GAG ACG GAG AAT ACG AAA GTT GTT TTA AAC TTG ATT TCA ACC TTT CCT GAT GAT CCT GGT GGA ACC GAG GGT GGT CTT CAC
R T E G R C L H

1201          1231
TAC ACC GTG GAC AAA AGC AAA CCG AAA GTG TAC CAA TGG TTC GAT CTT CCG AAG TAT TGA TA
Y T V D K S K P K V Y Q W F D L R K Y *

```

Secuencia donadora	Intrón no.	Longitud	Secuencia aceptora	aa interrumpido
TCCAGgtata	I	82	gtcagGAACG	Gly 5
ACCGgttcc	II	494	aacagGTGT	Arg 58
GAGAGgtaag	III	115	ggtagAACCG	Arg 108

Figura 15. Alineamiento de secuencias nucleotídicas de genes correspondientes a fosfolipasas del grupo III. Las secuencias nucleotídicas obtenidas se alinearon con los aminoácidos deducidos que se presentan por debajo de los exones. El codón de stop es marcado por asteriscos. Las secuencias exón/intrón (GT/AG) se muestran en negritas. A) corresponde al gene obtenido a partir del DNA genómico de *A. phaiodactylus* B) corresponde al gene obtenido con oligos específicos de la fosfolipasa A₂ purificada de abeja (AAL30844).

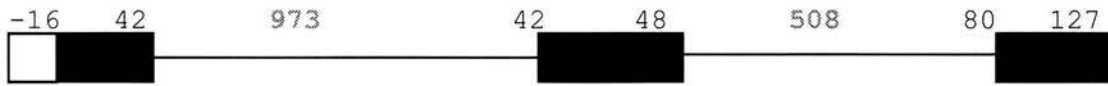
En la figura 16 se muestra de forma esquemática la estructuración de los genes de las regiones codificantes de fosfolipasas A₂ de diferentes fuentes, pertenecientes a los grupos I, II, III y XII. De forma interesante el arreglo de exones e intrones se conserva en fosfolipasas A₂ del grupo III provenientes de abeja y alacrán.

El último exón de la fosfolipasa Phaiodactylipina y de la isoforma 2328 codifica para la subunidad pequeña después de que el gene es interrumpido por un intrón de 200 pb. El intrón número 2 de la fosfolipasa de abeja es considerablemente más grande que el de la Phaiodactylipina. Comparando la estructura del gene de la Phaiodactylipina, con fosfolipasas de los grupos I, II, y XII podemos destacar que presenta un intrón extra en la región carboxilo terminal, la cual se sabe que es una zona de alta variabilidad y de la cual depende la amplia gama de efectos farmacológicos de las fosfolipasas (Kini y cols., 1987, y Singh, y cols., 1998). Sin embargo el gene humano (hGIII) tiene una estructura genómica totalmente diferente.

Se conoce que la remoción de intrones de proteínas codificantes es un evento menos frecuente que las mutaciones puntuales (Brown y cols., 1995), indicando que los genes que provienen de ancestros similares, conservan su patrón estructural. Esto sugiere que la fosfolipasa de alacrán es homóloga a la fosfolipasa de abeja en cuanto a la disposición de intrones y exones proponiéndose que estas comparten un ancestro común cercano. Sin embargo estas fosfolipasas se encuentran estructuradas de forma diferente a la fosfolipasa de *Drosophila melanogaster*. Debido a que los tres organismos pertenecen al phyla artrópoda, se podría suponer que los genes codificantes para fosfolipasas A₂ de estos tres organismos tuvieran una disposición exon/intrón similar, sin embargo la fosfolipasa de *Drosophila melanogaster* difiere notablemente ya que solo presenta un intrón. Lo que se debe de enfatizar es que la falta de homología en cuanto a organización génica no es evidencia para decir que las tres proteínas carecen de homología ya que las secuencias primarias y su función son similares.

Grupo I

Naja naja sputatrix (Familia Elapidae, subfamilia Bungarinae)



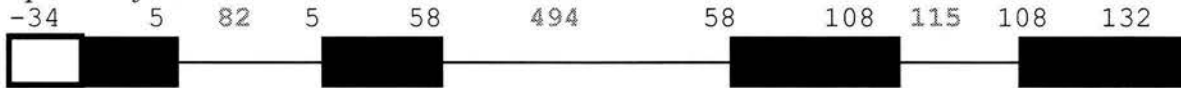
Grupo II

Crotalus scutulatus Mojave toxina b (Familia Viperidae, Subfamilia Crotaline)

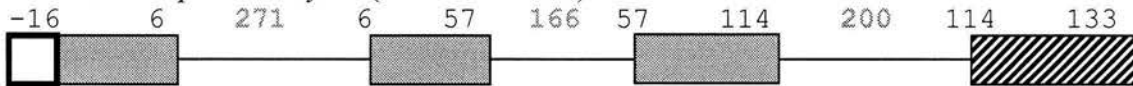


Grupo III

Apis mellifera



Anuroctonus phaiodactylus (Familia Iuridae)



hGIII (Fosfolipasa humana)



Grupo XII

Drosophila melanogaster



Figura 16. Representación esquemática de las estructuras de fosfolipasas A₂ de los grupos I, II, III y XII. Los intrones se muestran como líneas negras y los exones como cuadros negros, la longitud de los intrones se indica en pares de bases, los números de los exones indican la posición de los aminoácidos intervenidos. Los cuadros blancos representan la región 5' anterior al amino terminal de las fosfolipasas mostradas. En color gris tenue se muestra los exones que conforman la subunidad grande y en rayas se muestra el exón que codifica para la subunidad pequeña de la Phaiodactylipina.

6.2.4 Búsqueda de receptores

Los péptidos marcados y la fosfolipasa marcada fueron probadas con éxito en membranas de acocil siguiendo un protocolo de unión tipo Bosan (Bosch, D., 1994). Los resultados más interesantes fueron obtenidos con los tejidos 3 y 4, que corresponden al nervio de los ojos y el músculo del cuerpo de los acociles. Como se observa en la figura 17 encontramos diversas marcas de entre 200 KDa hasta 40 KDa. El control fue colocado en exceso para comprobar que no hubiese biotinylación endógena.

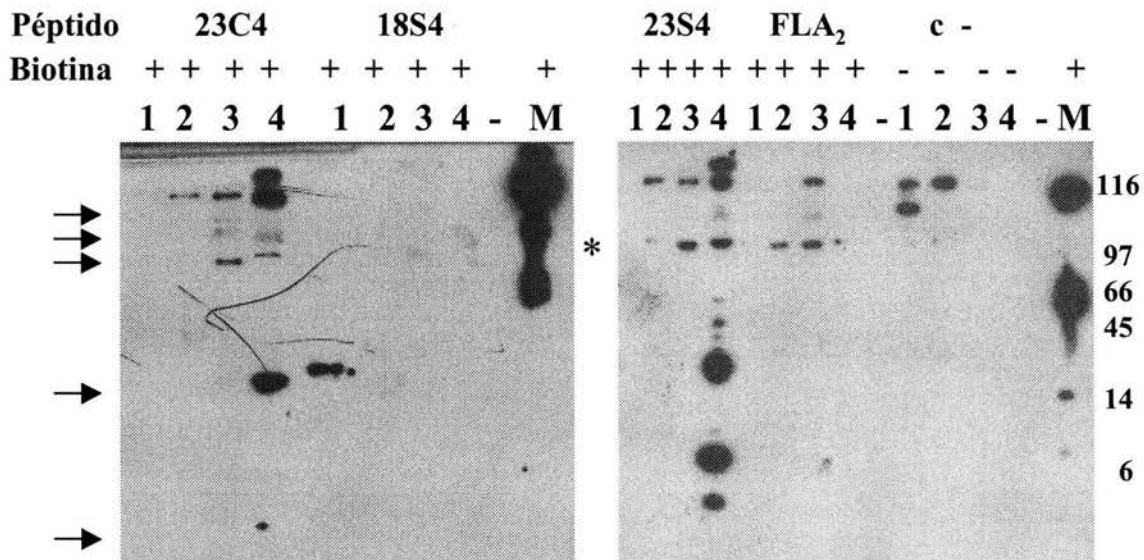


Figura 17. Transferencia tipo Bosan en membranas de acocil con péptidos sintéticos 18S4, 23S4 y 23C4 marcados con biotina. 10 nmoles de cada péptido fue aplicado en cada experimento. El número de tejido corresponde a: 1, músculo de la cabeza; 2, intestino; 3, nervio de ojos; 4, músculo de cuerpo. Los signos positivos indican biotinylación, en la parte superior se muestra el péptido probado y como control negativo (c-) se se aplicaron 4 veces más de tejido que el aplicado con los péptidos. La flechas indican las bandas que dieron señal de biotinylación.

Además de los experimentos tipo Bosan realizamos un experimento tipo “Ligand-blot”, sin embargo encontramos que al separar las proteínas de membranas de acocil en un gel en condiciones desnaturizantes y al ser transferidos a una membranas de nitrocelulosa, los péptidos marcados no son capaces de reconocer ninguna proteína.

Este resultado indicó que los péptidos estaban reconociendo un epítipo estructural. Entonces seguimos con ensayos de competencia utilizando los péptidos sintéticos marcados mezclados con péptido sintético no marcado a la misma concentración, los cuales fueron mezclados con los diferentes tejidos por una hora en solución de unión. Posteriormente se realizaron los lavados de los productos del reconocimiento por centrifugación y se aplicaron en un gel de agarosa al 9% en condiciones desnaturizantes. Aplicamos como controles positivos los péptidos marcados con biotina y como se puede apreciar existe una disminución importante de la marca de biotina cuando se adiciona péptido no marcado (Fig. 18). Como se observa el componente 18S4 y 23S4 presentan una competencia por el péptido no marcado importante, principalmente se observa la disminución de marca de biotina en una proteína de alrededor de 200 KDa en los tejidos 2, 3 y 4.

Los resultados obtenidos nos llevan proponer que realmente existe un sitio de pegado. Sin embargo para finalizar este experimento habrá que realizar más ensayos de competencia para determinar la constante de disociación de los péptidos sintéticos, así como purificar la proteína que está siendo reconocida.

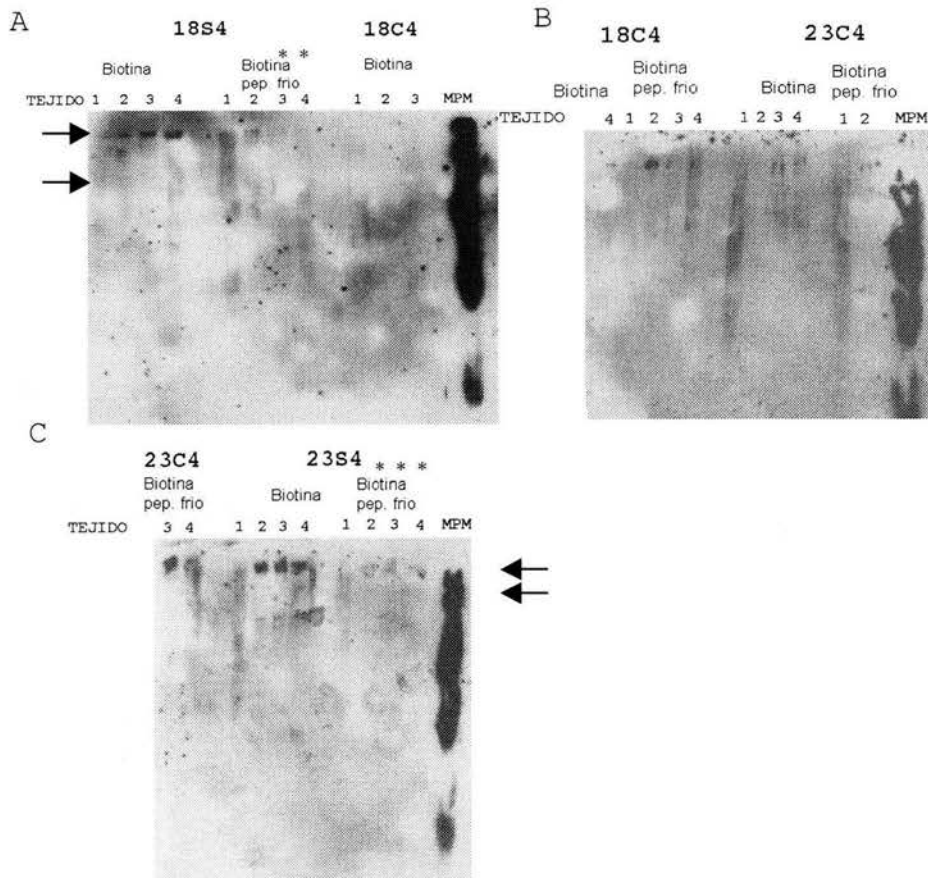


Figura 18. Transferencia tipo Bosan de péptidos sintéticos 18S4, 18C4, 23S4 y 23C4 marcado con biotina y en competencia con péptido sintético sin marca. 10 nmoles de cada péptido fue aplicado en cada experimento, la competencia de péptido marcado y no marcado se realizó en concentraciones 1:2. El número de tejido corresponde a: 1, músculo de la cabeza 2, intestino 3, nervio de ojos, 4, músculo de cuerpo. A, B y C) Películas de revelado de la unión del péptido marcado en la parte superior de las figuras. Los controles positivos se marcan con el nombre biotina y el ensayo de competencia con biotina, pep. frío. Cada ensayo se realizó con cada uno de los tejidos descritos. Las flechas marcan las bandas que desaparecen cuando se hacen los ensayos de competencia. Los péptidos que mostraron competencia fueron: 18S4 y 23S4.

6.2.5 Expresión de la fosfolipasa *Phaiodactylipina* fusionada a la proteína *Trp-LE* en *E. coli* recombinante

El gene codificante para la *Phaiodactylipina* fue clonado en el vector pPI-3 (Fig. 19A) y se transformaron bacterias *E. coli* W311. Estas clonas fueron crecidas en matraces de los cuales se obtuvo una densidad óptica promedio de (0.2) dilución 1:100 medida a 620 nm que equivale a 3 g/L. La concentración promedio de proteína fusionada y la del lavado fue de 300 mg/L. El

precipitado fue resuspendido y separado en un gel de agarosa al 15% que es el que se muestra en la figura 19B. Como se observa la proteína de fusión se halla enriquecida. La separación fue transferida a una membrana de PVDF y la banda correspondiente a la proteína de fusión fue cortada y mandada a secuenciar. Hasta ahora comprobamos la existencia de la proteína de fusión por secuenciación directa la cual corresponde a la secuencia de la proteína Trp-LE. Sin embargo cuando la membrana se sometió a proteólisis con Bromuro de cianógeno la proteína correspondiente a la Phaiodactylipina no pudo ser separada con éxito. Lo que sugiere realizar otra construcción en otro vector para que la proteína sea expresada sola o en un sistema en el que la separación de la proteína de fusión a la cual se encuentre la fosfolipasa sea eficiente.

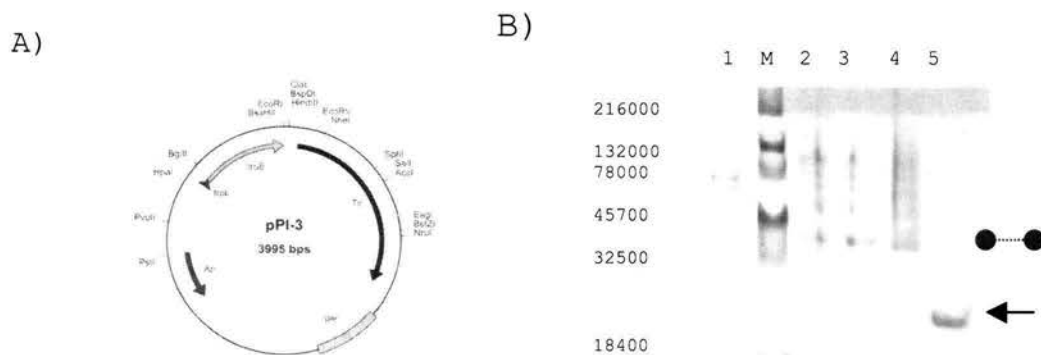


Figura 19. Expresión de la fosfolipasa Phaiodactylipina fusionada a la proteína Trp-LE. A, Mapa del vector utilizado para insertar el gene codificante para la Phaiodactylipina. B, Análisis de la separación de proteína producida en *E. coli* W3110. 1, Extracto de las células transformadas con la construcción, 2, 3 y 4, fracción enriquecida de cuerpos de inclusión después de haber sido sonicados y centrifugados, la proteína de fusión Trp-LE y FLA se hallan marcadas con una línea entre dos puntos. 5, extracto de fracción enriquecida solo con proteína de fusión Trp-LE (marcada con una flecha negra), M marcador de peso molecular (calidoscopio- Bio-Rad).

Por otro lado para comprobar que la Phaiodactylipina estaba siendo expresada, se produjeron anticuerpos murinos anti-subunidad pequeña, usando una nueva estrategia descrita en materiales y métodos. El reconocimiento de los anticuerpos fue probado con la subunidad pequeña mediante ensayos de ELISA los cuales fueron positivos, posteriormente se hizo realizó una transferencia a una membrana de PVDF de la fracción I del veneno del alacrán *Anuroctonus phaiodactylus*, en la

cual se halla la Phaiodactylipin y otras fosfolipasas, y se puso en contacto con los anticuerpos, en dicho experimento obtuvimos resultados positivos. Sin embargo, cuando el anticuerpo fue probado con la de proteína de fusión transferida, en PVDF no encontramos señal. Lo que nos lleva a proponer que la proteína de fusión y la subunidad grande de la enzima que son de tamaño considerable (30 KDa y 12 KDa respectivamente) pueden estar interfiriendo con el reconocimiento del anticuerpo por la subunidad pequeña que es de tan solo 18 aminoácidos.

7 CONCLUSIONES

De manera general podemos concluir que los resultados del presente trabajo enriquecen el conocimiento acerca de las fosfolipasas del grupo III, las cuales han sido las menos estudiadas comparando con fosfolipasas de los grupos I y II provenientes del veneno de serpientes y endógenas de mamífero. Particularmente describimos el aislamiento y caracterización de una nueva fosfolipasa A₂ a la cual denominamos Phaiodactylipina.

La Phaiodactylipina es una enzima heterodimérica cuyo peso molecular es de 19,172 a.m.u., la cual está conformada por una subunidad de 108 aminoácidos y otra de 18 aminoácidos unidas por un puente disulfuro. La Phaiodactilipina durante su maduración sufre dos eventos de modificación postraducciona, un corte interno de un hexapéptido el cual separa las dos subunidades y un evento de glicosilación. La molécula presenta 3 sitios putativos de glicosilación y uno de ellos fue determinado en el presente trabajo por análisis de espectrometría de masas, concluyendo que se conforma por dos N-acetil-hexosas, tres hexosas y dos deoxihexosas. Este hallazgo fue importante ya que la fosfolipasa de abeja era la única fosfolipasa del grupo III conocida, que presentaba este tipo de modificación.

La Phaiodactylipina es letal para insectos y crustáceos, a concentraciones mayores de 20 µg/20 g de ratón no es tóxico para mamífero. Sin embargo, en músculo de ratón causa edema pero no citólisis como es reportado para otras fosfolipasas miotóxicas. Además presenta actividad hemolítica directa sobre eritrocitos humanos y retarda el tiempo de coagulación por minutos cuando es adicionada a preparaciones de plasma rico de plaquetas y pobre de plaquetas separadas de suero humano.

La Phaiodactilipina tiene una actividad enzimática de 172 U/mg, su actividad catalítica depende de Ca²⁺ a concentración mM, su pH óptimo es de 8.0, a temperatura ambiente la actividad se reduce hasta un 75%, así como cuando se aplica 1% Tritón X-100 al medio. Además presenta preferencia

lipídica cuando la posición sn-2 de los fosfolípidos ensayados se halla ocupada por ácido araquidónico y cuando la posición 3 se halla ocupada por FC o FE y menor proporción FS.

La Phaiodactilipina guarda 50% y 61% de similitud con la FLA₂ Imperatoxina I y Fosfolipina respectivamente, ambas caracterizadas del veneno del alacrán *Pandinus imperator*. Sin embargo con la fosfolipasa de abeja y Heloderma solo guarda el 43% y 40% respectivamente.

Además de la fosfolipasa Phaiodactylipina existen otros cuatro componentes que presentan actividad fosfolipásica A₂. Además cinco isoformas de la fosfolipasa Phaiodactylipina fueron encontradas a partir de cDNA.

El arreglo estructural de los genes encontrados es diferente a la disposición de exones/intrones que se conocen de fosfolipasas A₂ de los grupos I, II y XII. La estructura genómica de la Phaiodactylipina que corresponde a la secuencia codificante se halla interrumpida por tres exones al igual que la fosfolipasa de abeja, lo que indica que estas enzimas tuvieron un ancestro común muy similar. De forma interesante el gene de la fosfolipasa de *Drosophila* no presenta esta organización exón/intrón, a diferencia de las fosfolipasas aisladas de venenos de serpientes, las cuales se hallan intervenidas por dos exones. Es importante resaltar que la subunidad pequeña se halla bien definida en el último exón del gene, la cual se encuentra separada de la subunidad grande por el tercer intrón.

Durante la realización de este trabajo y datos no publicados de otros investigadores dedicados al campo de las fosfolipasas A₂ provenientes de venenos de alacranes, sabemos que este tipo de moléculas se encuentran en alacranes que no son tóxicos a mamíferos como es el caso de los alacranes *Anuroctonus phaiodactylus*, *Pandinus imperator*, *Vejovis mexicanus mexicanus* y *Hadrurus aztecus*.

La distribución del alacrán *Pandinus imperator* de África y de la especie *Anuroctonus phaiodactylus* de Baja California es muy distante, sin embargo conservan en su veneno fosfolipasas A₂ lo que indica que esta molécula es importante en la composición de venenos de la familia

filogenéticamente más reciente (Diplocentroide). Es interesante notar que los venenos de los alacranes *Pandinus imperator* y *Anuroctonus phaiodactylus* tienen varias de estas moléculas. La Phaiodactylipina es tóxica para insectos y crustáceos por lo que todos estos datos indican que esta molécula es necesaria para asegurara la sobrevivencia de estos artrópodos.

En el trabajo descrito en ésta tesis se presentan un gran número de datos relevantes acerca de la bioquímica, genómica del veneno de alacranes procedentes de Baja California Norte y California. Se caracterizó la enzima Phaiodactylipina, se estudió una toxina que afecta el canal de sodio para/tipE de insecto, que presenta una estructura diferente a las toxinas que reconocen a canales de sodio conocidas de venenos de alacranes pertenecientes a la familia Buthidae, purificada a partir del veneno del alacrán *Anuroctonus phaiodactylus*. Por otro lado se caracterizaron distintos genes que codifican para toxinas específicas para canales de sodio y de potasio tipo ERG del veneno de alacranes *Centruroides exilicauda* Wood y *Centruroides sculpturatus* Ewing, así como la evolución de las dos últimas especies mencionadas.

8 PERSPECTIVAS

De acuerdo a los resultados obtenidos hasta ahora, el punto más importante por determinar es que proteína o proteínas están interactuando con la fosfolipasa Phaiodactylipina y con la subunidad pequeña, y si esta subunidad está participando como guía de la subunidad grande sobre membranas de insecto y crustáceo. Esto se puede determinar continuando con los experimentos ya descritos en la sección 6.2.4. Hasta ahora sabemos que tanto la Phaiodactylipina como el péptido 18S4 son tóxicos para insectos y crustáceos, sin embargo queda una pregunta interesante por resolver que es ¿En que forma la Phaiodactylipina y los péptidos sintéticos están actuando sobre dicho sistema?.

Por otro lado el efecto sobre músculo de ratón en el cual causa inflamación es interesante como modelo de estudio, ya que sería importante saber si a este nivel también existe un receptor unido a una serie de señales que desencadenan la inflamación, sistema que ya ha sido descrito para fosfolipasas del grupo II, las cuales actúan sobre el receptor tipo M que se encuentra en músculo.

El péptido sintético 18S4 nos puede ayudar también en el estudio del modelo en el que la fosfolipasa pudiera actuar desencadenando una reacción alérgica ya que al ser inyectada causa inflamación, el piquete del alacrán causa dolor y el péptido sintético 18S4 produce escozor en ratones y en piel humana. Con dicha información se propone hacer estudios de degranulación aplicando el veneno, la fosfolipasa y los péptidos sintéticos sobre células cebadas y midiendo la liberación de histamina.

La expresión de la fosfolipasa Phaiodactylipina ayudaría para determinar la estructura terciaria, lo cual sería una contribución importante en cuanto a la molécula misma así como para conocer si la subunidad pequeña que acompaña a la subunidad grande está realmente expuesta, como en el caso de la fosfolipasas β -bungarotoxina para que funcione como ancla.

Los estudios propuestos son relevantes para el estudio de nuevos mecanismos en los que pueden participar las moléculas contenidas en los venenos de alacranes.

9 BIBLIOGRAFIA

- Atherton, E., and Sheppard, R. C., (1989) Solid phase peptide synthesis. Oxford University ed. Cambridge UK. pp. 13-23
- Arni, R. and Ward, R., (1996). Phospholipase A2-A structural review. *Toxicon*. 38 (8): 827-84.
- Batista C.V., Gomez-Lagunas, F., Rodriguez de la Vega, R. C., Hajdu, P., Panyi, G., Gaspar, R., Possani, L. D., (2002). Two novel toxins from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* that block Kv1.3 and Shaker B K⁽⁺⁾-channels with distinctly different affinities. *Biochim Biophys Acta*.1601: 123-131.
- Benishin, C. G., (1990). Potassium channel blockade by the B subunit of beta-bungarotoxin. *Mol. Pharmacol.* 38: 164-169.
- Bon, C. Changeux, J. P., Jeng, T. W., and Fraenkel-Conrat, H. (1979). Postsynaptic effects of crotoxin and its isolated subunits. *Eur. J. Biochem.*, 99: 471-481
- Bosch, D., Schipper, B., van der Kleij, H., de Maagd, R. A., Stiekema, W. J., (1994). Recombinant *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with new properties: Possibilities for resistance management. *BIO/TECHNOLOGY*. 12: 915-918.
- Brown, P. P., Whittaker, A.J., Newell, W. R., (1995) Identification and analysis of multigene families by comparison of exon fingerprints. *J Mol Biol.* 249: 342-59.
- Canaan S, Zadori Z, Ghomashchi F, Bollinger J, Sadilek M, Moreau ME, Tijssen P, Gelb MH. (2004) Interfacial enzymology of parvovirus phospholipases A₂. *J Biol Chem*. [Epub ahead of print]
- Capper Elizabeth A. Marshall Lisa A. Mammalian phospholipases A2: mediators of inflammation, proliferation and apoptosis. *J. Progress in lipid research*. 40: 167-197
- Carbone, E., Wanke, E., Prestipino, G., Possani, L. D., and Maelicke, A., (1982). *Nature (LOND)* 296: 90-91.
- Caterall, W. A. (1980). Neurotoxins that act on voltage sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20: 15-43.
- Chang, C. C., Lee, C.C., Eaker, D., and Fohlman, J., (1977). The presynaptic neuromuscular blocking action of taipoxin. A comparison with β -bungarotoxin and crotoxin. *Toxicon*. 15: 571-576.
- Chang, C. C. (1985) Neurotoxins with phospholipase A₂ activity in snake venoms. *Proc. Natl Sci. Counc. B. ROC* 9, 126-142.
- Chen, J., Shao, C., Lazar, V., Srivatava, C. H., Lee, W. H. and Tischfield, J., (1997). Localization of group IIC low molecular weight phospholipase A₂ mRNA to meiotic cells in the mouse. *J. Of cellular Biochemistry*. 64: 369-375.
- Chien-Chen, L., and Guor-Rong, H. (2002) Analysis of N-glycosylation of phospholipase A from venom of 2 individual bees by microbore high-performance liquid chromatography electrospray mass spectrometry using an ion trap mass spectrometer. *J. Chrom. B.* 766: 243-250.
- Chirwing, J. M., Przybyla, A. E., McDonald, R. J., and Rutter, W. J., (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from source enriched in ribonuclease. *Biochem.* 18: 5294-5299.
- Chu Y., Chang L., (2002). The organization of the genes encoding the A chains of β -bungarotoxins: evidence for skipping of exon. *Toxicon*, 40: 1437-1443.
- Chuang, R.S., Jaffe, H., Cribbs, L., Perez-Reyes, Swartz, K.J., (1998). Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. *Nat. Neurosci.* 1: 668-674.
- Conde, R., Zamudio, F., Becerril, B., Possani, L., (1999). Phospholipin, a novel heterodimeric phospholipase A₂ from *Pandinus imperator* scorpion venom. *FEBS letters*. 460: 447-450.
- Condrea, E., Fletcher, J. E., Rapuano, B.E., Yang C.C. & Rosenberg P.(1981a) Dissociation of enzymatic activity from lethality and pharmacological properties by carbamylation of lysines in *Naja nigricollis* and *Naja naja atra* snake venom phospholipases A₂. *Toxicon*. 19: 705-20.

- Condrea, E., Yang, C. C., and Rosenberg, P., (1981b). Lack of correlation between anticoagulant activity and phospholipid hydrolysis by snake venom phospholipases A₂. *Thromb. Haemost.* 45: 82-85.
- Corona, M., Valdez-Cruz, N. A., Merino, M., Possani, L. D., (2001). Genes and peptides from the scorpion *Centruroides sculpturatus* Ewing, that recognize Na⁺-channels. *Toxicon* 39:1893-1898.
- Cupillard, L., Koumanov, K., Mattéi, M. G., Lazdunski, M. and Lambeau, G., (1997) Cloning chromosomal mapping and expression of a novel human secretory phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 272: 15745-15752.
- Cormier, R. T., Hong, K. H., Halberg, R. B., Hawkins, T. L., Richardson, P., Mulherkar, R., Dove, W. F., Lander, E. S., (1997). Secretory phospholipase Pla2g2a confers resistance to intestinal tumorigenesis. *Nat Genet.* 17: 88-91.
- DeBin, J. A., Maggio, J. E., Strichartz, G. R., (1993). Purification and characterization of chlorotoxin, chloride channel ligand from the venom of the scorpions. *Am. J. Physiol. Soc.* 264: C361-C369.
- Delot, E., and Bon, C., (1993). Model for interaction of crotoxin, a phospholipase A₂, neurotoxin, with presynaptic membranes. *Biochemistry.* 32: 10708-10713.
- Dennis, E. A., (1997) The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem Sci.* 22:1-2
- Felsenstein, J., (1995). PHYLIP (Phylogeny Interference Package), version 3.57c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA.
- Fenard D., Lambeau, G., Valentin, E., Lefebvre, J., Lazdunski M., and Doglio, A., (1999) Secreted phospholipases A₂, a new class of HIV inhibitors that block virus entry into host cells. *J Clin Invest*, 104, 611-618
- Francis, B., Gutierrez, J. M., Lomonte, B., and Kaiser, I. I. (1991) Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom is a lysine 49 phospholipase A₂. *Arch. Biochem. Biophys.* 284: 352-359.
- Fenard, D., Lambeau, G., Maurin, T., Lefebvre, J. C., Doglio, A., (2001). A peptide derived from bee venom-secreted phospholipase A₂ inhibits replication of T-cell tropic HIV-1 strains via interaction with the CXCR4 chemokine receptor. *Mol Pharmacol.* 60:341-7.
- Fet, V., Sissom, W. D., Lowe, G., Braunwalder, M. E., (2000). Catalog of the scorpions of the world. The New York Entomological Society, New York. pp 1758-1998.
- Gutiérrez, J. M. and Lomonte, B., (1995). Review article. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon.* 33:1405-1424.
- Habermann, E. and Hardt, K.L., (1972). A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. *Anal. Biochem.* 50:163-173.
- Harwig, S. S., Tan, L., Qu, X. D., Cho, Y., Eisenhauer, P. B., Lehrer, R. I., (1995) Bactericidal properties of murine intestinal phospholipase A₂. *J Clin Invest.* 95:603-10.
- Harris, J. B., Karlsson, E., and Thesleff, s., (1973). Effects of an isolated toxin from Australian Tigre sanke (*Notechis scutatus scutatus*) venom at the mammalian neuromuscular junction. *Br. J. Pharmacol.* 47:141-146.
- Hiraoka, M. A. A. and Shayman, J. A., (2002). Cloning and characterization of a lysosomal phospholipase A₂, 1-O-acylceramide synthase. *J Biol Chem.* 277:10090-10099.
- Jacques, C., Bereziat, G., Humbert, L., Olivier, J. L., Corvol, M. T., Masliah, J., Berenbaum, F., (1997). Posttranscriptional effect of insulin-like growth factor-I on interleukin-1beta-induced type II-secreted phospholipase A₂ gene expression in rabbit articular chondrocytes. *J Clin Invest.*; 99:1864-72.
- Kalapothakis, E., Penaforte, C. L., Beirao, P. L., Romano-Silva, M. A., Cruz, J. S., Prado, A. M., Guimaraes, P. E. M., Gomez M. V., Prado, V. F., (1998). Cloning of cDNAs encoding neurotoxic peptides from spider *Pheneutria nigriventer*. *Toxicon*, 36:1843-1850

- Kini, R.M. & Evans H.J. (1987) Structure-function relationships of phospholipases. The anticoagulant region of phospholipases A₂. *J. Biol. Chem.* 262, 14402-14407.
- Kolko, M., DeCoster, M. A., de Turco, E. B. and Bazan, N. G., (1996). Synergy by secretory phospholipase A₂ and glutamate on inducing cell death and sustained arachidonic acid metabolic changes in primary cortical neuronal cultures. *J. Biol. Chem.* 271, 32722-32728.
- Kondo, K., Toda, H., Narita, K., and Lee, C., (1982a). Amino acid sequence of b-bungarotoxin from *Bungarus multicinctus* venom. The amino acids substitutions in the b chains. *J. Biochem.* 91: 1519-1530.
- Kondo, K., Toda, H., Narita, K. and Lee, C. Y., (1982b). Amino acid sequences of three b-bungarotoxins (β 3- β 5-bungarotoxin) from *Bungarus multicinctus* venom. Amino acid substitution in the A chains. *J. Biochem.* 91: 1531-1548.
- Krizaj, I., and Gubensek, F., (2000). Neuronal receptors for phospholipases A(2) and beta-neurotoxicity. *Biochimie.* 82: 807-14.
- Lambeau, G., Barhanin, J., Schweitz, H., Quar, J. Lazdunski, M., (1989). Identification and properties of very high affinity brain membrane-binding sites for a neurotoxic phospholipase from taipan venom. *J. Biol. Chem.* 264: 11503-11510.
- Lambeau, G., Schmid-Alliana, A., Lazdunski, M., y Barhanin, J., (1990). Identification and purification of a very high affinity binding protein for toxic phospholipases A₂ in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 265: 9526-9532.
- Lambeau, G., Barhanin, J., Lazdunski, M., (1991). Identification of different receptor types for toxic phospholipases A₂ in rabbit skeletal muscle. *FEBS. Letters.* 9: 29-33.
- Lambeau, G. y Lazdunski, M., (1999). Receptors for a growing family of secreted phospholipases A₂. *TIPS.* 20: 162-172.
- Lauritzen, I., Heurteaux C., Lazdunski M., (1994). Expression of group II phospholipase A₂ in rat brain after severe forebrain ischemia and in endotoxic shock. *Brain Res.* 651:353-6.
- Leung, S., Chen, X., Chu, K., Yuen, S., Mathy, J., Ji, J., Chan, A., Li, R., Law, S., Troyanskaya, O., Tu, I-P, Wong, J., So, S., Botstein, D., Brown, P., (2002). Phospholipase A₂ group IIA expression in gastric adenocarcinoma is associated with prolonged survival and less frequent metastasis, *PNAS*, 99(25): 16203–16208
- Lind, P. and Eaker, D., (1982) Amino-acid sequence of the alpha-subunit of taipoxin, an extremely potent presynaptic neurotoxin from the Australian snake taipan (*Oxyuranus s. scutellatus*). *Eur. J. Biochem.* 124: 441-447.
- Lobo de Araújo A., and Radvanyi, F., (1987). Determination of phospholipase A₂ activity by colorimetric assay us mg a pH indicator. *Toxicon* 1987: 25 (11): 1181-1188.
- Lomonte, B., Angulo, Y., Rufini, S., Cho, W., Giglio, J. R., Ohno M., Daniele, J. J., Geoghegan P., Gutierrez, J. M., (1999). Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A₂ on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells in vitro. *Toxicon.* 37: 145-58.
- McIntosh J., Gomaschi, F., Gelb, M., Dooley, D., Stehr, S., Giordani, A., Naisbitt, S., Olivera, B., (1995). Conodipine-M, a novel phospholipase A₂ isolated from the venom of the marine snail *Conus magus*. *J. Biol. Chem.*, 270: 3518-3526.
- Moreira, L. A., Ito, J., Goos, A., Devenport, M., Zieler, H., Abraham, E. G., Crisanti, A., Nolan, T., Catteruccia, F., Jacobs-Lorena, M., (2002). Bee venom phospholipase inhibits malaria parasite development in transgenic mosquitoes. *J Biol Chem.* 277: 40839-40843.
- Murakami, M., Tada, K., Nakajima, K., Kudo, I., (1997). Cyclooxygenase-2-dependent delayed prostaglandin D₂ generation is initiated by nerve growth factor in rat peritoneal mast cells: its augmentation by extracellular type II secretory phospholipase A₂. *J Immunol.* 159: 439-46.
- Olamendi-Portugal, T., García B.I., Lopez-Gonzalez, I., Van Der Walt, J., Dyason, K., Ulens, C., Tytgat, J., Felix, R., Darzon, A., Possani, L.D., (2002). Two new scorpion toxins that target voltage-gated Ca²⁺ and Na⁺ channels. *BBRC* 22: 562-568.

- Opperdoes, F.R. & Van Roy J. (1982) The phospholipases of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms and cultured procyclics. *Mol. Biochem. Parasitol.* 5, 309-19.
- Ownby, C., Powell, J. R., Jiang, M., and Fletcher, J. E., (1997). Melittin and phospholipase A₂ from bee (*Apis mellifera*) venom cause necrosis of murine skeletal muscle in vivo. *Toxicon* 35; 67-80.
- Possani, L. D. (1983). Las toxinas del veneno de alacranes: estructura y función. *Bol. Ins. Med. Biol. Mex.* Suplemento 32: 285-297.
- Possani, L. D., Brian, M. M., Yatani, A., Mochca-Morales, J., Zamudio, F., Gurrola, G., Brown, A., (1992). Isolation and physiological characterization of Taicatoxin, a complex toxin with specific effects on calcium channels. *Toxicon.* 30 (11):1343-1364.
- Possani, L. D., Mochca-Morales, J., Amezcua, J., Martín, B. M., Prestipino, G. and Nobile, M. (1992). Anionic currents of chick sensory neurons are affected by a phospholipase A₂ purified from the venom of the Taipan snake. *Biochim. Biophys. Acta.* 1134: 210-216
- Rodriguez De Turco, E. B., Jackson, F. R., DeCoster, M. A., Kolko, M. and Bazan, N. G. (2002) Glutamate signalling and secretory phospholipase A₂ modulate the release of arachidonic acid from neuronal membranes. *J. Neurosci. Res.* 68: 558-567.
- Rosenberg, P., (1990). Phospholipases. In handbook of toxinology. Edited by Thomas Shier and Dietrich Mebs. Marcel Decker, Inc. New York pp. 267-277.
- Rouault, M., Bollinger, J. G., Lazdunski, M., Gelb, M. H., Lambeau, G., (2003). Novel mammalian group XII secreted phospholipase A₂ lacking enzymatic activity. *Biochemistry.* 42:11494-503.
- Scott, D., Otwinowski, Gelb, M. H., and Sigler, P.B., (1990). Crystal structure of bee-venom phospholipase A₂ in a complex with a transition-state analogue. *Science*, 250: 1563-1566.
- Shiloah, J., Klibansky, C., de Vries, A. and Berger, A. (1973). Phospholipase B activity of a purified phospholipase A form *Vipera palestinae* venom. *J. Lipid Res.* 14: 267-278.
- Singh G., Gourinath S., Sharma S., Paramasivam M., Srinivasan A., & Singh T.P. (2001) Sequence and crystal structure determination of a basic phospholipase A₂ from common krait (*Bungarus caeruleus*) at 2.4 Å Resolution: Identification and Characterization of its Pharmacological Sites. *J. Mol. Biol.* 307, 1049-1059
- Sissom, W.D., (1990). Systematics, biogeography and paleontology. In Polis, G.A. (ed.), *The Biology of Scorpions*, Stanford University Press, Palo alto CA. pp. 64-160.
- Six, D.A. and Dennis, E. A., (2000). The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta* 1488, 1-19.
- Tang, L., Zhuo, Y., Lin, Z., (1998). Crystal structure of agkistrodotoxin, a phospholipase A₂-type presynaptic neurotoxin from *Agkistrodon halys pallas*. *J. Mol. Bio.* 282: 1-11.
- Tishfield, J.A., (1997) A reassessment of the low molecular weight phospholipase A₂ gene family in mammals. *J. Biol. Chem.* 272. 28: 17247-17250.
- Valentin, E. and Lambeau, G. (2000). Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A₂ and their receptors and binding protein. *Biochemical et Biophysical Acta.* 1488: 59-70.
- Van Deenen, L. L. M., and Den Haas, G. H. (1963) The substrate specificity of phospholipase A₂. *Biochem Biophys. Acta* 70: 538-553.
- Wang, H., Griffiths, M. N., Burton, D. R., and Ghazal, P., (2000). Rapid antibody responses by low dose, single step, dendritic cell targeted immunization. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 96: 847-852.
- Williams, S. C., (1980). Scorpions of Baja California, Mexico and adjacent islands. *Occasional papers of the California Academy of Sciences.* 135:127-113.
- Zamudio, F., Conde, R., Arevalo, C., Becerril, B., Brian, M., Valdivia, H., Possani, L., (1997). The mechanism of inhibition of Ryanodine receptor channels by Imperatoxin I, a heterodimeric protein from the scorpion *Pandinus imperator*. *J. Biol. Chem.* 272: 11886-11894.
- Zlotkin, E., Miranda F. and Roehat, H., (1978). In arthropods venom, ed. Bettini S. (Springer, Berlin) pp. 317-369.

10 ANEXO

EJB - The FEBS Journal

23 Feb 04

Reference no.: EJB-03-1213.R1

Title: Phaiodactylipin, a glycosilated heterodimeric phospholipase A2, from the scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*.

Authors: 1) Norma Valdez-Cruz 2) Cesar Batista 3) Lourival Possani

Editor: Ferdinand Hucho

Dear Prof. Possani

Thank you for sending electronic and hardcopies of the figures and the signed Copyright Assignment Form. I note your request to use the version of the text on the CD.

I am pleased to inform you that your manuscript is now ready for publication and will be forwarded to the publisher, Blackwell Publishing. A formal letter of acceptance will be sent by regular mail only on request.

Proofs will be sent to you as a PDF file attachment to email within 3 weeks. If you have not received them by this time, please contact the Production Editors at Blackwell Publishing on ejb@oxon.blackwellpublishing.com. It is important that these proofs are returned to Blackwell Publishing within 48 hours of receipt.

Please note that your manuscript will be published online shortly after you return your proofs at EJB OnlineEarly, which can be found at www.blackwell-synergy.com

Yours sincerely
Vanessa Wilkinson

Dr Vanessa Wilkinson
EJB - The FEBS Journal
98 Regent Street
Cambridge CB2 1DP, UK
Tel: +44 1223 369020
Fax: +44 1223 369090
E-mail: wilkinson@camfebs.co.uk

Phaiodactylipin, a glycosylated heterodimeric phospholipase A₂ from the venom of the scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*

Norma A. Valdez-Cruz, Cesar V. F. Batista and Lourival D. Possani

Department of Molecular Medicine and Bioprocesses, Institute of Biotechnology, National Autonomous University of Mexico, Cuernavaca, Mexico

Phaiodactylipin was purified from the venom of the scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*. It is the first protein to be purified from a scorpion of the family Iuridae and has a molecular mass of 19 172 atomic mass units. The mature protein is composed of two subunits, the large one consisting of 108 amino acid residues, whereas the small subunit has only 18 residues, and the structure is stabilized by five disulfide bridges. The heterodimer is expressed from a single message containing 769 base pairs and a signal peptide with 16 and/or 26 amino acid residues. During maturation an internal hexapeptide is excised. There are three putative sites of N-glycosylation, one of which is situated in the small subunit region. The carbohydrate composition of this site was determined by mass spectrometry analysis and was found to contain three hexoses, two N-acetyl-hexoses and two deoxyhexoses. The protein has a calcium dependent

phospholipase A₂ type of activity. It is lethal to arthropods (insects and isopods), but not toxic to mammals, using doses up to 20 µg per 20 g mouse body weight. For crickets, a dose of 5 µg per animal is lethal; however, when injected into mice it is capable of causing only muscular inflammation, without rupture of the basal membrane of cells. It has a direct hemolytic effect in human erythrocytes and retards the coagulation time of blood. It is an unusual phospholipase A₂, with only 36% and 50% amino acid sequence identities to the closest known phospholipases, imperatoxin I and phospholipin, respectively. Identities with bee and *Heloderma* venom phospholipase are only in the order of 28%.

Keywords: *Anuroctonus phaiodactylus*; carbohydrate; insect-toxin; phospholipase A₂; scorpion.

Scorpions, bees, snails, sea anemone and snakes have a complex mixture of deadly toxins that act on multiple sites of preys and/or predators. The venom of scorpions contains a large number of different bioactive components designed to ensure their survival, either helping to capture preys or defend themselves from predators. Among these compounds are toxic proteins (peptides and enzymes), carbohydrates, free amines, nucleotides, lipids and many other low molecular mass components of unknown function [1,2]. Some species have a rich content of phospholipases (PLAs) in their venoms. Phospholipase A₂ (phosphatide 2-acylhydrolase, EC 3.1.1.4) catalyzes the hydrolysis of the *sn*-2 acyl ester bond of phospholipids, resulting in the formation of lysophospholipids and free fatty acids. Phospholipase A₂s (PLA₂s) are ubiquitous in nature and especially abundant in snake venom, mammalian pancreatic juice and some other sources [3]. PLA₂s are classified into several

groups according to the alignments of their primary structures and the pattern of their disulfide bonds [4]. Although they share common catalytic properties and a high degree of similarities in the primary, secondary and tertiary structures, these enzymes manifest a wide variety of different pharmacological and biological activities. The most common are: inflammatory action, myonecrotic, blood platelet aggregation, hemolysis, neurotoxicity, cardiotoxicity and ion channel blocking activities [5]. PLA₂s from snake venom and mammals have been classified into groups I and II, and they all have common catalytic mechanisms and similar three-dimensional structures [4]. There are also two other distinct groups of secretory phospholipases, classified into groups III and IX; these are found in venomous animals, such as bees, scorpions, marine snails and jellyfishes. Some of these have been cloned and their three-dimensional structure has been solved, showing differences with those from group I and II, but conserving the Ca²⁺ binding sites and the same type of catalytic activity. PLA₂s from group III were isolated mainly from invertebrates, but recently were also found in mammals. They show significant similarity with the honeybee PLA₂ and with the scorpion imperatoxin I [6]. The human group III phospholipase is expressed in different tissues (kidney, heart, liver and skeletal muscle), however, its biological function is not clearly known [6]. For this purpose, the study of other similar phospholipases is necessary to understand the entire picture of the function of PLA₂s *in vivo*.

The aim of this communication is to report the isolation and characterization of a new glycosylated heterodimeric

Correspondence to L. D. Possani, Instituto de Biología UNAM, Avenida Universidad 2001, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca 62210, Mexico. Fax: + 52 77 73 172388, Tel.: + 52 77 73 171209, E-mail: possani@ibt.unam.mx

Abbreviations: a.m.u., atomic mass unit; HexNAc, N-acetyl hexose; IpTxI, imperatoxin I; PLA, phospholipase; PLA₂, phospholipase A₂; PRP, platelet rich plasma; PPP, platelet poor plasma.

Enzyme: phospholipase A₂ or phosphatide 2-acylhydrolase (EC 3.1.1.4).

(Received 22 December 2003, revised 30 January 2004, accepted 23 February 2004)

phospholipase A₂, denominated phaiodactylipin, which was obtained from the venom of the scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*, of Baja California, Mexico. Based on its structure and function, it is a special type of phospholipase. Several biochemical parameters, such as the lipidic preference of this enzyme are included. The carbohydrate composition of the small subunit was solved. Additional considerations of this communication include a phylogenetic comparison of this enzyme with phospholipase A₂ from various other sources.

Materials and methods

Venom collection and enzyme purification

The animals were collected on the hills of Maneadero, Baja California, Mexico. They were kept alive in the laboratory for more than one year and their venom was obtained monthly by mild electrical stimulation of the telsons. The venom was solubilized in distilled water, centrifuged at 15 000 g for 15 min and the supernatant was lyophilized and kept at -20 °C. When needed, samples of the dried material were dissolved in 20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.7 and separated by gel filtration into a Sephadex G-50 column (0.9 × 190 cm). The first fraction from this column containing phospholipase activity was further separated by HPLC using a semipreparative C18 reverse-phase column (Vydac, Hisperia, CA, USA). A Waters 600E HPLC apparatus, equipped with a Photodiode Array Detector 996 from Millipore (Milford, MA, USA) was used for separation. A linear gradient of solution A [0.12% (v/v) trifluoroacetic acid in water] to 60% solution B [0.10% (v/v) trifluoroacetic acid in acetonitrile], run for 60 min was able to resolve several subfractions. A pure protein eluting at 29.74 min of the chromatogram was finally obtained, by means of an analytical C18 reverse-phase column, and eluted with a linear gradient from 15% to 40% (v/v) solution B during 60 min. This protein was homogeneous, as described below, and was called phaiodactylipin.

Phospholipase assays and determination of A₂-type activity

During the purification steps the phospholipase enzymatic activity was followed using the egg yolk-agarose system [7]. The specificity of the enzyme activity, shown to be A₂-type, was determined with radioactively labeled substrates, according to the technique described by Opperdoes & Van Roy [8]. Labeled L-1,2-dipalmitoyl-[¹⁴C]-sn-2-palmitoyl phosphatidylcholine (27 nM concentration in a final volume of 20 μL) was incubated with approximately 1 μg pure enzyme in the presence of 10 mM Tris/HCl buffer, pH 8.0, and 0.04% (v/v) Triton X-100, at 37 °C. Aliquots were removed at different time intervals and the reaction was stopped by addition of 25 μL 5% (v/v) trifluoroacetic acid in n-butanol, linoleic free fatty acid (1 mg·mL⁻¹) and lysophospholipids (1 mg·mL⁻¹). The reaction products were separated by TLC and revealed with iodine. The positive spots were scraped out, recovered and the corresponding radioactivity measured in a Beckman LS 7800 counter.

Specific activity and substrate preference of Phaiodactylipin

One unit of enzymatic activity was defined as the amount of enzyme capable of hydrolyzing one micromole of phospholipids per minute at 37 °C (using egg yolk as substrate, diluted 1 : 20 in saline solution). The amount of fatty acids liberated was measured as equivalents of NaOH needed to maintain the pH around 7.5. The neutralization was obtained by the addition of increasing amounts of a 10 mM NaOH solution, according to the titration method of Shiloah *et al.* [9].

The specific activity was expressed as units of phospholipase activity per milligram of protein. The substrate preference of phaiodactylipin was measured as described by Lobo de Araújo & Radvány [10]. The solution was prepared by stirring different substrates at final concentration of 3.5 mM in 7 mM Triton X-100, 100 mM NaCl and 10 mM CaCl₂ using phenol red as marker. The pure substrates used were: 1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, 1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine], 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine], 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine]. The substrates were from Avanti Polar-Lipids Inc (Alabaster, AL, USA). All these solutions (1 mL) were incubated at room temperature (25 °C) and under nitrogen flow. The reaction was monitored after the addition of enzyme (2 μg), keeping the pH around 7.5, by titration with 10 mM NaOH.

Determination of the optimum pH activity and Ca²⁺ dependence of phaiodactylipin

Three different buffer solutions were prepared: 100 mM sodium acetate, pH 5.0, 100 mM Tris/HCl, pH 8.0 and 100 mM glycine/HCl, pH 10.0. The activity was measured at 37 °C in 10 mM CaCl₂, 7 mM Triton X-100, in a total volume of 250 μL, containing 3.5 mM of 1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, as substrate.

Neutralization was performed with the addition of 50 mM NaOH. For the determination of the calcium dependent activity of the enzyme, different amounts (from 0.1 to 10 mM) of CaCl₂ were used in the same experimental conditions as described earlier by Shiloah *et al.* [9].

Lethality tests

Phaiodactylipin, injected intraperitoneally into mice (CD1 strain) at doses up to 20 μg per 20 g mouse body weight, did not produce any symptoms of intoxication. However, insects and crustaceans injected with the enzyme showed various symptoms of intoxication, such as: salivation and/or regurgitation, partial paralysis of rear limbs, complete paralysis, upside down position in the case of crustaceans and death. The crickets used were *Achaeta* spp. and the crustaceans were *Armadillidium vulgare* (a very common isopod found in gardens around Cuernavaca City), also known by the trivial name of 'cochinilla' in Spanish or

'cochineal' in English. For the minimal lethal dose determination, crickets were injected with increasing amounts of toxin into the intersection of the body segments (second to the end) and the posterior leg, starting with 2 µg per insect. When crickets (body weight of 120 mg) were injected with 5 µg phaiodactylipin, all died (four out of four). The crustaceans used are smaller animals (weight 50 mg each) and were injected into the body (last couple of interdigits) with the fine needle of a Hamilton syringe. The lethal dose was reached when injecting 3 µg per animal (eight died out of eight injected). Control animals were injected with 3 µL of phosphate saline buffer, pH 7.4, showing no symptoms of intoxication.

Microsequencing

The primary structure was obtained by means of Edman degradation and mass spectrometry analysis. An automated apparatus, the Beckman LF 3000 Protein Sequencer (Palo Alto, CA, USA) was used for the Edman degradation, after adsorption of the sample into CD-Inmmobilon membranes, as described by the manufacturer. Enzymatic cleavage of phaiodactylipin was performed with four different endopeptidases: lysine-C (Lys-C), V8 from *Staphylococcus aureus* (Glu-C), Arginine-C (Arg-C), all from Boehringer (Mannheim, Germany) and trypsin (Promega, WI, USA), according to the protocols described by the manufacturers. After overnight incubation the reaction products were reduced with dithiothreitol for 30 min at 56 °C and separated by HPLC. Individual fragments were used either for direct sequencing or for mass fragmentation, as described below.

Mass spectrometry determination

The molecular mass of pure phaiodactylipin, its isolated subunits and carbohydrate moieties were determined by mass spectrometry analysis, using either an ESI MS or a MALDI-TOF MS apparatus.

For the ESI MS analysis, the samples were separated by gel electrophoresis, the corresponding bands were cut and digested *in gel* with trypsin (Promega, Madison, WI, USA) using the technique described by Shevchenko *et al.* [11]. The products were reconstituted to a final concentration of ≈ 500 pmol per 5 µL of water with 1% (v/v) acetic acid and applied directly into a liquid chromatographic system coupled with a Finnigan LCQ^{DUO} ion trap mass spectrometer (San Jose, CA, USA). For separation of the tryptic peptides a C18 reverse-phase (5 µm) capillary column (100 × 0.5 mm) from Vydac (Hisperia, CA, USA) was used, in which a gradient was run from 0% solvent A [0.12% (v/v) acetic acid] to 60% solvent B [acetonitrile with 0.10% (v/v) acetic acid] during 60 min. The eluate delivered from a Surveyor MS syringe pump at 10 µL·min⁻¹ was split in order to allow only 10% of the sample to enter the nanospray source (1.0 µL·min⁻¹). The spray voltage was set to 1.9 kV and the capillary temperature to 130 °C. For MSⁿ experiments, the fragmentation source was operated with 25 V of collision energy, 35–45% (arbitrary units) of normalized collision energy and the scan with wide band activated. All spectra were obtained in the positive-ion mode. For sequence determination, the MS/MS spectra

produced were analyzed manually and automatically by SEQUEST software. The acquisition and deconvolution of data were performed with the XCALIBUR software on a Windows NT PC data system. For the MALDI-TOF MS analysis a Voyager-DE PRO MALDI-TOF Workstation (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used, in the positive linear mode. The sample was spotted in triplicate onto the target at variable concentrations followed by addition of two different matrices: 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (sinapinic acid) and 2,5-dihydroxybenzoic acid. A nitrogen laser, at 337 nm, was used to desorb the samples with an intensity of 30% to 60% (arbitrary units). The data were analyzed with DATA EXPLORER® MS Processing Software.

Direct hemolysis determination

Human erythrocytes were separated from freshly collected human blood, washed and suspended in cold isotonic saline buffer containing 10 mM Tris/HCl, pH 7.4 [12]. The percentage of hemolysis was determined by measuring at 540 nm the amount of hemoglobin liberated from the erythrocyte suspension in the presence of various concentration of phaiodactylipin.

Plasma preparations and recalcification time

Human blood samples were drawn using 0.13 M Na/citrate as anticoagulant and centrifuged to obtain platelet rich (PRP) and poor (PPP) plasma, as described by Condrea *et al.* [13]. The aliquots of PPP were brought to 37 °C, and 0.1 mL of either 10 mM Tris/HCl buffer pH 7.4 (control sample) or 0.1 mL of the same buffer containing pure enzyme, were added and incubated for 60 s. The enzyme concentration for each condition was variable, starting at 2 µg per 0.55 mL. The plasmas were recalcified using 0.05 mL of CaCl₂ (0.25 M), kept at 37 °C and assayed for clotting by gentle tilting, every 15 s. Control samples clotted at 1 min and 51 s. Experiments were carried out in duplicate, with independent blood donors.

Edema analysis

Five micrograms of phaiodactylipin in 10 mM Na/phosphate, 0.15 M NaCl buffer, pH 7.4 (NaCl/P_i), were injected in one leg of a female mouse (CD1 strain), whereas in the other leg a control was injected of NaCl/P_i alone (volume 10 µL each). Two independent mice were used in order to have a duplicate of the same experiment. After 1 h, the mice were killed and the injected muscles were dissected and placed in dry ice for initial freezing, but later stored at -70 °C. Tissue samples were taken and prepared for microscopic analysis, using slices of 10 microns. The visualization of myocytes was performed after staining with hematoxylin-eosin using a light microscope (Zeiss, Axioskop), with 40× magnification.

Molecular cloning of the phaiodactylipin gene, from cDNA

The venomous glands (telson) from one scorpion were homogenized in the appropriate solution (RNAGents,

catalogue number Z5110) from Promega (Madison, WI, USA), for extraction of total RNA, according to the technique described by Chirwing *et al.* [14]. cDNA was obtained from total RNA using the oligonucleotide poliT22NN as described by Corona *et al.* [15]. For gene amplification the primers 5'-AATGGATGCTTTGGA GAG-3', 5'-TTCCTCATCGTACCAGAT-3', and 5'-ACA TCATCTCTCGCATACTTATT-3' were used. The PCR conditions used were: 94 °C for 180 s, one cycle; 94 °C for 30 s followed by 52 °C for 40 s, and 72 °C for 40 s repeated for 32 cycles; 72 °C for 420 s, one cycle. The product obtained from the amplification was cloned into an *EcoRV* site of the phagemid pKS- (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The resulting plasmid was transformed using *Escherichia coli* strain DH5 α . Recombinants were selected on Luria-agar plates supplemented with 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ampicillin. In order to obtain the full gene sequence, 5' RACE was performed. The RNA ligase mediated rapid amplification of cDNA ends (RLM-RACE) was performed using the protocol and kit from Ambion (Austin, TX, USA). The cDNA mix was synthesized from poly(A)⁺ mRNA using M-MLV reverse transcriptase. The cDNA was joined with the adaptor provided by the kit (5'-GCUGAUGGC GAUGAAUGAACACUGCGUUUGCUGGCUUUGA UGAAA-3') using T4 DNA ligase. The modified cDNA was used as template for PCR amplification. Two rounds of amplification with the primers from the kit (Ambion) 16 specific for the adaptor were used. In the first amplification we assayed the 5' RACE outer primer (5'-GCTGA TGGCGATGAATGAACACTG-3') and in the second, the 5' RACE inner primer (5'-CGCGGATCCGAACAC TGGCTTTGCTGGCTTTGATG-3'). The conditions for the PCRs were essentially identical than those described by the manufacturer's protocol (RLM-RACE first choice, catalogue number 1700, from Ambion).

Sequence comparison and phylogenetic tree

17 Sequence comparison and phylogenetic tree analysis were performed using the programs indicated in the figure legends (CLUSTAL-X from PHYLIP Package and TREE-VIEW from Glasgow University).

Results and discussion

Purification of phaiodactylipin

This novel heterodimeric phospholipase was isolated from the soluble venom of the Mexican scorpion *Anuroctonus phaiodactylus* by Sephadex G-50 and HPLC separations (Fig. 1). The Sephadex G-50 column provided four different fractions, from which fraction number I (Fig. 1A), showed phospholipase activity and was further separated by HPLC. The first HPLC separation in a semipreparative C18 reverse-phase column afforded at least 20 different components (Fig. 1B), from which three were positive for phospholipase activity (marked by asterisks). The fraction labeled with the arrow, eluting at 39 min, was further separated in a C18 analytical reverse-phase column (Materials and methods) giving the fractions shown in Fig. 1C, and the component labeled with an asterisk was 18 shown to be homogeneous. This was confirmed by several

independent methods: (a) one clear peak under rechromatography (inset Fig. 1C), (b) mass spectrometry data, giving a single molecular mass of 19 172 atomic mass units (a.m.u.), (c) SDS/PAGE with only one band (data not shown) and (d) sequence analysis of the product, discussed below. This fraction corresponded to $\approx 0.5\%$ of the total protein content of the soluble venom, but around 20% of the total phospholipase activity of the whole venom. It was called phaiodactylipin.

Chemical characterization of phaiodactylipin

A sample of the pure enzyme was loaded into the microsequencer, from which two different amino acid sequences were obtained in each cycle. This suggested that either the sample was contaminated by two distinct peptides, or that we had an heterodimer protein maintained by disulfide bridges, as found previously for Imperatoxin I (IpTxI) and Phospholipin [16,17]. The latter was confirmed by reducing the disulfide bridges with dithiothreitol and separating the pure component of Fig. 1C into the same system. The results are shown in Fig. 1D. The component eluting at 24.14 min corresponded to the small subunit, and that at 34.82 min to the large subunit. This was confirmed by mass spectrometry analysis of the first eluting peptide, the molecular mass of which was 3242.5 a.m.u., using the electrospray mass spectrometer. When loaded into the 20 sequencer it gave only one amino acid sequence per cycle from residues in position 1 up to 15 (Fig. 2A) with an N-terminal sequence that resembles that of the small subunits of the two previously purified heterodimeric phospholipases: IpTxI and Phospholipin. The large subunit from Fig. 1D, if dried by speed-vacuum, becomes insoluble. 21 However, knowing the amino acid sequence of the small subunit allowed us to obtain information on the sequence of the large subunit by exclusion from the double sequence found initially. This permitted us to identify unique residues up to position 35 (labeled 'direct', Fig. 2A). After residue 15 only one amino acid sequence was identified with each cycle of the Sequencer. Position 18, lately shown to be an asparagine was never directly seen in the microsequencing analysis, despite using several different samples prepared by different protocols. It appears that phaiodactylipin is glycosylated, and as this is one of the places involved in the carbohydrate linkage of the molecule, this is the reason it could not be seen. Figure 2A shows two amino acid sequences, the upper one (labeled cPha) corresponds to the sequence deduced from cDNA sequencing, whereas the second line (Pha) is the sequence determined directly from peptides obtained by enzymatic hydrolysis with endopeptidases Lys-C, V8, Arg-C and trypsin, as indicated. Approximately 70% of the full sequence was identified by direct automatic Edman degradation using peptide-fragments purified by HPLC after enzymatic hydrolysis (the HPLC data are not shown). The remaining 30% of the sequence was confirmed by means of mass spectrometry determination or by fragmentation (MS/MS) of the corresponding peptides, as also indicated in the figure. In order to align each one of the peptide-fragments obtained, we have cloned the gene coding for phaiodactylipin, (discussed below), confirming each one of the amino acids found and completing the full amino acid sequence of the toxin. The peptide labeled Trp/

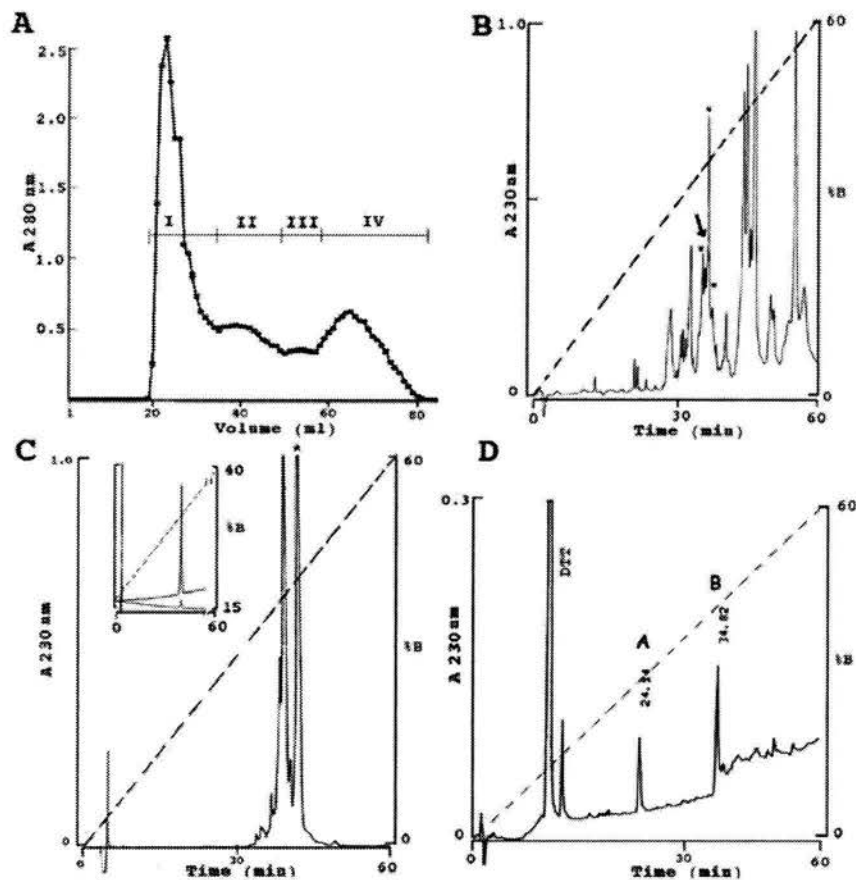


Fig. 1. Purification of phaiodactylipin and subunits. (A) The soluble venom from *Anuroctonus phaiodactylus* (61 mg of protein) was applied to a Sephadex G-50 column (0.9 × 190 cm), and fractions of 1 mL were collected and tested for their phospholipase activity. (B) Positive fraction I corresponds to approximately 60% of the material recovered. It was lyophilized and injected into an HPLC column (Materials and methods). The subfraction indicated by an arrow, between the first two asterisks, was the one chosen for further purification. (C) Separation of the previous components in a C₁₈ analytic reverse-phase column using similar conditions as (B), from which the component eluting at 40.53 min (labeled with an asterisk) was shown to be homogeneous (see inset). The gradient on the inset was run from 15 to 40% solution B, over 60 min, and the pure enzyme eluted at 29.74 min. (D) Separation of the two subunits of phaiodactylipin after reduction with dithiothreitol [same conditions as (B)]. A (elution time 24.14 min), corresponded to the small peptidic chain and B (eluting at 34.82 min) to the large one.

MS (residues D33 to K46) was obtained by mass spectrometry (expected molecular mass 1564.6 a.m.u., mass found experimentally 1564.5 a.m.u.). Three peptides from Lys-C hydrolysis were directly sequenced, and correspond to sequences from Y47 to N59, E72 to R82 and G85 to N99. From the same peptide that gave the sequence for Y47 to N59, MS/MS fragmentation allowed unequivocal identification of residues from Y47 to K71. In this segment a short overlapping peptide obtained by V8 cleavage, from E64 to D67, was also confirmed. The overlapping segment from residue Q83 to R104 obtained from trypsin cleavage was identified by MS/MS fragmentation (labeled Trp/MS/MS). The final C-terminal section of the large subunit, from residue L105 to K108, was obtained by sequencing a peptide obtained by enzymatic hydrolysis with Arg-C. The full sequence of the short peptide was obtained by a combination of direct sequencing and by MS/MS fragmentation.

The hexapeptide shown in bold in Fig. 2A, corresponding to positions 109–114, was never found, because it corresponds to the linking segment of both subunits, which is eliminated during the maturation process.

Cloning and sequencing phaiodactylipin from cDNA

Because we knew the N-terminal amino acid sequence of the toxin, the appropriate oligonucleotides were designed for cloning the gene that codes for phaiodactylipin. The first round of amplification was conducted with the oligonucleotide corresponding to the N-terminal sequence and the oligonucleotide T22NN. For the second PCR and for the 5' RACE, several specific primers were used as described in Materials and methods. Finally, a sequence containing 769 bp was obtained (Fig. 2B) including a stretch of sequence at the untranslated sequence of the 5' region (99 bp) and another at the 3' end (196 bp). The section in the middle coded exactly for the amino acid sequences expected from the mature protein, in which both subunits of phaiodactylipin are present, separated by a hexapeptide from residues in positions 109–114, which is eliminated during the maturation process, very similar to that described earlier for IpTxI and Phospholipin [16,17]. This confirms that both subunits are coded by a single RNA molecule, which is processed during maturation. In this manner the

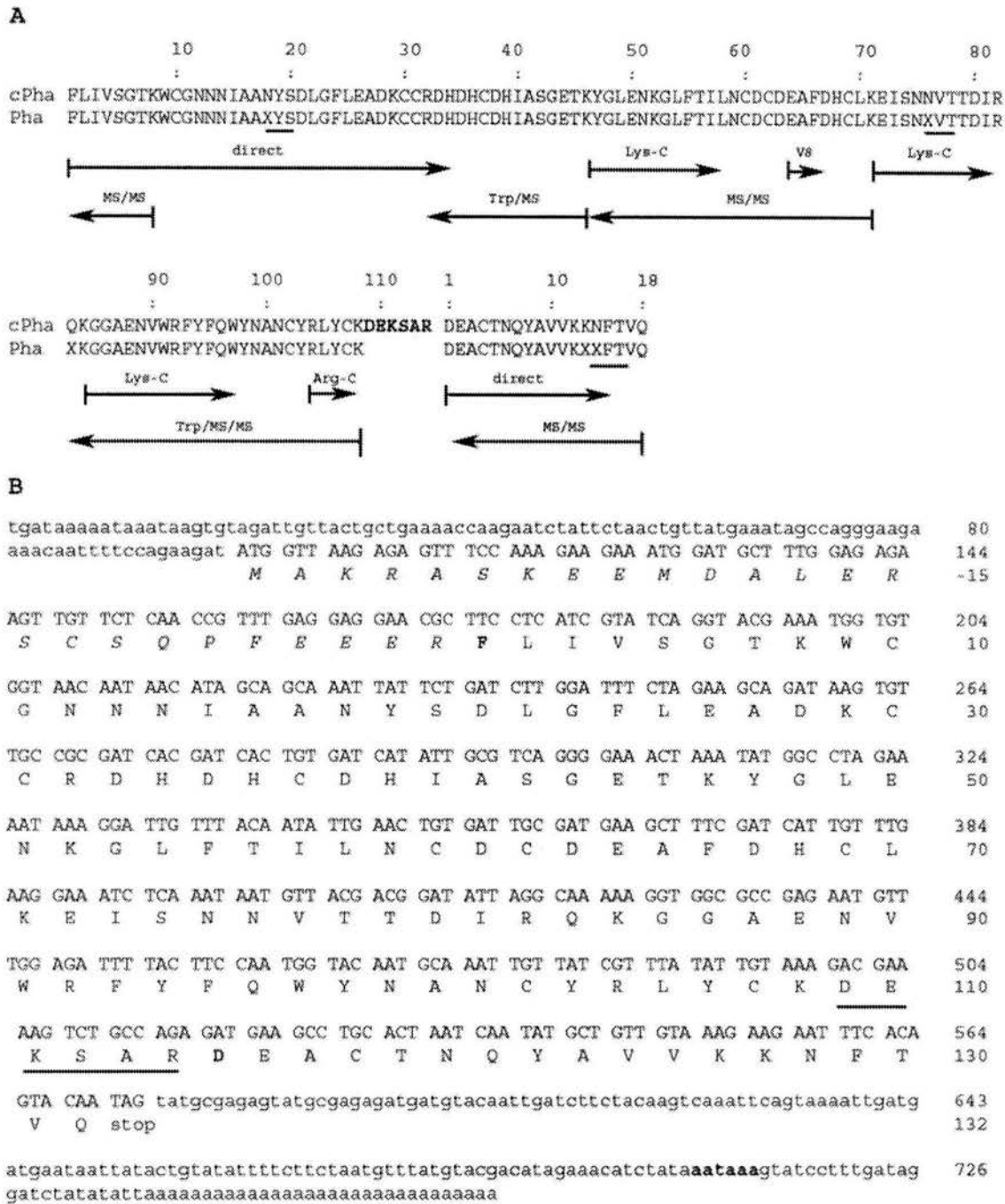


Fig. 2. Amino acid and nucleotide sequences of phaiodactylipin. (A) The first line labeled cPha shows the amino acid sequence of phaiodactylipin deduced from the cDNA sequence (B); the second line (labeled Pha) shows the primary structure obtained by automatic Edman degradation of the enzyme and/or the various peptide-fragments obtained by enzymatic hydrolysis, as indicated by the arrows below each segment (Direct, Lys-C, V8 and Arg-C). MS/MS indicates results obtained by mass spectrometry determination. Trp preceding MS indicates when the peptide was generated by tryptic digestion and HPLC purification, prior to mass determination. The numbers above correspond to the positions of the amino acid residues in the primary structure. The hexapeptide in bold was found only by nucleotide sequence. The short chain goes from position 1–18. (B) Nucleotide sequence of the cDNA gene of phaiodactylipin. The deduced amino acid sequence is shown below each codon. The putative signal peptide sequence, either from –25 or –16 to –1, is indicated in italic. The first amino acid of each subunit is in bold. The hexapeptide underlined is eliminated during the maturation process. Letters in lowercase correspond to the untranslated regions. The stop codon is indicated. Numbers on the right are indicative of base pair sequences and below each codon the corresponding amino acid residue from positions –1 to 132. The sequence of phaiodactylipin is deposited in GenBank (accession number xxxx).

full amino acid sequence of phaiodactylipin was identified, showing that the large subunit is composed by 108 amino acid residues and the short chain by 18 residues (Fig. 2B), in which the cysteinyl residue at position 4 of the short chain makes a disulfide pair with another from the large subunit, maintaining the heterodimer formation in the mature protein. The nucleotide sequence also shows a putative signal peptide (in italics, Fig. 2B), preceding the N-terminal region, either from position -26 or -16. In both positions there is a methionine, but it is not clear from where the translation process takes place. It is worth observing that the putative signal peptide that was found has several charged residues, usually not present in eukaryotic organisms. Similar results were reported for components of other venoms, as described earlier for toxins Pn2-1 A and Tx2-1 of the spider *Phoneutria nigriventer* [18]. The amino acids preceding the first residue of the mature Phayodactylipin (FEEER) are similar to those of the propeptides of the spider toxins (VEELER). They are rich in glutamic acids and the last residue is a basic arginine [18]. A putative polyadenylation site (in bold, Fig. 2B) was also identified at the most 3' end region of the molecule, after the stop codon.

Glycosylation sites of phaiodactylipin

The theoretical molecular mass of the short chain peptide obtained as shown in Fig. 1D and sequenced as shown in

Fig. 2A, is 2058.3 a.m.u., whereas the experimental value found by mass spectrometry was 3242.5 a.m.u. This implies that this segment is also linked to a carbohydrate moiety, whose molecular mass should be 1184.5. In fact, the sequence NFT (positions 14–16) of the short chain is a putative place of glycosylation (GlycoMod tool or NetN-Glyc 1.0 Prediction Results, from ExPASy website), and the direct sequencing of the short chain peptide did not allow the identification of the residue at position 14; this is occupied by another asparagine according to the nucleotide sequence (Fig. 2B), supporting the interpretation of data reported here. It is worth mentioning that F15 was directly seen during microsequencing. The last three residues (TVQ), as well as the full sequence, were unequivocally determined by MS/MS. Figure 3 shows the mass spectrometry results obtained by MS/MS fragmentation analysis of the small subunit. Three hexoses, two N-acetyl hexoses (HexNAc) and two deoxyhexose units were found. The order in which these saccharides are covalently linked to the asparagine of position 14 of the short chain peptide is indicated in the diagram in Fig. 3, starting with a HexNAc and followed by a second HexNAc. The diagram shows the interpretation of the molecular masses obtained, justifying the carbohydrate sequence proposed. To the first HexNAc, laterally bound is a deoxyhexose. The third carbohydrate in the main chain direction is a hexose, directly linked to two

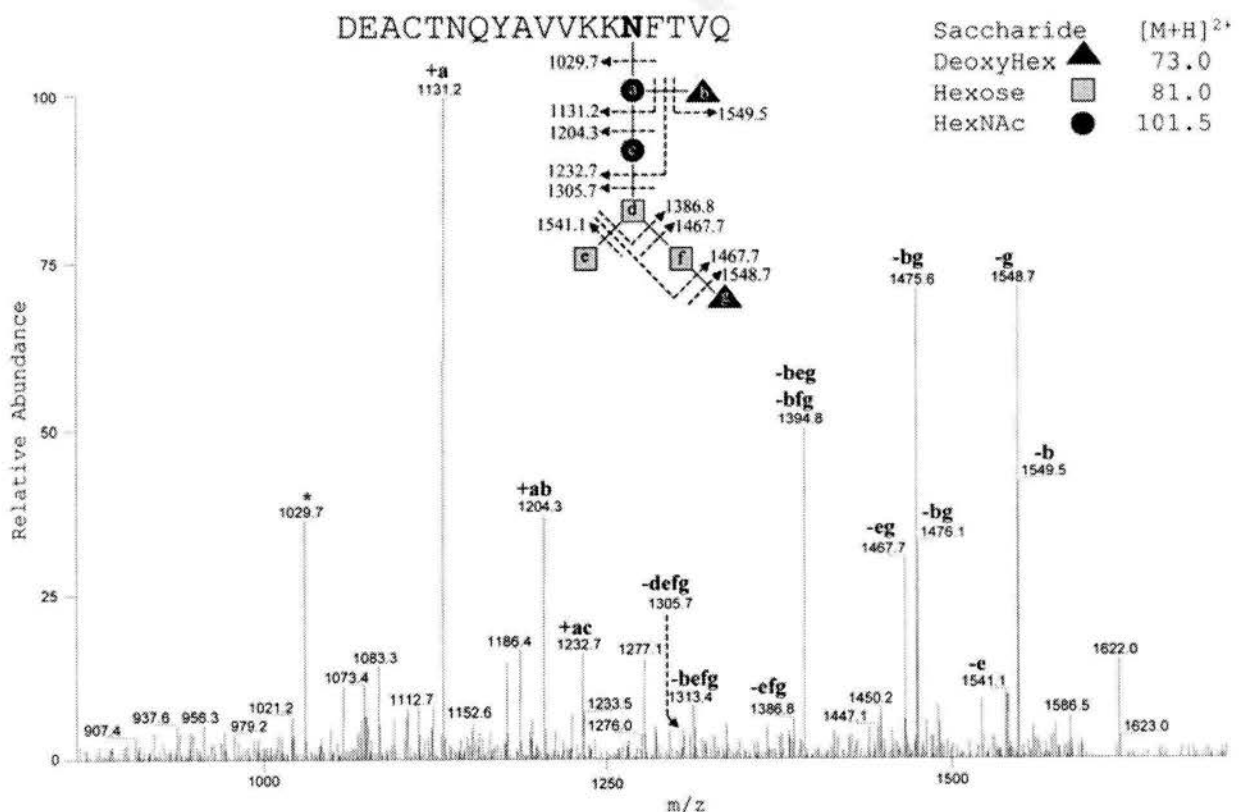


Fig. 3. Carbohydrate determination of the small subunit. Mass spectrometry determination of the carbohydrate moiety of the small subunit was obtained by MS/MS fragmentation and the corresponding molecular masses are indicated. The asterisk indicates the peptide segment (charge two). ●, hexosamine; ▲, deoxyhexose; ■, hexose. Letters inside the carbohydrate representation correspond to the molecular masses found experimentally.

additional hexoses, one of which in turn is further extended by O-glycosylation with a deoxyhexose. The molecular mass of these six carbohydrate moieties accounts for the expected molecular mass of 1184.4 a.m.u. Although the exact stereochemistry of each one of the carbohydrates was not identified, there must be a mannose moiety among the hexoses, because phaiodactylipin is retained by a Sepharose-concanavalin A affinity column (data not shown); it is known that the binding affinity of Concanavalin A is toward mannose sugars.

Concerning the large subunit, as mentioned earlier, the amino acid in position 18 was not identified by peptide sequencing; it corresponds to the asparagine flanked by the sequence motif NYS, thought to be another glycosylation site (earliest reference at EXPASy site). Additionally, the sequence from residues in positions 76–78 (NVT) is expected to be the third point of glycosylation. These results support the interpretation that three distinct glycosylation sites exist in phaiodactylipin: two situated in the large subunit and one in the small subunit. Subtracting the molecular mass of the short chain from the total mass of phaiodactylipin, the expected value for the glycosylated large chain is 15 929.5 a.m.u. The theoretical molecular mass obtained from the sequence in Fig. 2 is 12 440, meaning that for the two carbohydrate moieties still not sequenced in the large subunit we should find a molecular mass of 3489.5 a.m.u. Scarcity of material did not allow, at this stage, to fully characterize the missing segments of the carbohydrates of phaiodactylipin. This is not a trivial task, as shown for the only other known example in the literature, where the carbohydrate moiety of the bee venom phospholipase was solved [19]. The authors discussed that for the bee phospholipase there are at least 16 different isoforms of the carbohydrate arrangements.

Enzymatic and functional characterization of phaiodactylipin

Several functional and biological activities of phaiodactylipin were determined, starting by the specific activity, which was shown to be 172 units per mg of protein ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$), at pH 8.0, 37 °C, using egg yolk as substrate. The enzyme hydrolyses the fatty acids of position 2 (Materials and methods), thus it is an A2 type phospholipase. The activity is calcium dependent, being fully active at 1 mM concentration (Fig. 4A); it loses 60% of its activity in the presence of 1.0% (v/v) Triton X-100, but increases $\approx 0.4\%$ in detergent (Fig. 4B), and the optimum pH for activity is close to pH 8.0, being less active at pH 5.0 (Fig. 4C). The enzymatic activity is temperature-dependent, being less active around 25 °C (data not shown).

The substrate preference of the enzyme was higher for phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine, especially when the *sn*-2 position is occupied by arachidonic acid. Table 1 shows the results obtained with different substrates, using the method described by Lobo de Araujo & Radviany [10]. The order of preference is phosphatidylcholine > phosphatidylethanolamine > phosphatidylserine.

As many phospholipases found in venomous animals are potent toxins, lethality tests were conducted with mice and

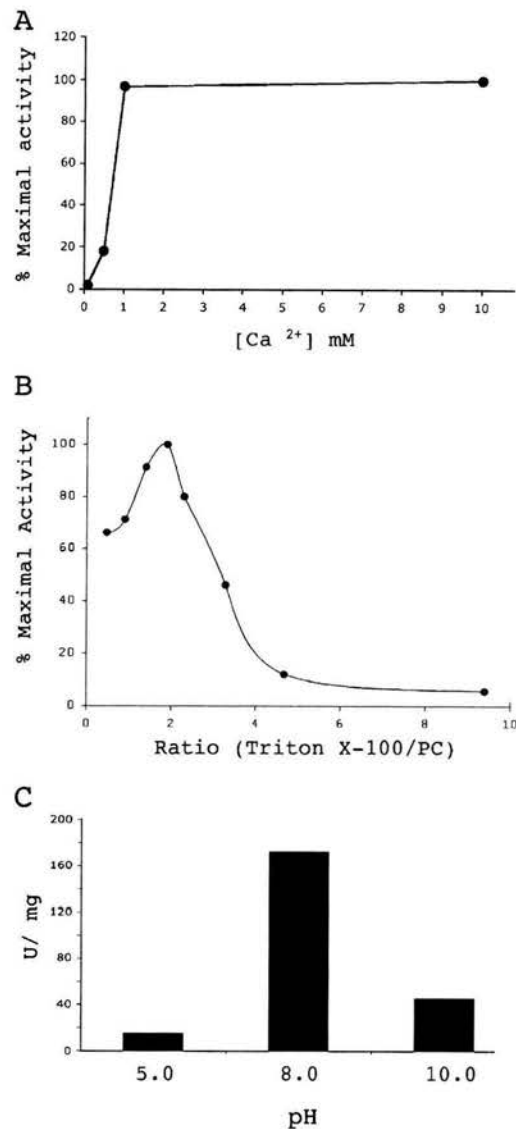


Fig. 4. Enzymatic characterization of phaiodactylipin. (A) The activity of phaiodactylipin is calcium dependent. (B) The maximum activity is increased in the presence of low concentration of Triton X-100, but inhibited at ratios higher than threefold molar concentration of detergent per molecule of substrate phosphatidylcholine (PC). (C) The pH dependence is optimal around pH 8.0. $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ implies specific activity.

arthropods, *in vivo* (Materials and methods). Mice injected intraperitoneally with the toxin showed no symptoms of intoxication, using up to 20 μg per 20 g mouse weight. Phaiodactylipin kills crickets and crustacean (*Armadillidium vulgare*) within 1–2 h after injection using amounts of 5 μg per animal, but intoxication symptoms are observed with smaller doses, immediately after injection. Phaiodactylipin has a significant inflammatory effect, if injected intramuscularly into the leg of mice (Fig. 5). It can be observed that the enzyme causes significant edema, by swelling the tissue (Fig. 5B). The cells are turgid when compared to the control (Fig. 5A), however, it does not cause apparent damage to the basal membrane, as seen in the same type of preparations treated with phospholipases extracted from snake

Table 1. Specific activities of phaiodactylipin using different substrates. Substrates used were: 1-stearoyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (SAPC), 1-stearoyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (SAPE), 1-stearoyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-L-serine] (SAPS), 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DSPC), 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DSPE), 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-L-serine] (DSPS), 1,2-diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC), 1,2-diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DPPE), 1,2-diphytanoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-L-serine] (DPPS). SA, specific activity. Experiments were conducted in triplicate.

Phospholipid	SA (U·mg ⁻¹)
SAPE	211 ± 20
SAPC	142 ± 13
SAPS	84 ± 4
DSPE	51 ± 2
DSPC	149 ± 7
DSPS	63 ± 5
DPPE	48 ± 2
DPPC	67 ± 3
DPPS	32 ± 7

COLOUR ON WEB

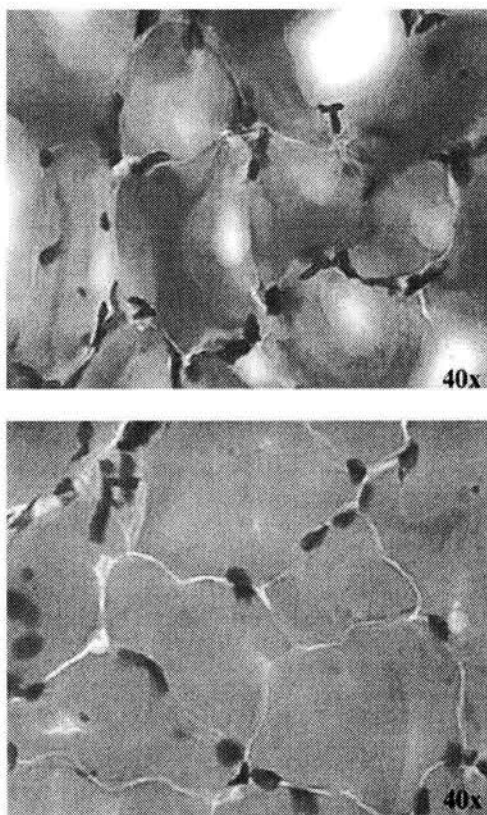
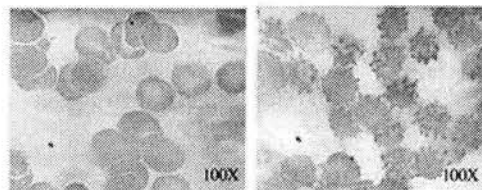


Fig. 5. Inflammatory action of phaiodactylipin. (A) Control photo of a slice of mouse leg skeletal muscle stained with hematoxylin-eosin. Magnification 40×, observed with a light microscope. (B) Photo of slice from the other leg of the mouse, previously injected with 5 µg of pure enzyme, after 60 min treatment.

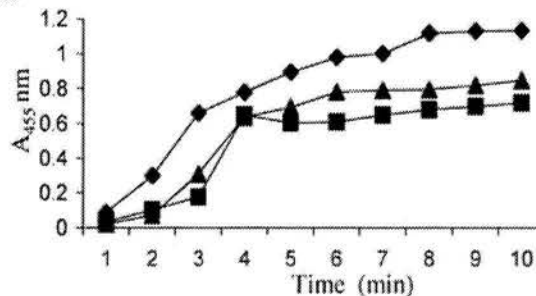
26 venom. Furthermore, this enzyme causes direct hemolytic action on human erythrocytes and affects the coagulation time of blood, as discussed below.

A



COLOUR ON WEB

B



C

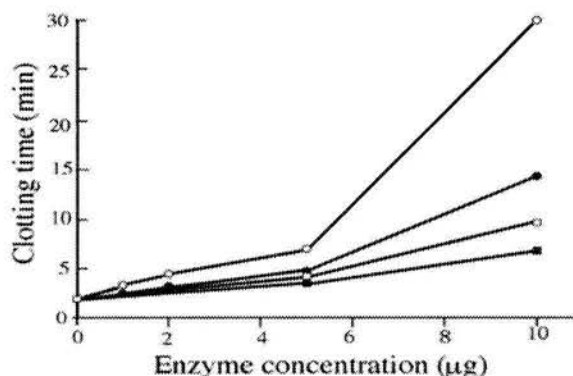


Fig. 6. Hemolytic action of phaiodactylipin. (A) Left panel shows the morphological shape of a control human erythrocyte slide, viewed with a light microscope, with 100× magnification. Right panel shows the modified shape (crenation) of the erythrocytes, after treatment with 5 µg·mL⁻¹ phaiodactylipin. (B) Time course showing hemoglobin liberation from human erythrocytes subjected to phaiodactylipin treatment (5 µg·mL⁻¹), read at 540 nm in a Beckman DU-50 spectrophotometer (▲). The effect of addition of the detergent Triton X-100 (◆) and IpTxI (■), another scorpion phospholipase, are shown as control experiments (squares). (C) Clotting time of platelet poor plasma (PPP), ●, and platelet rich plasma (PRP), ■, when subjected to increasing amounts of phaiodactylipin. PPP and PRP samples (1 mL each) obtained from human blood were kept at 37 °C in the presence of phaiodactylipin, 10 mM Tris/HCl buffer pH 7.4, and recalcified with 0.1 mL of calcium chloride (Materials and methods). Control experiments were also conducted with IpTxI (○ for PPP, and □ for PRP). Recalcification of control plasma was 1 min 51 s.

Hemolytic activity

Phaiodactylipin presents direct hemolytic activity when is assayed with human erythrocytes (Fig. 6A). The left panel shows normal erythrocytes under control conditions; the right panel shows cells incubated with 5 µg·mL⁻¹ enzyme concentration, for 10 min. The shape of the erythrocyte membranes is quite changed, showing a crenation pheno-

menon, similar to spikes projecting from the membrane core, but actual rupture or fragmentation of cell membranes alone (ghost-like shape), are not observed. When sedimented by mild centrifugation, the supernatant has free hemoglobin, as can be observed in Fig. 6B, showing that modification of the permeability of the cell walls has occurred.

For comparative purposes, the results obtained in parallel with another heterodimeric phospholipase (IpTxI) and by the addition of the detergent Triton-X100, are shown. Although there is an interval of a couple of minutes before the hemolysis appears, both for phaiodactylipin and IpTxI, the addition of external lipids is not necessary for the appearance of hemolysis. This is different from other examples of phospholipases from animal venoms [20] that have indirect hemolytic activity, which require preincubation of the enzyme with phospholipids in order to generate free fatty acids and lysophospholipids, which then act as a detergent by breaking the integrity of the surrounding erythrocyte membranes.

Anticoagulant effect of phaiodactylipin

Phaiodactylipin exhibits anticoagulant activity (Fig. 6C), as shown by the increment of the clotting time, both for PPP and PRP human blood samples. For comparative purposes IpTxI was also assayed. The normal control time for clotting is in the order of 1 min 50 s. The coagulation time increases significantly by addition of more than 5 µg of enzyme in our experimental conditions. IpTxI is more efficient than phaiodactylipin, because at concentrations higher than 10 µg (Materials and methods), it confers non-coagulable properties to the blood, at least for a period as long as 30 min. Additionally, and similar to what has been reported for other PLA₂s [13], the clotting time is longer for the PPP blood samples, as expected.

Phaiodactylipin and phylogenetic comparison with other phospholipases

Phaiodactylipin seems to be a special toxic phospholipase in its genre, although structurally similar to IpTxI and phospholipin, purified from the venom of the African scorpion *Pandinus imperator* [16,17]. It also presents some structural resemblance to two other phospholipases: one from the *Heloderma* venom (either *Heloderma horridum* or *Heloderma suspectum*), the only genus of venomous lizard of the world [21], and the other from honeybee (*Apis mellifera*) venom [22]. In the review by Dennis [23], they were all classified into group III phospholipase. For this reason, in Fig. 7 we compare their sequences and report their similarities and identities. Phaiodactylipin shows an identity of around 36% with IpTxI and 50% with phospholipin, but only 28% with honeybee and *Heloderma* phospholipases. There are two additional heterodimeric PLA₂s known that are linked by disulfide bridges: β-bungarotoxin and Conodipine-M, whose primary structures are even less similar to that of phaiodactylipin (only about 22%). Actually, the two latter ones are classified in groups II and IX, respectively [4]. These values indicate that they are all quite different in terms of their primary structure. However, the amino acid residues thought to form the binding sites for Ca²⁺, responsible for catalysis, are highly conserved and are situated in approximately the same position of their amino acid sequences. The small subunit of phaiodactylipin has a greater similarity with that of phospholipin (63%) and with that of IpTxI (54%), but less so with the C-terminal tail of the monomeric PLA₂s of honeybee and *Heloderma* (Fig. 7). The small subunits of β-bungarotoxin and conodipine-M have no similarities whatsoever with phaiodactylipin. The latter and IpTxI share an identical cysteinyl arrangement. Thus, the enzymatic activity is conserved in all of them, corresponding very well to a section of the molecule shown to be responsible for the enzymatic function. However, their biological or phar-

	LARGE SUBUNIT									
	Ca ²⁺ site				catalytic site					
	10	20	30	40	50	60	70	80		
Pha	--FLIVSGTKWCGNANNIAANYSDLGFL--EADKCCRDHDCDHIASG--ETKYGLNKGFLFTI LNCDCDEAFDHLCKEISNNVT									
Pho	--FLMWECKTWCGPGNNAKCESDLGFL--EADKCCRTHDHCYIASG--ETKYGLTNYAFPTKLNCKCEAFDRCLTEAYNKEE									
IpTxI	----TMWGTKWCGSGNEATDISELGYWSNLDSCCRTHDHCNIPSG--QTKYGLTNEGKYTMNCKCBETAPEQCLRNVTGGME									
Bee	---I IY PGT LWCGHGKSSGPNELGRFKHTDACCRTHDMCPDVM SAGESKHGLTNTASHTRLS CDCDDKFDYDCLKNSADTIS									
Hel	GAFIPMPGTLWCGAGNAASDYSQLGTEKDTDMCCRHDHCENWISALEYKHGMRNYPSTISHCDCDNQFRSCLMKLKDGT A									
	* * * * *			* * * * *			* * * * *			
	SMALL SUBUNIT								%similarity	%identity
	90	100	110	120	130	140	150			
1	TDIEQKGGAEENVWRFPYQWYN-----ANCYRLYCKDEK--SARDEACTN--QYAVVK--KNPTVQ-----								100	100
2	KES-AKSSTKRLQNFYFGTYS-----PECYVVT CNSKR--SGRDAGCEN--GVATWK--KSYKD-----								61	50
3	G-----PAAGFVRKTYFDLYG-----NGCYNVQCPSQRRLARSEBCPD--GVATYTG EAGYGA WAINKLN G								50	36
4	SYFVGKMYPNLIDTKCYKLEHPVTGCGERTGRCLHYTVDKSKPKVYQWFDLRKYXNSRGG SXEYHFEIVY-								43	28
5	DY--VGQTYFNVLKIPCPELEE---GEGCVDWNFWLECTESKIMPVAKKLVSAAPYQAQAETQSGEG-----								40	28

Fig. 7. Amino acid sequence comparison. The amino acid sequence of phaiodactylipin (including the internal peptide processed during maturation) is compared with those of phospholipin (Pho) [17], IpTxI [16], honeybee (Bee) and *Heloderma* (Hel) venom phospholipases (GenBank accession numbers AAL30844 and P80003, respectively, for the latter two). Numbers above indicate the relative position of each amino acid residue. Gaps, denoted by dashes, were introduced by the program CLUSTAL-X [31] in order to increase similarities. Percentage of similarities and identities are shown on the lower right section of the sequences and were obtained by the Pairwise Alignment Algorithms by EMBOSS (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>). The approximate location corresponding to the large and the small subunits, as well as that of the catalytic site, are indicated.

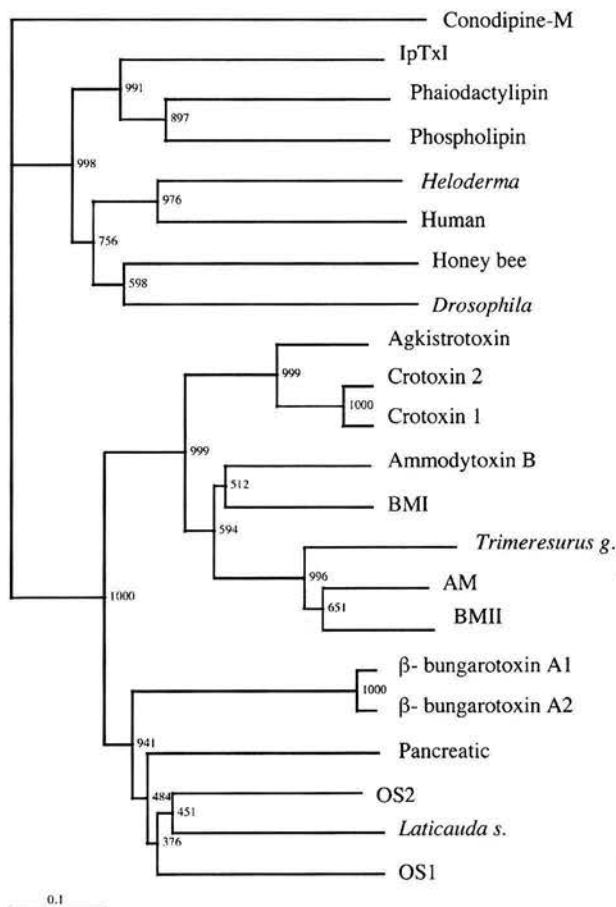


Fig. 8. Phylogenetic tree of phaiodactylipin. Cladogram showing selected phospholipases of groups I, II, III, IX and XII aligned by CLUSTAL-X, whose branch distances were calculated using the program TREE-VIEW from Glasgow University (<http://taxonomy.zoologi.36.gla.ac.uk/lod/treeview.htm/>). The phylogenetic tree was obtained after 1000 times bootstraps. Conodipine-M was used as the out-group. The source of the sequences were references or accession numbers as indicated: Conodipine-M (A59047); imperatoxin I [16]; phospholipin [17]; *Drosophila melanogaster* (AY219032); honeybee (AAL30844); *Heloderma* (P80003); human (Q9NZ20); agkistrotoxin (P14421); crotoxin I (P07517); crotoxin 2 (P24027); ammodytoxin B (P14424); *Bothrops asper* myotoxin I (P20474); *Trimeresurus gramineus* (P70089); *Agkistrodon contortrix* myotoxin I (AM)(P49121); *Bothrops asper* myotoxin II (BMII) (P24605); β -bungarotoxin I (P00617); β -bungarotoxin 2 (P00618); pancreatic (PSHU); *Laticauda semifacata* (PSLT4E); *Oxyuramus scutellatus* 1 (OS1) (AAB33759); *Oxyuramus scutellatus* 2 (OS2) (AAB33760). The scale (0.1) indicates the probability of one change occurring in 1000 residues.

macological functions are quite different, very likely due to the structural variations found in other domains of the molecules [24,25]. IpTxI hydrolyses phospholipids, liberating fatty acids, which inhibit ryanodine binding to the Ca²⁺ channels of skeletal muscle [16]. Phospholipin has little or no effect on the inhibition of ryanodine binding [17]. No specific pharmacological action has been described for the *Heloderma* phospholipase, but the bee phospholipase is neurotoxic [26,27]. β -Bungarotoxin is a potent toxin capable of affecting the presynaptic membranes of excitable cells [28], and conodipine-M, a peptide extracted from marine

snails [29], to the best of our knowledge has not been tested for toxicity.

In Fig. 8 we report the results of a phylogenetic tree analysis of phaiodactylipin and the other related enzymes, taking into consideration only the secretory phospholipases, according to the groups proposed by Six & Dennis [4], which comprises groups I, II, III, IX and XII. It can be clearly seen that phaiodactylipin falls into group III, together with IpTxI, phospholipin, bee and *Heloderma* phospholipases, but very well separated from the snake neurotoxic phospholipase of group I and myotoxic of group II.

Fet *et al.* [30] used DNA analysis for postulating an evolutionary analysis of scorpion families and species. There are three main branches: buthidae, chaerilidae and diplo-centroidae, from which nine families have evolved. The last one, the diplocentroidae, has seven different families, from which phospholipases were isolated only from the families Scorpionidae and Iuridae (this work). We know that the Vaejoidea scorpions have phospholipase activity [29] in their venom (X. XXXXXX, unpublished results). None of the others families have been studied. The findings reported here open a wide field of research for the future.

Acknowledgements

This work was partially supported by grant 40251-Q from the National Council of Science and Technology (CONACyT) from the Mexican Government and grant IN206003-3 from the Direccin General de Asuntos del Personal Acadmico (DGAPA) of the National Autonomous University of Mexico (UNAM), to L. D. P. The assistance of Dr Fernando Zamudio during sequencing and biologist Sonia Dávila during the phylogenetic analysis is acknowledged. N. A. V.-C. was a recipient of a scholarship from CONACyT and DGAPA-UNAM.

References

- Zlotkin, E., Miranda, F. & Rochat, H. (1978) Chemistry and pharmacology of Buthinae scorpion venoms. *Handb. Exp. Pharm.* **48**, 317–369.
- Possani, L.D. (1984) Structure of scorpion toxins. In *Handbook of Natural Toxins* (Tu, A.T., ed.), Vol. 2, pp. 513–550. Marcel Dekker Inc., New York.
- Valentin, E. & Lambeau, G. (2000) Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A(2) and their receptors and binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1488**, 59–70.
- Six, D.A. & Dennis, E.A. (2000) The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta* **1488**, 1–19.
- Lambeau, G. & Lazdunski, M. (1999) Receptors for a growing family of secreted phospholipases A2. *Trends Pharmacol. Sci.* **20**, 162–172.
- Valentin, E., Ghomashchi, F., Gelb, M., Lazdunski, M. & Lambeau, G. (2000) Novel human secreted phospholipase A2 with homology to the group III bee venom enzyme. *J. Biol. Chem.* **275**, 7492–7496.
- Habermann, E. & Hardt, K.L. (1972) A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. *Anal. Biochem.* **50**, 163–173.
- Opperdoes, F.R. & Van Roy, J. (1982) The phospholipases of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms and cultured procyclics. *Mol. Biochem. Parasitol.* **5**, 309–319.
- Shiloah, J., Klibansky, C., de Vries, A. & Berger, A. (1973) Phospholipase B activity of a purified phospholipase A form *Vipera palestinae* venom. *J. Lipid Res.* **14**, 267–278.

10. Lobo de Araújo, A. & Radvanyi, F. (1987) Determination of phospholipase A2 activity by colorimetric assay using a pH indicator. *Toxicon* **25**, 1181–1188.
11. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. & Mann, M. (1996) Mass spectrometry sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **68**, 850–858.
12. Condrea, E., Fletcher, J.E., Rapuano, B.E., Yang, C.C. & Rosenberg, P. (1981) Dissociation of enzymatic activity from lethality and pharmacological properties by carbamylation of lysines in *Naja nigricollis* and *Naja naja atra* snake venom phospholipases A2. *Toxicon* **19**, 705–720.
13. Condrea, E., Yang, C.C. & Rosenberg, P. (1981) Lack of correlation between anticoagulant activity and phospholipid hydrolysis by snake venom phospholipases A2. *Thromb. Haemost.* **45**, 82–85.
14. Chirwing, J.M., Przybyla, A.E., McDonald, R.J. & Rutter, W.J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from source enriched in ribonuclease. *Biochem.* **18**, 5294–5299.
15. Corona, M., Valdez-Cruz, N.A., Merino, E., Zurita, M. & Possani, L.D. (2001) Genes and peptides from the scorpion *Centruroides sculpturatus* Ewing, that recognize Na⁺-channels. *Toxicon* **39**, 1893–1898.
16. Zamudio, F., Conde, R., Arevalo, C., Becerril, B., Brian, M., Valdivia, H. & Possani, L.D. (1997) The mechanism of inhibition of ryanodine receptor channels by Imperatoxin I, a heterodimeric protein from the scorpion *Pandinus imperator*. *J. Biol. Chem.* **272**, 11886–11894.
17. Conde, R., Zamudio, F., Becerril, B. & Possani, L.D. (1999) Phospholipin, a novel heterodimeric phospholipase A2 from *Pandinus imperator* scorpion venom. *FEBS Lett.* **460**, 447–450.
18. Kalapothakis, E., Penaforte, C.L., Beirao, P.S.L., Romano-Silva, M.A., Cruz, J.S., Prado, M.A.M., Guimaraes, P.E.M., Gomez, M.V. & Prado, V.-F. (1998) Cloning of cDNAs encoding neurotoxic peptides from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon* **36**, 1843–1850.
19. Chien-Chen, L. & Guor-Rong, H. (2002) Analysis of N-glycosylation of phospholipase A from venom of 2 individual bees by microbore high-performance liquid chromatography electrospray mass spectrometry using an ion trap mass spectrometer. *J. Chrom. B* **766**, 243–250.
20. Sosa, B.P., Alagón, A.C., Possani, L.D. & Juliá, J.Z. (1979) Comparison of phospholipase activity with direct and indirect lytic effects of animal venoms upon human red cells. *Comp. Biochem. Physiol.* **64B**, 231–234.
21. Sosa, B.P., Alagon, A.C., Martin, B.M. & Possani, L.D. (1986) Biochemical characterization of the phospholipase A2 purified from the venom of the Mexican beaded lizard (*Heloderma horridum* Wiegmann). *Biochem.* **25**, 2927–2933.
22. Shipolini, R.A., Doonan, S. & Vernon, C.A. (1974) The disulphide bridges of phospholipase A2 from bee venom. *Eur. J. Biochem.* **48**, 477–483.
23. Dennis, E.A. (1994) Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* **269**, 13057–13060.
24. Kini, R.M. & Evans, H.J. (1987) Structure-function relationships of phospholipases. The anticoagulant region of phospholipases A2. *J. Biol. Chem.* **262**, 14402–14407.
25. Singh, G., Gourinath, S., Sharma, S., Paramasivam, M., Srinivasan, A. & Singh, T.P. (2001) Sequence and crystal structure determination of a basic phospholipase A2 from common krait (*Bungarus caeruleus*) at 2.4 Å resolution: Identification and characterization of its pharmacological sites. *J. Mol. Biol.* **307**, 1049–1059.
26. Kolko, M., DeCoster, M.A., de Turco, E.B. & Bazan, N.G. (1996) Synergy by secretory phospholipase A2 and glutamate on inducing cell death and sustained arachidonic acid metabolic changes in primary cortical neuronal cultures. *J. Biol. Chem.* **271**, 32722–32728.
27. Rodriguez De Turco, E.B., Jackson, F.R., DeCoster, M.A., Kolko, M. & Bazan, N.G. (2002) Glutamate signalling and secretory phospholipase A2 modulate the release of arachidonic acid from neuronal membranes. *J. Neurosci. Res.* **68**, 558–567.
28. Kondo, K., Toda, H., Narita, K. & Lee, C.Y. (1982) Amino acid sequences of three beta-bungarotoxins (beta 3-, beta 4-, and beta 5-bungarotoxins) from *Bungarus multicinctus* venom. Amino acid substitutions in the A chains. *J. Biochem.* **91**, 1531–1548.
29. McIntosh, J., Gomaschi, F., Gelb, M., Dooley, D., Stehr, S., Giordani, A., Naisbitt, S. & Olivera, B. (1995) Conodipine-M, a novel phospholipase A2 isolated from the venom of the marine snail *Conus magus*. *J. Biol. Chem.* **270**, 3518–3526.
30. Fet, V., Sissom, W.D., Lowe, G. & Braunwalder, M.E. (2000) XXXXXXXXX XXXXXXXXX. In *Catalog of the scorpions of the world (1758–1998)*, pp. 17–329. The New York Entomological Society, New York.
31. Felsenstein, J. (XXXX) *Phylogeny Interference Package (PHY-LIP)*, version 3.57c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA.

BIOCHIMIE

AN INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY

Published under the auspices of : *Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire Sciences*
Editors: M. GRUNBERG MANAGO, R.H. BUCKINGHAM, (PARIS), R. MONIER (VILLEJUIF);
J. W. HERSHEY (DAVIS); Y. NAKAMURA (TOKYO); L. L. KISSELEV (MOSCOW)

February 9, 2004

Dr. Lourival D. Possani
Instituto de Biotecnología UNAM,
Avenida Universidad, 2001
Apartado Postal 510-3
Cuernavaca 62210
Mexico.

REF/MS95 - BIOCHI/adri.AT.ibt.unam.mx/20031104

Norma A. Valdez-Cruz, Sonia Dávila, Alexei Licea, Miguel Corona, Fernando Z. Zamudio, Jesús García-Valdes, Leslie Boyer and Lourival D. Possani.

Biochemical, genetic and functional characterization of venom components from two species of scorpions: *Centruroides exilicauda* Wood and *Centruroides sculpturatus* Ewing.

Dear Dr. Possani,

The manuscript you submitted for publication to BIOCHIMIE, has been examined by the Editorial Board and by external referees.

Please find here appended to the present letter, some comments concerning your manuscript, that we would appreciate your taking into consideration. We are happy to inform you that your article could be acceptable after revision.

Please be kind enough to send with you revised version, a response stating how you have dealt with the criticisms.

We truly hope that these comments will help you to improve your manuscript.

Sincerely yours,

The Editorial Board.

REDACTION DE BIOCHIMIE
CENTRE UNIVERSITAIRE DES SAINTS PERES
45, RUE DES SAINTS PERES
75270 PARIS CEDEX 06
E.MAIL: Redaction.Biochimie@ibpc.fr

EDITORIAL SECRETARY
MALIKA HASSINI
TEL : 01 42 86 20 96
FAX : 01 42 86 40 12

Biochemical, genetic and functional characterization of venom components from two species of scorpions: *Centruroides exilicauda* Wood and *Centruroides sculpturatus* Ewing

Norma A. Valdez-Cruz¹, Sonia Dávila², Alexei Licea³, Miguel Corona¹, Fernando Z. Zamudio¹, Jesús García-Valdes¹, Leslie Boyer⁴ and Lourival D. Possani¹.*

¹Department of Molecular Medicine and Bioprocesses, Institute of Biotechnology, National Autonomous University of Mexico, Avenida Universidad 2001, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca 62210, Mexico

²Department of Genetical Evolution, Institute of Ecology, National Autonomous University of Mexico, Ciudad Universitaria 04510, Mexico D.F. Mexico

³Department of Aquaculture, Marine Biotechnology, Centro de Investigación Científica y de Educación de Ensenada, Km. 107 Carretera Tijuana-Ensenada, Ensenada B.C., Mexico

⁴Arizona Poison and Drug Information Center, University of Arizona Health Sciences Center 1501 N. Campbell Avenue, Tucson, AZ 85724 USA

Running title: Scorpion species: *C. exilicauda* and *C. sculpturatus*

Abbreviations: C, *Centruroides*; COX I, cytochrome oxidase I; COX II, cytochrome oxidase II, I, limpidus, mDNA, mitochondrial DNA; T, *Tityus*

*Corresponding autor

Dr. Lourival D. Possani

Instituto de Biotecnología UNAM

Avenida Universidad, 2001

Apartado Postal 510-3

Cuernavaca 62210622106221062210

MEXICO

Phone: +52-77-73-171209

FAX: +52-77-73-172388: +52-77-73-172388: +52-77-73-172388: +52-77-73-172388

E.mail: possani@ibt.unam.mx

ABSTRACT

Thirteen distinct genes that code for peptides similar to the Na⁺ channel specific toxins were cloned from the venomous glands of *Centruroides exilicauda* Wood, collected in Baja California (Mexico). These genes were all different from sixteen previously described [1], from the venomous glands of *Centruroides sculpturatus* Ewing, collected in Tucson, Arizona (USA). Mitochondrial marker genes from both species were sequenced. The information obtained from the cytochrome oxidase I and II genes, allowed the construction of an unrooted phylogenetic tree, clearly showing important differences between the two species, earlier claimed to be the same [2]. Furthermore, we report here the chromatographic profile separation of both venoms, their lethality potency in mice and confirm the findings that *C. exilicauda* is medically less important than *C. sculpturatus* from Arizona. We also show their electrophysiological effects on Ca²⁺-dependent K⁺-channels and the N-terminal amino acid sequence for nine toxins of *C. exilicauda*. These results strongly support the conclusion that *C. exilicauda* and *C. sculpturatus* in fact are two distinct species of scorpions.

Key Words: *C. exilicauda*, *C. sculpturatus*, cytochrome oxidase, mitochondrial gene, scorpion toxin, K⁺ channel.

**Phaiodotoxin, a novel structural class of insect-toxin isolated from the
venom of the Mexican scorpion *Anuroctonus phaiodactylus***

Norma A. Valdez-Cruz¹, Cesar V.F. Batista¹, Fernando Z. Zamudio¹, Frank Bosmans², Jan
Tytgat² and Lourival D. Possani¹.

¹Department of Molecular Medicine and Bioprocesses, Institute of Biotechnology, National Autonomous
University of Mexico, Avenida Universidad 2001, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca 62210, Mexico,

²Laboratory of Toxicology, University of Leuven, E. Van Evenstraat 4, B-3000, Leuven, Belgium

Running title: Phaiodotoxin an insect-toxin.

Subdivision: Protein structure and chemistry

*Corresponding author

Dr. Lourival D. Possani
Instituto de Biotecnología UNAM
Avenida Universidad, 2001
Apartado Postal 510-3
Cuernavaca 62210
MEXICO
Phone: +52-777- 3171209
Fax. +52-777-3172388
E.mail: possani@ibt.unam.mx

Abbreviations : a.m.u., atomic mass unit; COS7, monkey kidney cell line 7 ; DTT, dithiothreitol; MS, mass spectrometry; HPLC, high performance liquid chromatography; NaCh, Na⁺-channel; PBS, phosphate saline buffer (10 mM Na-phosphate, 0.15 m NaOH); ScTX, scorpion toxin; TE671, human cerebellar medulloblastoma cell line 671.

Keywords: *Anuroctonus phaiodactylus*, disulfide bridge, insect-toxin, Na⁺-channel, scorpion

Summary

A peptide called Phaidotoxin was isolated from the venom of the scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*. It is lethal to insects at a dose of 1 $\mu\text{g/g}$ cricket body weight, but non toxic to mammals at a dose up to 100 $\mu\text{g}/20$ g mouse weight. It has 72 amino acid residues, with a molecular weight of 7971 atomic mass units. Its covalent structure was determined by Edman degradation and mass spectrometry. It contains 4 disulfide-bridges, of which one of the pairs is formed between cysteine-7 and cysteine-8 (positions Cys63-Cys71). The other three pairs are formed between Cys13-Cys38, Cys23-Cys50 and Cys27-Cys52. Comparative sequence analysis shows that Phaiodotoxin belongs to the long-chain sub-family of scorpion peptides. Several genes coding for this peptide and similar ones were cloned by the polymerase chain reaction, using cDNA prepared from RNA of venomous glands of this scorpion. This toxin does not affect the mammalian Na^+ -channels TE671, or COS7, but it shifts the voltage dependence of activation and inactivation of insect Na^+ -channels (para/tipE) to more negative and positive potentials, respectively. Therefore, the 'window' current is increased by 225%, thought to be the cause of its toxicity toward insects. Phaiodotoxin is the first toxic peptide ever purified from a scorpion of the family Iuridae.

Introduction

Most of the biochemical work performed with scorpion venom was reported using scorpions of the family Buthidae, probably because they are dangerous to humans. A large number of different protein and polypeptides were isolated and characterized from this family. Among the most important findings are four different groups of peptides, which specifically interact with ion channels: Na^+ channels (NaChs) [1], K^+ channels [2,3], Cl^-

Genes and peptides from the scorpion *Centruroides sculpturatus* Ewing, that recognize Na⁺-channels

M. Corona, N.A. Valdez-Cruz, E. Merino, M. Zurita, L.D. Possani*

Institute of Biotechnology, National Autonomous University of Mexico, Avenida Universidad, 2001 Apartado Postal 510-3, Cuernavaca 62210, Mexico

Received 11 January 2001; accepted 31 May 2001

Abstract

Sixteen different genes were cloned from the venomous glands of *Centruroides sculpturatus* Ewing using RNA extracted from scorpions collected in Tucson, Arizona. Based on the amino acid sequence similarities of the proteins coded by these genes, all together there are 22 different structural components in this venom, thought to be specific for Na⁺-channels. The genes reported contain signal peptides with 19 amino acid residues followed by mature peptides of 63–66 amino acid residues in length. One of them correspond to toxin I (CsEI), a known scorpion toxin specific for Na⁺-channels. Four different genes are almost identical to variant 1 (Csv1), presenting only one amino acid change from the original protein. For variant 2 (Csv2) four related genes were found, with only one amino acid change in their primary sequences. Another gene resembles to variant 3 (Csv3, the best known *Centruroides sculpturatus* toxin), with only three amino acid changes in their primary sequences. Additionally, two genes show variations only on the nucleotide sequence at level of the signal peptides, and several genes clearly show sequences that suggest post-transcriptional modifications, during the maturation process. A phylogenetic tree was generated with the primary structures available and three main divergent branches were found. © 2001 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: cDNA sequence; *Centruroides exilicauda*; *Centruroides sculpturatus*; Na⁺-channels; Toxin

1. Introduction

Stahnke and Cailos (1977) revised keys for identification of scorpions of the species *Centruroides sculpturatus* of Arizona and *Centruroides exilicauda* of California, as separated species. In 1980, Williams presented data suggesting that both species were the same and should be named variants of *C. exilicauda* (Williams, 1980). For this reason, recent literature in this matter quote both species as synonyms. In order to clarify these discrepancies, we started a comparative study, at molecular level, with these two species. We decided to keep the same nomenclature used by the biochemists that first described toxic peptides extracted from the scorpions collected in Arizona (Babin et al., 1974, 1975; Watt et al. 1978; Fontecilla-Camps et al., 1980; Meves et al., 1982, and recent review by Possani

et al., 1999). In this communication, we report for the first time the cloning of genes corresponding to *C. sculpturatus* of Arizona, that code for peptides specific for Na⁺-channels. Previously, some reports dealing with genes cloned from scorpions of the species *C. noxius* of Mexico and *Tityus* of Brazil, were published (Becerril et al., 1993; Vázquez et al., 1993, 1995; Becerril et al., 1997). The rules governing the possible mechanisms for expression and processing of peptide precursors, to give mature toxins, were discussed (Becerril et al., 1997; Possani et al., 1999). During this process, the toxic peptides from different species of scorpions around the world, apart from the elimination of the signal peptides, show several types of post-transcriptional modifications (Bougis et al., 1989; Becerril et al., 1997; Froy et al., 1999). Here we analyze the amino acid and nucleotide sequences of 22 different genes and/or proteins from *C. sculpturatus* and we discuss the processing mechanisms for generation of mature peptides. Although the mature products of these genes are bona fide proteins, we prefer to call them peptides (Possani et al., 2000). Also, a

* Corresponding author. Tel.: +52-73-171-209; fax: +52-73-172-388.

E-mail address: possani@ibt.unam.mx (L.D. Possani).

A large number of novel Ergtoxin-like genes and ERG K⁺-channels blocking peptides from scorpions of the genus *Centruroides*

Miguel Corona^a, Georgina B. Gurrola^a, Enrique Merino^a, Rita Restano Cassulini^{a,b},
Norma A. Valdez-Cruz^a, Blanca García^a, Martha E. Ramírez-Domínguez^a,
Fredy I.V. Coronas^a, Fernando Z. Zamudio^a, Enzo Wanke^{a,b}, Lourival D. Possani^{a,*}

^aInstitute of Biotechnology, National Autonomous University of Mexico, Avenida Universidad, 2001, P.O. Box 510-3, Cuernavaca 62210, Mexico

^bDepartment of Biotechnology and Biosciences, University of Milano-Bicocca, I-20126 Milano, Italy

Received 25 September 2002; revised 22 October 2002; accepted 22 October 2002

First published online 7 November 2002

Edited by Maurice Montal

Abstract Twenty-three novel sequences similar to Ergtoxin (ErgTx) were obtained by direct sequencing of peptides or deduced from gene cloned using cDNAs of venomous glands of *Centruroides* (*C. elegans*, *C. exilicauda*, *C. gracilis*, *C. limpidus limpidus*, *C. noxius* and *C. sculpturatus*). These peptides have from 42 to 47 amino acid residues cross-linked by four disulfide bridges. They share sequence similarities (60–98% compared with ErgTx1) and were shown to block ERG K⁺-channels of F-11 clone (N18TG-2×rat DRG) cultured cells. An unrooted phylogenetic tree analysis of these peptides showed that they conform at least five different subfamilies, of which three are novel subfamilies.

© 2002 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Key words: *Centruroides*; ERG-channel; Ergtoxin; K⁺-channel; Nomenclature; Phylogeny; Scorpion toxin

1. Introduction

The number of novel scorpion toxins specific for K⁺-channels described has increased significantly in recent years, adding new subfamilies to the original classification proposed by a panel of scientists working in the field [1]. In the original paper by Tytgat and co-workers [1], 49 different peptides were analyzed and three main family names were proposed for their classification: the α -KTx subfamilies 1 to 12, now expanded up to subfamily 17 (see [2]), the β -KTx subfamily from the work done with tityustoxin K β (synonymous to the TsTx-K β) [3], now expanded with two additional peptides BmTxK β * and BmTxK β 2* [2], and the γ -KTx, based on a new type of scorpion toxin, whose first example was Ergtoxin (abbreviated ErgTx) isolated from *Centruroides* (*C.*) *noxius*. This is a 42 amino acid residue peptide containing four disulfide bridges [4], shown to affect specifically K⁺-channels of the *ether-a-go-go*-related family of genes (*eag*) [5]. The ErgTx and ErgTx-like peptides described thus far are represented by four different peptides: (i) the original ErgTx [4,5]; (ii) ErgTx2, a 43 amino acid long peptide, also from the venom of the Mexican scorpion *C. noxius* shown to affect a long-lasting *eag*-related gene-type K⁺-current in MMQ lactotrops

[6], (iii) BeKm-1, a 36 amino acid long peptide with only three disulfide bridges, isolated from the scorpion *Buthus eupeus*, capable of blocking ERG-channels [7], and finally (iv) CsE-Kerg1, a 43 amino acid residue long peptide containing 4 disulfide bridges, isolated from the scorpion *C. sculpturatus* Ewing and shown to affect ERG-currents of NG108-15 cells [8]. Thus, different members of the ERG-type K⁺-channel family seem to be recognized by several different peptides isolated from different species of scorpions. The *eag* superfamily of genes encoding potassium channels encodes proteins with six transmembrane domains, having a conserved P region that conforms the ion pore when clustered in the tetrameric arrangement of the channel protein [9]. Mutations in the human-ERG-channel (HERG) give rise to inherited, type 2 long-QT syndrome [10], caused by a loss of the cardiac repolarizing current I_{Kr} [11,12]. Currents arising from expression of HERG or ERG, as the homologs in other species are known, also play a role in spike-frequency adaptation in neurons [13] and in human pancreatic β -cells [14]. The HERG-channels were earlier known to be the target of a group of potent drugs, including antiarrhythmics, antihistaminics and antibiotics [15,16], that block K⁺-currents, causing acquired long-QT syndrome as a side effect. The discovery of naturally occurring substances that can specifically and reversibly block or recognize these types of channels are fundamental for the search and development of new putative drugs to treat some of the diseases and malfunctions associated with HERG-channels. ErgTx was used successfully to examine the binding site on the HERG-channels [17] and to verify by site-directed mutagenesis of HERG genes the involvement of critical residues at the vestibule of the channel, where ErgTx is supposed to bind [18].

In this communication we report 23 novel primary structures directly determined and/or deduced from cDNA cloned genes of scorpions of the genus *Centruroides*. The presence of the corresponding peptides in the venom of the six species of scorpions studied was demonstrated by electrophysiological recordings, using the mouse neuroblastoma cell line F-11 (N18TG-2×DRG cells). They all contain *bona fide* blockers of the ERG-type K⁺-currents, supporting the assumption of their specificity towards this type of ion-channels. The sequences obtained allowed the construction of a phylogenetic tree, where these peptides were grouped in at least five distinct subfamilies. Except for the two already known [19], all the other subfamilies constitute original data of this communica-

*Corresponding author. Fax: (52)-73172 388.

E-mail address: possani@ibt.unam.mx (L.D. Possani).