



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS DE PROTEÍNAS A TRAVÉS DE LAS ESPECTROMETRÍA DE MASAS:
EL CASO DEL ALACRÁN BRASILEÑO *Tityus stigmurus*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

PRESENTA

SERGIO AGUSTÍN ROMÁN GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. CESAR VICENTE FERREIRA BATISTA

México, D. F

Febrero, 2007



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 se realizo en el laboratorio del Dr. Lourival Domingos Possani Postay del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos y en el laboratorio del Dr. Cesar Vicente Ferreira Batista de la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma De México (IBT-UNAM) en Cuernavaca Morelos bajo la tutoría del Dr. Cesar Vicente Ferreira Batista.

Agradecimientos al comité tutorial el cual siguió de cerca el desarrollo de esta tesis.

Dr. Cesar Vicente Ferreira Batista

Dr. Lourival Domingos Posanni Postay

Dr. Roberto Arreguín Espinosa

El trabajo realizado, contó con el apoyo económico de los donativos CONACyT-Morelos Fondo Mixto N-MOR2004 C-02-002 y CONACyT Fondo Salud N-2005-01-14109 concedido al laboratorio del Dr. Lourival Domingos Possani Postay y los donativos DGAPA-UNAM N-214705 y CONACyT-SEP N-47879-Q al Dr. Cesar Vicente Ferreira Batista. Así como con el apoyo otorgado al Biol. Sergio Agustín Román González como becario de CONACyT con registro 189808.

Índice	Páginas
Resumen.....	6
1.- Introducción y Antecedentes.....	8
1.1.- Alacranes, estructuras moleculares y actividades biológicas.....	8
1.2.- Metodologías proteómicas para el estudio toxinológico.....	14
1.3.-JUSTIFICACIÓN.....	23
2.- Objetivos.....	23
3.- Material y Métodos.....	24
3.1.- Obtención del Veneno.....	24
3.2.- Procedimiento de Aislamiento.....	24
3.3.- Determinación de la secuencia de aminoácidos.....	25
3.4.- Reducción.....	25
3.5.- Alquilación.....	25
3.6.- Digestión Enzimática.....	26
3.7.- Análisis por Espectrometría de Masas.....	26
3.8.- Programas Computacionales para el Análisis de datos espectrometricos y banco de datos.....	27
3.9.- Ensayos Electrofisiológicos.....	28
3.10.- Ensayos de Actividad de Hialuronidasa.....	28
4.- Resultados.....	29
4.1.- Separación del veneno, determinación de masas moleculares de los componentes, nuevas secuencias y actividad enzimática.....	29

4.2. Determinación de masas moleculares de los componentes, nuevas secuencias y actividad enzimática.....	32
4.3.- Caracterización química y fisiológica del componente Tst-17.....	39
4.4. Análisis comparativo de las 'huellas digitales" de masas moleculares del veneno de diferentes especies de alacranes del genero Tityus.....	41
4.5.- Caracterización química del PAPE, un péptido rico en prolinas.....	46
4.6. Caracterización química del componente Tst β KTx.....	47
4.7. Estructura primaria de la toxina Tst-3.....	48
4.8. Secuencias adicionales de N-terminales de otros componentes del veneno de <i>T. stigmurus</i>	49
5.-Discusión.....	49
Conclusiones.....	54
Bibliografía.....	56

Lista de figuras.

Figura 1.- Separación de los componentes del veneno del alacrán brasileño <i>Tityus stigmurus</i> por HPLC.....	30
Figura 2.- Resultado de la búsqueda a través del programa SEQUEST [®] de los datos obtenidos por la digestión enzimática con Lys-C de la toxina Tst-gama.....	32
Figura 3.- Espectro CID de uno de los péptidos obtenido por digestión con Lis-C de la Tst-1. Mostrando la secuencia que corresponde del E3 a la K13.....	36
Figura 4.- Secuencia completa de aminoácidos de 4 péptidos. La línea continua señala la secuenciación por degradación automática de Edman y en la línea punteada las secuencias hechas por CID.....	38

Figura 5.- Grafica de los ensayos electrofisiológicos de la Tst-17.....	41
---	----

Lista de Tablas.

Tabla 1.- Análisis de las "huellas digitales" de los venenos de cuatro especies de Tityus.....	34
--	----

Tabla 2.- Secuencia completa y N-terminales de péptidos purificados del veneno de T. stigmurus.....	39
---	----

Tabla 3.- Comparación de las estructuras primarias de las toxinas Tst-17 y Tc1.....	40
---	----

Tabla 4.- Familia de péptidos correlacionando masas moleculares con posibles funciones biológicas.....	45
--	----

RESUMEN

Los escorpiones son uno de los grupos de organismos más antiguos que habitan este planeta. Dentro de las características más asombrosas con las que cuentan, podemos mencionar sus técnicas de alimentación y defensa, en las cuales el individuo puede inocular a su presa o a su posible predador con una mezcla de toxinas de origen proteico.

Las características principales de estas toxinas son que la mayor parte de ellas funcionan como moduladores de canales de Na^+ y K^+ , pero también cuentan con fosfolipasas, hialorunidasas, liberadores de histamina y, en ocasiones, se han encontrado péptidos que afectan a canales de Cl^- y Ca^{++} . Es por ello que la investigación sobre estos componentes es fundamental para el estudio de los efectos de las toxinas sobre los distintos grupos de organismos. Las toxinas presentan gran especificidad por el canal blanco, así se han encontrado toxinas que afectan solo a canales de mamíferos, otras que afectan a insectos y otras con preferencia por crustáceos. Por todo esto, es de gran importancia médica y farmacológica conocer la naturaleza bioquímica que estas moléculas presentan.

En esta tesis se describe la caracterización química de los componentes del veneno del alacrán *Tityus stigmurus*, el cual pertenece a la familia Buthidae. Este alacrán es conocido debido a los graves accidentes que causa al interactuar con humanos.

En este trabajo describimos la separación cromatográfica de los compuestos solubles del veneno, así como la determinación de la masa molecular de cada uno de sus componentes por espectrometría de masas (MS). Con esto se construyó un mapa peptídico analítico, o "huella digital" de masas moleculares, también conocido como "*mass finger print*" en la literatura inglesa.

Se aplicaron y separaron en repetidas ocasiones 2 mg del veneno total por HPLC en una columna analítica C18. La separación de estos péptidos se colectaron manualmente y cada fracción se sometió a experimentos de espectrometría de masas, donde se determinó el peso de la molécula. En base a este "*mass finger print*" se trabajó con las toxinas más abundantes para los estudios de secuenciación y actividad fisiológica.

En este trabajo se logró determinar que el veneno del *Tityus stigmurus* cuenta con más de 100 moléculas distintas. Dentro de las que se destaca la Butantoxina y la Tst-gama, las cuales se identificaron inequívocamente por

espectrometría de masas en un Electrospray (ESI-MS). También se completó totalmente la secuencia de la Tst-3, así como la caracterización de la Tst-17, la cual presentó actividad sobre los canales *Shaker B* de K^+ , además de mostrar una similitud muy importante con la Tc1 reportada en *Tityus cambridgei*.

En los resultados obtenidos, se encuentran las secuencias parciales de 10 péptidos y 7 secuencias completas. Dentro de las secuencias parciales se pudo determinar la actividad de hialuronidasa y otra posiblemente de fosfolipasa.

Otro de los resultados que se presentan en este trabajo es el de la presencia de la TsTX beta de K^+ , la cual ha sido reportada en el veneno de otra especie de alacrán, el *Tityus serrulatus*.

Abstract

The scorpions are one of the oldest animals in the earth, with more than 350 million years of evolution. These organisms are able to produce hundreds of compounds in their venoms with a large range of biological activities. One of the most important families of components is the peptides that affect the ionic flux through cellular membranes by modifying the gating of Na^+ channels or blocking K^+ channels. The enzymatic content of scorpion venoms is remarkable since phospholipases, hyaluronidases, proteases and gelatinolytic activities have been reported. In this work we report the proteomic analysis of the venom from the Brazilian scorpion *Tityus stigmurus*, which is responsible for several accidents in the East and Northeast regions of Brazil, including fatal cases. The venom was extracted by electrical stimulation and the soluble fraction was submitted to HPLC separation. The fractions were manually collected, dried in the speed-vac and analyzed by mass spectrometry and automatic Edman degradation. The molecular mass finger print analysis of the venom showed more than one hundred different components. Unequivocal identification of the known toxins Butantoxin, Tst-III-8 and Tst-gamma were made by molecular weight and tryptic digestion analyzed by LC-MS/MS and here we report by the same technique the sequence of four new peptides, The Tst-17, the PAPE peptide, the Tst β KTX, and the Tst-3. These data were compared with those found in other scorpion of the genus *Tityus* (T.): *T. bahiensis*, *T. cambridgei* and *T. costatus*. Several groups of peptides/proteins were found in all these species, v.g., small peptides of low molecular masses, most of them with

unknown physiological function; short-chain peptides in the order of 4,000 a.m.u., specific for K^+ -channels; long-chain peptides with molecular masses in the order of 7,500 a.m.u., specific for Na^+ -channels and large proteins (up to 40,000 a.m.u.) of unknown function.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1.- Alacranes, estructuras moleculares y actividades biológicas.

Los alacranes son parte de uno de los grupos de organismos más antiguos sobre la tierra (más de 400 millones de años de evolución). En la actualidad están representados por más de 1500 especies diferentes, cuya morfología permanece prácticamente inalterada de acuerdo con los registros fósiles.

Estos organismos pertenecen a la clase Aracnidae, Orden Scorpionidae. Los alacranes más peligrosos para el hombre pertenecen a la familia *Buthidae*, que se conforma de aproximadamente 500 especies, dentro de las cuáles los géneros *Androctonus*, *Leiurus*, *Buthus*, *Buthotus*, y *Heterometrus* se localizan principalmente en el norte de África, en el viejo continente, en Medio Oriente, e India. El género *Parabuthus* ha sido encontrado en Sudáfrica. En el continente Americano, los alacranes del género *Centruroides* son los más peligrosos para el hombre y están distribuidos en la parte sur de EU, México y Centroamérica. Mientras que el género *Tityus* se encuentra distribuido en Trinidad y Tobago, Sudamérica, y de manera importante en Brasil, Venezuela, Colombia, y Argentina.

La especie de alacrán *Tityus stigmurus* es endémica en la región noreste de Brasil, la cual comprende los estados de Sao Paulo, Minas Gerais y Río de Janeiro. Esta especie junto con las especies *T. serrulatus* y *T. bahiensis* son consideradas de importancia médica en Brasil por su alta incidencia en graves casos de intoxicación y muerte.

La intoxicación causada por la picadura del alacrán *T. stigmurus* se caracteriza por presentar síntomas locales como dolor, adormecimiento, edema, eritema, parestesia y manifestaciones generales como dolor de cabeza, vómito y sudoración [ⁱ].

Existe poca información disponible en la literatura sobre la composición química del veneno de esta especie. Becerril y col. trabajando con las toxinas más abundantes del veneno de *T. stigmurus*, publicaron la secuencia de aminoácidos completa de dos toxinas denominadas Tst III-8 y Tst-gamma, también conocidas como Tst1 y Tst2. Estos autores también caracterizaron parcialmente el N-terminal de una tercera, la Tst-3. Estas toxinas presentan alto porcentaje de identidad secuencial con las toxinas Ts1 y Ts2, aisladas del veneno de *T. serrulatus* y con las toxinas Tb1 y Tb2 caracterizadas del veneno de *T. bahiensis*. Mediante el uso de anticuerpos específicos de conejo y caballo Becerril y col. observaron un extenso grado de reacción cruzada, concluyendo que las tres especies en estudio *T. serrulatus*, *T. bahiensis* y *T. stigmurus* poseen componentes tóxicos muy similares y que, sus genes son organizados, procesados y expresados de forma similar [xvii].

De igual forma, se reportó la presencia de una toxina común en varias especies de *Tityus* (*T. bahiensis*, *T. trevittatus* y *T. serrulatus*) denominada Butantoxina. De esta toxina se estudió su actividad fisiológica y características estructurales. En el año 2000 se publicó la estructura tridimensional de la Butantoxina a través de Resonancia Magnética Nuclear por Holaday y col [ⁱⁱ].

Los alacranes son organismos de gran interés debido a su evolución, importancia médica, y por la producción de

componentes biológicamente activos en sus glándulas venenosas [iii]. El veneno de los alacranes es una compleja mezcla de componentes químicos que incluyen: mucopolisacáridos, serotonina, histamina, inhibidores de proteasas, liberadores de histamina, enzimas (fosfolipasas y hialuronidasas) y cientos de péptidos bioactivos [iii,iv] que son tóxicos para una gran variedad de organismos incluyendo al hombre [v].

Estos venenos poseen principalmente dos tipos de toxinas: polipéptidos de cadena larga y polipéptidos de cadena corta. Las toxinas de cadena larga presentan una longitud de 60 a 76 residuos de aminoácidos, empaquetados con cuatro puentes disulfuro, y actúan principalmente sobre canales iónicos de Na^+ [iii,iv], pero también se encuentran ejemplares que afectan a canales de K^+ en células excitables [vi]. Estos contienen una estructura altamente conservada: una α -hélice unida a tres hojas β plegadas antiparalelas, conectadas por regiones variables formando asas y estabilizadas por dos puentes disulfuro [iii,viii,ix].

Los canales iónicos forman poros para permitir un flujo iónico específico a través de la membrana. El movimiento de los iones a través de los canales es pasivo, y esta regulado por el gradiente de concentración iónica que se establece a ambos lados de la membrana. La otra característica de los canales iónicos, es la selectividad que tienen por los iones, aunque hay excepciones en las que podemos encontrar canales dependientes de ligando que pueden permitir la entrada de más de una especie iónica.

La apertura y cierre de algunos canales iónicos esta regulada por sus ligandos específicos de señal, tal como el GMPC, IP_3 , aminas y acetilcolina. Otros mecanismos de

regulación de los canales iónicos es el potencial de membrana. Los canales iónicos dependientes de voltaje tienen sensores en sus moléculas para detectar cambios en el potencial de membrana. Los sensores en la molécula del canal detectan la despolarización de la membrana lo que provoca un cambio conformacional que conduce a la apertura del canal. Cuando el potencial de membrana de la célula regresa al estado de reposo, el canal se cierra. La concentración intracelular de varios iones es completamente diferente a la del espacio extracelular. Esta diferencia iónica y las proteínas cargadas negativamente le dan a la célula una carga neta negativa, la cual es llamada potencial de membrana.

El potencial de membrana de células excitables incrementa rápidamente, a un potencial positivo cuando las células son estimuladas, y luego recupera su estado en reposo. A la transición positiva del potencial de la célula se le llama potencial de acción.

Los canales iónicos dependientes de voltaje están formados por subunidades α , el componente formador del poro y una subunidad β reguladora. Se ha predicho que la subunidad α del canal de K^+ dependiente voltaje posee seis regiones transmembranales (S1-S6). Los canales de Na^+ dependientes de voltaje y los canales de Ca^{2+} tienen una estructura básicamente similar a la de los canales de K^+ dependientes de voltaje. La estructura de los canales de Cl^- dependientes de voltaje, incluyen ClC-1, ClC-5, y ClC-Kb, y no son similares a otros canales iónicos. Se especula que estos canales tienen de 10 a 12 dominios transmembranales, pero aún no se tiene clara la estructura topológica precisa [vii].

Desde el punto de vista farmacológico las toxinas de alacrán son conocidas como α o β de acuerdo a su sitio de unión en los canales de Na^+ . Las toxinas α se unen al sitio 3 de este canal de manera dependiente de voltaje, inhiben la fase de inactivación en el potencial de acción, induciendo la prolongación del mismo [viii, iii, ix]. Estas se pueden dividir en tres grupos: 1) las clásicas toxinas α que son altamente específicas para mamíferos, 2) las toxinas α para insectos, altamente activas en insectos y 3) las toxinas α activas tanto en insectos como en mamíferos [iv].

Las toxinas β se unen en el sitio 4 del canal de manera independiente del voltaje, y modulan la fase de activación del potencial de acción [viii, iii, ix]. Las toxinas de clase β se pueden clasificar en dos grupos: 1) toxinas para insectos que actúan de manera excitatoria y 2) toxinas para insectos que actúan de manera inhibitoria. Las toxinas excitatorias actúan específicamente en insectos induciendo una rápida contracción excitatoria, lo que conlleva a una parálisis. Las toxinas que actúan deprimiendo los tejidos, producen parálisis flácida [iv].

Los péptidos de cadena corta actúan como bloqueadores de canales iónicos de K^+ , contienen de 23 a 40 residuos de aminoácidos, que están fuertemente compactados por 3 ó 4 puentes disulfuro. En cuanto a su estructura secundaria, poseen en común un segmento α -hélice y 2 ó 3 hojas β plegadas antiparalelas, las cuáles son estabilizadas por 2 puentes disulfuro localizados entre 2 secuencias de aminoácidos conservadas CXC y CXXXC (donde C es una Cisteína y X cualquier aminoácido). Estos motivos mantienen la estructura tridimensional y son esenciales para el reconocimiento de los canales de potasio [x, iv].

En experimentos de unión y/o electrofisiología se muestra que la afinidad de estos péptidos por varios subtipos de canales de K^+ varía entre concentraciones micromolares a picomolares [^{xi}].

De las 120 toxinas bloqueadoras de canales de potasio conocidas hasta la fecha, apenas la mitad han sido probadas contra canales de potasio y/o asociadas a corrientes iónicas. Para 59 de ellas no existe evidencia directa de la función descrita y la mayoría de las funciones directamente realizadas han sido ensayadas contra los canales relacionados al tipo *Shaker* (sub-familia $K_v1.x$). Sin embargo, muchos péptidos actúan sobre canales de potasio activados por Ca^{++} de conductancia grande ($K_{Ca1.1}$), intermedia ($K_{Ca3.1}$) o pequeña ($K_{Ca2.x}$) [^{xii}]. Recientemente se reportó una nueva familia de toxinas que actúan específicamente sobre canales tipo *ether-a-go-go* relacionado a la familia $K_v11.x$ [^{xiii, xiv, xv, xvi}].

De todas las toxinas de alacranes estudiadas hasta el momento, las que afectan canales iónicos de Na^+ son de las que se tiene mayor conocimiento debido al interés médico, ya que presentan toxicidad hacia mamíferos [^{xvii}]. Adicionalmente, se han reportado péptidos capaces de afectar la función de canales de Cl^- y Ca^{2+} [v].

Además de las toxinas, los venenos de alacrán contienen un número desconocido de componentes cuyas funciones se han dilucidado rápidamente en los últimos años. La presencia de enzimas como las fosfolipasas, ha sido reportada en la literatura. Tal es el caso de la Phayodactylipina, aislada del alacrán *Anuroctonus phaiodactylus*, una fosfolipasa glicosilada heterodimérica que cuenta con dos subunidades, una de 108 aminoácidos y otra de 18 aminoácidos de longitud [^{xviii}]. Así como también

de la fosfolipina aislada del alacrán *Pandinus imperator* [xix].

De los venenos de los alacranes *Parabuthus schlechteri* y *Opisthophthalmus carinatus* se han aislado los péptidos antimicrobianos y antifúngicos, como son la Parabutoporina y las Opistoporinas 1 y 2, respectivamente. También se ha reportado la acción antibacteriana del péptido llamado Escorpina, que además posee una potente actividad inhibitoria en diferentes fases de desarrollo del parásito *Plasmodium berghei* [xx]. Del alacrán *Hadrurus gerstchi* se aisló la Hadrurina, uno de los primeros péptidos antimicrobianos descritos [xxi].

1.2 Metodologías proteómicas para el estudio toxinológico

A finales de los ochentas, la espectrometría de masas revolucionó el estudio de proteínas debido al surgimiento de la ionización de macromoléculas. El desarrollo de sistemas de ionización por dispersión líquida, a través de la aplicación de alto voltaje (ESI) y por láser asistido por matrices sólidas (MALDI), desarrollados por J. Fenn [xxii] y K. Tanaka [xxiii], respectivamente (Nóbel de Química, 2002), constituyen las bases fundamentales de esta tecnología.

Actualmente, la espectrometría de masas es la mejor herramienta para el análisis proteómico a larga escala: a través de la determinación de masas moleculares con alta exactitud (<0.001 Da), identificación de proteínas a través de mapas peptídicos provenientes de proteólisis [xxiv], secuenciación de proteínas [xxv], estudio de cinética enzimática [xxvi], caracterización de interacciones proteína-proteína [xxvii], proteína-DNA [xxviii], cuantificación de

proteínas [xxix], determinación de modificaciones postraduccionales [xxx], identificación de mezclas de proteínas [xxxi], entre otras, todas ellas a nivel submicromolar.

Con la acumulación de una gran cantidad de secuencias de DNA en los bancos de datos, la comunidad científica se ha dando cuenta de que teniendo solamente la secuencia genómica no es suficiente para dilucidar la función biológica de las proteínas [xxxii], ya que esta información no dirá en que célula será expresada determinada proteína, ni en qué estado de desarrollo o diferenciación se encuentra la célula. La información genética por si sola no indica la función fisiológica de la proteína, ni el tipo de modificaciones cotraduccionales o postraduccionales que están presentes [xxxiii]. Una célula es normalmente dependiente de una multitud de vías metabólicas y regulatorias para su supervivencia. No hay una relación lineal directa entre los genes y su complemento proteico (proteoma) en las células [xxxii]. La existencia de un marco de lectura abierto en los datos genómicos no implica la existencia de un gen funcional. A pesar de los avances en la bioinformática, todavía es difícil predecir con precisión un marco de lectura abierto [xxxiv]. Por ejemplo, la tasa de error en la anotación de 340 genes del genoma de *Mycoplasma genitalium* fue de alrededor del 8%, si esto se extrapola al genoma humano el resultado y las consecuencias pueden ser fácilmente imaginados.

Otra consideración importante relacionada a los organismos superiores (eucariontes) es la presencia del complejo proteico procesador de RNA conocido como "Spliceosoma", el cual procesa intrones para producir el RNA maduro (RNAm) que va a ser traducido por el sistema

ribosomal. Por lo que, la verificación del producto funcional de los genes por métodos proteómicos es un paso importante para la anotación de un genoma.

Para la identificación de proteínas en mezclas complejas (célula, tejido, veneno, etc) el primer paso es la separación de la mezcla proteica, la cual se realiza principalmente por métodos electroforéticos y/o cromatográficos. La 2D-PAGE produce una separación proteica de alta resolución, basada en la masa molecular y el punto isoeléctrico (pI) de la proteína, lo que origina entre mil y cinco mil puntos proteicos definidos. Sin embargo, su resolución está limitada a la hidrofobicidad y solubilidad de las proteínas de la muestra.

Las técnicas cromatográficas son diversas y dependiendo de la elegida esta puede dar una mejor resolución de las proteínas de interés. La segunda etapa en el proceso de identificación de proteínas es la digestión de la proteína "en gel" o en solución, dependiendo del método de separación. Después de la digestión enzimática, los péptidos generados son extraídos del gel y analizados directamente en el espectrómetro de masas en el caso del MALDI-TOF o separados por columnas capilares de fase reversa "en línea" conectados directamente al ESI-MS. El resultado final será la obtención de un conjunto de péptidos con masas moleculares exclusivas de la secuencia única de la proteína analizada.

Estos valores de masas moleculares, son sometidos a los bancos de datos de proteínas para espectrometría de masas a través de programas como el PROSPECTOR (<http://prospector.ucsf.edu/>) y MASCOT- (<http://www.matrixscience.com>) lo que podrá resultar en la identificación inequívoca de la proteína, en el caso de ser

conocida. Sin embargo, si una proteína pura es digerida y las masas de los péptidos son comparadas con la lista de las masas de los péptidos predichos de esta proteína, comúnmente se hacen dos observaciones.

Primero, no todos los péptidos predichos serán detectados. Segundo, algunas de las masas detectadas no estarán presentes en la lista de masas esperadas de la proteína. En el primer caso, las masas ausentes, se deben a varios fenómenos que pueden ocurrir antes o durante los análisis por espectrometría de masas. Estos son la poca solubilidad, adsorción selectiva, supresión de iones, ionización selectiva, péptidos muy cortos u otros elementos que causan la pérdida de muestra o hacen que péptidos específicos no sean detectables al tipo de analizador MS. En el segundo caso, concerniente a las masas adicionales a las predichas, en general se debe a productos de degradación de la enzima utilizada y contaminaciones derivadas de la queratina [xxxv] o cortes inespecíficos de la enzima sobre el péptido en estudio.

Uno de los problemas en la identificación de proteínas utilizando la Espectrometría de Masas tipo MALDI-TOF es que las proteínas no son conocidas, ósea, no se encuentran disponibles en los bancos de datos, como es el caso de la mayoría de las toxinas de alacrán.

Con el advenimiento de la secuenciación a través de técnicas espectrométricas como CID (Collisionally Induced Dissociation) y PSD (Post Source Decay) se hizo posible la caracterización de la estructura primaria de toxinas, lo que antes sólo se obtenía por degradación de Edman [xxx, xxxvi, 26].

Como resultado de la fragmentación de péptidos por CID, nosotros podemos observar la formación de "iones

hijos". Estos iones hijos se pueden observar en 2 series, los iones de la serie "a", "b" y "c", los cuales contienen la información del N-terminal de los péptidos. Y los iones de la serie "x", "y" y "z", los cuales contienen la información de la fracción C-terminal del péptido en estudio. En los experimentos de secuenciación de proteínas, se usa la información que se obtiene a partir de las series "b" y "y", ya que estas son las series mas comunes en la fragmentación. Esta fragmentación ocurre en cada uno de los distintos enlaces peptídicos.

El análisis proteómico de venenos basado en la espectrometría de masas es relativamente reciente. Los primeros trabajos de caracterización de toxinas por espectrometría de masas comenzaron en la década de los ochentas utilizando espectrómetros con fuente de ionización tipo FAB (Fast Atom Bombardment) [xxxvii]. Sin embargo, los primeros trabajos de análisis sistemáticos de venenos empezaron a ser publicados en la mitad de la década de los noventas, como por ejemplo, el trabajo publicado por el grupo de Nakajima T y col, en el que utilizan la cromatografía líquida para la separación de venenos de arañas y un sistema MALDI-TOF para construir "huellas digitales" de masas moleculares de toxinas [xxxviii, xxxix].

Actualmente, el estudio de venenos se basa principalmente en la espectrometría de masas, que permite el aislamiento y determinación de masas moleculares de prácticamente todos los componentes. Además, la secuenciación a través de métodos como CID permite una rápida identificación de toxinas en bancos de datos e inferir funciones a partir de fragmentos de secuencia.

La posibilidad de aislar poblaciones iónicas que difieren en décimos de unidades de masa molecular en las

cámaras de fragmentación de analizadores iónicos como triples cuadrupolos, trampas de iones lineales o tridimensionales, entre otros analizadores híbridos, permite analizar casi simultáneamente diferentes moléculas en fracciones de segundo. Nascimento y col. en una publicación reciente usaron la cromatografía líquida de dos dimensiones acoplada a un espectrómetro de masas tipo Q-TOF para inferir relaciones filogenéticas de cinco especies de alacranes pertenecientes a la familia *Buthidae*. Con este tipo de metodología lograron caracterizar 2413 diferentes componentes en los venenos en el estudio de las toxinas [^{x1}].

CID es una técnica por la cual los iones son aislados a través de campos electromagnéticos e inducidos a la fragmentación por incremento de voltaje contra partículas de un gas neutral (helio, argón o xenón). Los fragmentos producidos, o iones hijos, se dilucidan en el espectro CID o MS/MS del cual se obtiene la información estructural de los péptidos.

Por otra parte, PSD es una técnica para la obtención de información estructural de péptidos que utiliza espectrómetros de masas tipo MALDI-TOF con analizadores en reflectrón y que por ende puede diferenciar los iones precursores de los iones metaestables por sus diferentes energías cinéticas. Los espectros PSD se originan a partir de iones metaestables en la región de aceleración y durante el tiempo de vuelo en los analizadores en reflectrón, fuera de la fuente de ionización, a través de choques mono o bimoleculares.

Actualmente, la espectrometría de masas es la metodología más usada para la cuantificación de proteínas y la identificación de sus modificaciones postraduccionales.

Los mecanismos de regulación de las funciones proteicas a través de proteólisis, reciclaje y secuestro de proteínas en compartimentos subcelulares son procesos que afectan directamente a las proteínas. Las interacciones proteína-proteína y la composición de estructuras celulares, como organelos, sólo pueden ser determinadas a nivel proteico. Las metodologías como MS-CID que utilizan isótopos estables como iTRAQ™, ICAT, entre otros, son las que permiten cuantificar proteínas precisa y directamente [xxvi].

Específicamente hablando del análisis proteómico (identificación y caracterización de proteínas en larga escala), uno de los puntos en el cual la espectrometría de masas ha sido de fundamental importancia, es en la determinación de modificaciones postraduccionales (MPTs) [^{xli}].

Por un gran número de razones, el análisis de las MPTs es mucho mas complejo que una simple identificación proteica: 1) las proteínas son frecuentemente modificadas, pero estas modificaciones, en muchas ocasiones, se traducen en pequeños cambios en la masa del péptido o proteína en estudio. Por lo tanto, es necesaria una gran sensibilidad para la detección de estas modificaciones;

2) las proteínas pueden ser identificadas por secuenciación a través de degradación automática de Edman o por medio de la "huella digital" de masas moleculares de péptidos generados enzimáticamente o por disociación inducida por colisión (CID). La identificación de las MPTs requiere del aislamiento y el análisis del péptido específico que contiene los residuos modificados;

3) el enlace entre las MPTs y los péptidos es frecuentemente lábil, lo que genera mayor grado de

dificultad para mantener el péptido en su estado modificado mientras la muestra es analizada;

4) se han descrito más de 400 diferentes tipos de modificaciones en proteínas [^{xlii}].

La función de las MPTs en las proteínas de la mayoría de los sistemas biológicos es prácticamente desconocida. Estas modificaciones pueden alterar seriamente la conformación, estabilidad, localización, interacción y la función de las proteínas. Las proteínas presentan modificaciones en distintos sitios y no es posible predecir solo con la secuencia de aminoácidos completa cuál será el sitio que se modificará en respuesta a condiciones específicas. Citando la fosforilación como ejemplo de MPTs es necesario decir que aproximadamente el 2% del código genético humano codifica para cinasas y fosfatasas [^{xliii}] y que el 33% de las proteínas de eucariontes son o fueron fosforiladas en determinado momento [^{xliv, xlv}]. Esto nos da una idea de la importancia de estas modificaciones para su función.

Se sabe que la gran cantidad de MPTs presentes en las histonas actúan como un código molecular dinámico y que son señales fundamentales en el control de la transcripción. También es conocido el papel que juegan las glicoproteínas a nivel celular, las cuales constituyen gran parte de los receptores de membrana.

Las modificaciones postraduccionales en toxinas ocurren especialmente en los venenos de las especies de *Conus*, de donde ya se identificaron péptidos que contienen grupos metilos, acetilos y halógenos como bromo [^{xlvi}]. En el caso de las toxinas de alacrán, se conocen las modificaciones presentes en el N-terminal y C-terminal de algunos péptidos.

La discrepina, aislada del veneno del alacrán *Tityus discrepans* [^{xlvii}] es una toxina que presenta el N-terminal bloqueado por el aminoácido modificado conocido como piroglutámico, cuya amina primaria es convertida en secundaria por la ciclación del ácido glutámico, no permitiendo, de esta forma, la secuenciación directa por degradación de Edman.

Por otro lado, las amidaciones del C-terminal de toxinas son modificaciones comunes en toxinas de alacrán. Ensayos electrofisiológicos han demostrado que las toxinas que presentan C-terminales amidados son, en algunos casos, muchos ordenes de magnitud más activas en el bloqueo o modificación del mecanismo de apertura y cierre de canales iónicos [^{xlviii}].

Los múltiples puentes disulfuro presentes en toxinas de alacrán también son considerados modificaciones postraduccionales y son fácilmente determinadas por digestiones enzimáticas analizadas por MALDI-TOF usando las masas moleculares predichas de dímeros y/o trímeros contra los valores experimentales.

Obviamente, la determinación de enlaces de disulfuro también puede ser realizada por otros sistemas espectrométricos como ESI acoplado a diferentes analizadores iónicos. Aunque las clásicas toxinas bloqueadoras y/o modificadoras de canales iónicos no presenten un extensivo número de MPTs, en otros componentes del veneno de estos arácnidos, como las fosfolipasas y hialuronidasas, estas son muy frecuentes. Valdez y col recientemente reportaron la presencia de varios sitios putativos de glicosilación en la fosfolipasa Phayodactipilina y determinaron directamente por espectrometría de masas una compleja N-glicosilación que

contiene siete unidades moleculares de azúcares simples [xviii].

Una de las nuevas tecnologías para la anotación de proteomas completos es la cromatografía líquida multidimensional (MudPit) desarrollada por Yates y col. [xlix].

Esta tecnología se fundamenta en la asociación de dos fases estacionarias en cadena, una de separación por intercambio iónico y otra por interacción hidrofóbica. De esta forma es posible aislar mezclas complejas de péptidos producidos a través de digestión enzimática de una o de miles de proteínas.

Debido a su versatilidad, sensibilidad y rapidez analítica, la espectrometría de masas se ha colocado como la herramienta de excelencia para el estudio de venenos complejos como es el caso de los alacranes. Por tanto, la diversidad de especies de alacranes existentes (1500), la complejidad de los venenos y la acción farmacológica, en conjunto con poderosas herramientas para el análisis de proteínas hacen extremadamente atractiva la investigación de nuevas moléculas biológicamente activas en los venenos de estos arácnidos.

ⁱ Rejâne Maria Lira-da-Silva, Andréa Monteiro de Amorim e Tania Kobler Brazil, . 2000. Envenenamento por *Tityus stigmurus* (Scorpiones; Buthidae) no Estado da Bahia, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 33(3):239-245, mai-jun.

ⁱⁱ Holaday, S. K., Martin, B. M., Flechter, P. L., Krishna, N. R. (2000). NMR solution structure of Butantoxin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 379: 18-27.

ⁱⁱⁱ Possani, L.D., Becerril, B., Delpierre, M., Tytgat, J., 1999. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *Eur. J. Biochem.* 264:287-300.

^{iv} Goundet, C., Chi, Chen-Wu., Tytgat, J., 2002. An overview of toxin and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Toxicon*. 40:1239-1258.

-
- ^v Batista, C.V.F., Zamudio, F.Z., Lucas, F., Fox, J.W., Fraud, A., Prestipino, G., Possani, L.D., 2002. Scorpion toxins from *Tityus cambridgei* that affect Na⁺-channels. *Toxicon* 40: 557-562.
- ^{vi} C. Legros., B. Ceŕard., P. E. Bougis., M. F., Martin-Eauclaire., 1998. Evidence for a new class of scorpion toxins active against K⁺ channels. *FEBS Letters*. 431: 375-380.
- ^{vii} Hatta, S., Sakamoto, J., Horio, Y., 2002. Ion channels and diseases. *Med Electron Microsc*. 35:117-126.
- ^{viii} Pimenta, A.M.C., Stöcklin, R., Favreau, P., Bougis, P.E., Martin-Aauclaire, M.F., 2001. Moving pices in a proteomic pulzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae). *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 15:1562-1572.
- ^{ix} Pimenta, A.M.C., Martin-Euclaire, M.F., Rochat, H., Figueiredo, G.S., Klapothakis, E., Afonso, L.C.C., De Lima, M.E., 2001. Purification, amino-acid sequence and partial characterization of two toxins whit anti-insect activity from the venom of the South American scorpion *Tityus bahiensis* (Buthidae). *Toxicon*. 39:1009-1019.
- ^x Batista, C.V.F., Gómez-Lagunas, F., Lucas, F., Possani, L.D., 2000. Tc1, from *Tityus cambridgei*, is the firts member of a new subfamily of scorpion toxin that blocks K⁺-channels. *FEBS Lett* .486:117-120.
- ^{xi} Possani, L.D., Selisko, B., Gurrola, G.B., 1999. Structure and function of scorpion toxins affecting K⁺-channels. *Perspectives in drugs discovery and design*. 15/16:15-40.
- ^{xii} Rodríguez de la Vega, R. C., Possani, L. D. 2004. Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. *Toxicon* 43, 865-875.
- ^{xiii} Georgina B. Gurrola, Barbara Rosati, Marcella Rocchetti, Genaro Pimienta, Antonio Zaza, Annarosa Arcangeli, Massimo Olivotto, Lourival D. Possani,* and Enzo Wanke. 1999. A toxin to nervous, cardiac, and endocrine ERG K⁺ channels isolated from *Centruroides noxius* scorpion Venom. *FASEB J*. 13, 953-962.

^{xiv} Yuliya V. Korolkova, Sergey A. Kozlov, Aleksey V. Lipkin, Kirill A. Pluzhnikov, Jennifer K. Hadley, Alexander K. Filippov, David A. Brown, Kamilla Angeloi, Dorte Strøbæk, Thomas Jesperseni, Søren-Peter Olesen, Bo S. Jensen, and Eugene V. Grishin, . 2001. An ERG Channel Inhibitor from the Scorpion *Buthus eupeus*. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 276, No. 13, Issue of March 30, pp. 9868-9876.

^{xv} Marzia Lecchi, Elisa Redaelli, Barbara Rosati, Georgina Gurrola, Tullio Florio, Olivia Crociani, Giulia Curia, Rita Restano Cassulini, Alessio Masi, Annarosa Arcangeli, Massimo Olivotto, Gennaro Schettini, Lourival D. Possani, and Enzo Wanke, . 2002. Isolation of a Long-Lasting eag-Related Gene-Type K_v Current in MMQ Lactotrophs and Its Accommodating Role during Slow Firing and Prolactin Release. The Journal of Neuroscience, May 1, 2002, 22(9):3414-3425

^{xvi} Nastainczyk, W., Meves, H., Watt, D, D., 2002. A short-chain peptide toxin isolated from *Centruroides sculpturatus* scorpion venom inhibits ether-á-go-go-related gen K⁺-channels. *Toxicon* (40) 1053-1058.

^{xvii} Becerril, B., Corona, M., Coronas, F.I.V., Zamudio, F., Calderon-Aranda, E.S., Fletcher, P.L.Jr., Martín, B.M., Possani, L.D., 1996. Toxic peptides and genes encoding toxin γ of the Brazilian scorpions *Tityus bahiensis* and *Tityus stigmurus*. *Biochem. J.* 313 : 753-760.

^{xviii} Norma A. Valdez-Cruz, Cesar V. F. Batista and Lourival D. Posan, . 2004. Phaiodactylipin, a glycosylated heterodimeric phospholipase A2 from the venom of the scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*. *Eur.J.Biochem.* 271, 1453-1464.

^{xix} Renaud Conde, Fernando Z. Zamudio, Baltazar Becerril, Lourival D. Possani, . 1999. Phospholipin, a novel heterodimeric phospholipase A2 from *Pandinus imperator* scorpion venom. *FEBS Letters* (460) 447-450.

^{xx} Renaud Conde, Fernando Z. Zamudio, Mario H. Rodríguez, Lourival D. Possani, . 2000. Scorpine, an anti-malaria and

anti-bacterial agent purified from scorpion Venom. FEBS Letters (471) 165-168.

^{xxi} Torres-Larios A., Gurrola GB., Zamudio FZ., Possani LD., 2000. Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. Eur. J. Biochem. Aug; 267 (16): 5023-5031.

^{xxii} John B. Fenn., 2003. Electrospray Wings for Molecular Elephants (Nobel Lecture)**. Angew. Chem. Int. Ed. 42: 3871-3894.

^{xxiii} Koichi Tanaka, Hiroaki Waki, Yutaka Ido, Satoshi Akita, Yoshikazu Yoshida and Tamio Yoshida (Shimadzu Corporation, Nishinokyo-Kuwabaracho, Nakagyo-ku,. (1988) Protein and Polymer Analyses up to m/z 100,000 by Laser Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry, Vol.2 No.8, Page 151-153.

^{xxiv} Raska CS, Parker CE, Sunnarborg SW, Pope RM, Lee DC, Glish GL, Borchers CH,. (2003).Rapid and sensitive identification of epitope-containing peptides by direct matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometry of peptides affinity-bound to antibody beads. J Am Soc Mass Spectrom. Oct;14(10):1076-85.

^{xxv} Dongre AR, Eng JK, Yates JR 3rd,. (1997). Emerging tandem-mass-spectrometry techniques for the rapid identification of proteins. Trends Biotechnol. Oct;15(10):418-25.

^{xxvi} Jennings LL, Malecki M, Komives EA, Taylor P,. (2003). Direct analysis of the kinetic profiles of organophosphate-acetylcholinesterase adducts by MALDI-TOF mass spectrometry. Biochemistry. Sep 23; 42(37):11083-91.

^{xxvii} Andersen JS, Rappsilber J, Steen H, Pandey A, Molina H, Lund M, Podtelejnikov A, Lamond AI, Mann M,. (2002). Multi-protein complexes studied by mass spectrometry. Scientific World Journal. Jan 2;2(1 Suppl 2):91-2.

^{xxviii} Cavanagh J, Benson LM, Thompson R, Naylor S,. (2003). In line desalting mass spectrometry for the study of

noncovalent biological complexes. *Anal Chem.* Jul 15;75(14):2949-54.

xxix Aebersold R,. (2003). Quantitative proteome analysis: methods and applications. *J Infect Dis.* Jun 15;187 Suppl 2:S315-20.

xxx Mann M, Ong SE, Gronborg M, Steen H, Jensen ON, Pandey A,. (2002). Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol.* Jun;20(6):261-8.

xxxi MacCoss MJ, McDonald WH, Saraf A, Sadygov R, Clark JM, Tasto JJ, Gould KL, Wolters D, Washburn M, Weiss A, Clark JI, Yates JR 3rd,. (2002). Shotgun identification of protein modifications from protein complexes and lens tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 11;99(12):7900-5.

xxxii Pandey A, Mann M,. (2000). Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 405, 837-846.

xxxiii Hochstrasser, D.F., Sanchez, J. C., Appel, R. D., (2002). Proteomics and its trends facing nature's complexity. *Proteomics.* 2, 807-812.

xxxiv Dunham I, Shimizu N, Roe BA, Chissoe S, Hunt AR, Collins JE, Bruskiewich R, Beare DM, Clamp M, Smink LJ, Ainscough R, Almeida JP, Babbage A, Bagguley C, Bailey J, Barlow K, Bates KN, Beasley O, Bird CP, Blakey S, Bridgeman AM, Buck D, Burgess J, Burrill WD, O'Brien KP, et al,. (2000). The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature.* 1999 Dec 2;402(6761):489-95. Erratum in: *Nature* Apr 20;404(6780):904.

xxxv Aebersold, R., Goodlett, D.R., (2001). Mass Spectrometry in Proteomics. *Chem. Rev.* 101:269-295.

xxxvi McCormack, A., Schieltz, D., Goode, B., Yang, S., Barnes, G., Drubin, D., Yates III, J. R., 1997. Direct

analysis and identification of proteins in mixtures by LC/MS/MS and database searching at the low-femtomole level. *Anal. Chem.*, 69, 767-776.

^{xxxvii} Carol V. Bradley, Dudley H. Williams and Michael R. Hanley. 1982. Peptide sequencing using the combination of Edman degradation, carboxypeptidase digestion and Fast Atom Bombardment mass spectrometry. [Biochemical and Biophysical Research Communications](#). 104 (4); 1223-1230.

^{xxxviii} Palma MS., Itagaki Y., Fujita T., Hisada M., Naoki H., Nakajima T. 1997. Mass Spectrometric structure determination of spider toxins: arginine-containing acylpolyamides from venom of Brazilian garden spider *Nephilengys cruentata*. *Nat Toxins*. 5(2):47-57.

^{xxxix} Pierre Escoubas , Marie Louise Célérier and Terumi Nakajima. 1997. High-performance Liquid Chromatography Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry Peptide Fingerprinting of Tarantula Venoms in the Genus *Brachypelma*: Chemotaxonomic and Biochemical Applications. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, VOL. 11, 1891-1899.

^{xl} Nascimento, D.G., Rates, B., Santos, D.M., Verano-Braga, T., Barbosa-Silva, A., Dutra, A.A.A., Biondi, I., Martin-Eauclaire, M.F., De Lima, M.E., Pimenta, A.M.C. 2006. Moving pieces in a taxonomic puzzle: Venom 2D-LC/MS and data clustering analyses to infer phylogenetic relationships in some scorpions from the Buthidae family (Scorpiones). *Toxicon* 47(6):628-369.

^{xli} Man, M. and Jensen, O. N. (2003). Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat. Biotech.* 21:255-261.

^{xlii} <http://mbcf.dfci.harvard.edu/docs/DeltaMass.html>

^{xliii} Venter, J.C., The sequence of the human genome (2001). *Science*, 291:1304-1351.

^{xliv} Zolnierowicz, S. and Bollen, M. (2000). Protein phosphorylation and protein phosphatases. *EMBO J.* 19:483-488.

^{xlv} Mann, M., Ong, S., Gronborg, M., Steen, H., Jensen, O. N., Pandey, A (2002). Analysis of protein phosphorylation

using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome.
TRENDS in Biotech. 20:261-268.

^{xlvi} Alan C. Rigby, Estelle Lucas-Meunier, Dario E. Kalume, Eva Czerwiec, Björn Hambe, Ingrid Dahlqvist, Philippe Fossier, Gérard Baux, Peter Roepstorff §, James D. Baleja, Barbara C. Furie, Bruce Furie, and Johan Stenflo, . 1999. A conotoxin from *Conus textile* with unusual posttranslational modifications reduces presynaptic Ca²⁺ influx. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 96, pp. 5758-5763.

^{xlvii} Gina D'Suze, Cesar V.F. Batista, Andrea Frau, Anna Rosa Murgia, Fernando Z. Zamudio, Carlos Sevcik, Lourival D. Possani, Gianfranco Prestipino, . 2004. Discrepin, a new peptide of the sub-family a ktx15, isolated from the scorpion *Tityus discrepans* irreversibly blocks K⁺-channels (I_A currents) of cerebellum granular cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 430 (2004)256-263.

^{xlviii} Miklós Bagdány, Cesar V. F. Batista, Norma A. Valdez-Cruz, Sándor Somodi, Ricardo C. Rodriguez de la Vega, Alexei F. Licea, Zoltán Varga, Rezső Gáspár, Lourival D. Possani, and György Panyi, . 2005. Anuroctoxin, a New Scorpion Toxin of the α -KTx 6 Subfamily, Is Highly Selective for Kv1.3 over IKCa1 Ion Channels of Human T Lymphocytes. *Mol Pharmacol* 67:1034-1044.

^{xlix} Michael P., Washburn., Dirk Wolters., and John R. Yates III. 2001. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *nature biotechnology*. Mar;19(3):242-7.

1.3.-JUSTIFICACIÓN

Debido al gran número de especies de alacranes y al gran vacío que existe en el conocimiento de las toxinas que estos producen (menos del 1%), se ha hecho necesario el estudio de los complejos proteicos presentes en el veneno de estos organismos.

Es necesario, por tanto, conocer no solo el blanco de cada una de las toxinas presentes en ellos, sino también las actividades biológicas que pueden tener las moléculas de origen peptídico que se encuentran en estos, tales como enzimas y péptidos antimicrobianos.

En este trabajo se ha elegido continuar con el estudio de la especie *Tityus stigmurus*, por ser una de las especies menos estudiadas de su género.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Estudiar la estructura primaria y modificaciones postraduccionales de las toxinas del alacrán brasileño *Tityus stigmurus* a través de la espectrometría de masas.

2.2. Específicos

- Comparar las secuencias obtenidas con las ya reportadas en alacranes del mismo género y así elaborar una relación entre los péptidos encontrados en estos organismos.
- Secuenciar el mayor número posible de péptidos presentes en el veneno del *Tityus stigmurus* y determinar su posible función.

- Determinar actividades enzimáticas presentes en el veneno.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Obtención del veneno.

El veneno del alacrán *T. stigmurus*, cuyos ejemplares se colectaron en el estado de Bahia en Brasil, fue donado por el Instituto Butantan, de Sao Paulo, Brasil. Todos los disolventes y reactivos utilizados fueron de grado analítico y el agua utilizada en todos los experimentos fue tetradestilada. En resumen, el veneno crudo se obtuvo a través de la estimulación eléctrica del telson de los alacranes. El veneno seco se recuperó con agua tetradestilada y se centrifugó a 18,000g por 10 minutos a 4° C. El sobrenadante se utilizó directamente para la separación cromatográfica y su análisis posterior [**¡Error! Marcador no definido.**].

3.2. Procedimiento de aislamiento.

La separación de la fracción soluble del veneno se hizo sometiendo alícuotas de 1 mg del veneno soluble en una columna analítica de fase reversa C₁₈ Vydac (Hisperia, CA, USA), con un gradiente lineal de 0 a 60% de acetonitrilo con TFA al 0.1%, por 60 min de tiempo. Las fracciones semipurificadas se recircularon en la columna analítica bajo diferentes gradientes, según las características físico-químicas y complejidad de cada una de las mezclas moleculares. Todas las fracciones se colectaron manualmente y se secaron usando un *Savant Speed-Vac drier* [**¡Error! Marcador no definido.**].

3.3. Determinación de la secuencia de aminoácidos.

La secuencia de aminoácidos se obtuvo por degradación automática de Edman en el micro-secuenciador *LF3000 Protein Sequencer* (Beckman) utilizando muestras de aproximadamente 1 nmol de cada toxina nativa (Edman, 1960). De forma similar se obtuvieron secuencias, principalmente de los C-terminales, utilizando la metodología CID (Collision Induced Dissociation) por espectrometría de masas.

3.4. Reducción.

Las muestras se redujeron con 50mM de ditioneitol (DTT) disueltas en solución amortiguadora que contiene 50 mM de bicarbonato de amonio (pH 7.8), la cual se purgó con corriente de N₂ por 3 minutos e incubó por 30 min a 55°C.

3.5. Alquilación

Las alquilaciones se realizaron utilizando dos tipos diferentes de alquilantes: la iodoacetamida (Sigma) para muestras sometidas a los análisis por espectrometría de masas y el ácido iodoacético (Sigma) para muestras sometidas a secuenciación por degradación automática de Edman.

Para las alquilaciones con iodoacetamida se utilizó una concentración de 50mM y la reacción se proceso en ausencia de luz por 30 minutos a temperatura ambiente. Las alquilaciones con ácido iodoacético se realizaron sobre membranas

hidrofílicas (Beckman, 8 mm *peptide support membrane*) *in situ* y posteriormente se aplicaron al secuenciador.

3.6. Digestión enzimática.

Las muestras que contienen 5-50 µg de proteína se digirieron con tripsina (Promega), quimotripsina (Boeringer-Roche), Lys-C (Boeringer-Roche), Asp-N (Boeringer-Roche) y Glu-C se disolvieron en disolución amortiguadoras indicada por el fabricante, así como la temperatura de incubación, tiempo y pH. Los péptidos obtenidos a través de la proteólisis enzimática se separaron por HPLC o por cromatografía líquida microcapilar acoplada al espectrómetro de masas ESI-IT.

3.7. Análisis por espectrometría de masas.

LC/ESI-IT/MS - Para los análisis realizados a través del sistema nano-LC/ESI-IT/MS (*Nano-Liquid Chromotography / Electrospray-Ion Trap / Mass Spectrometer*) los parámetros cromatográficos (gradientes, tipos de columnas, flujo, presión); fuente de ionización (disponibilidad del vacío, voltaje de la aguja, densidad y tensión superficial de los solventes, posición de la columna/aguja según los ejes direccionales z, y, y x); y electromagnéticos (voltaje de los octapolos de conducción iónica, electrodos de entrada y salida y electrodo en anillo) se determinaron para cada muestra o más específicamente para cada tipo de análisis o experimento realizado.

Básicamente, 5 µl de las muestras que contienen aproximadamente 500 pmoles (según la intensidad de área bajo pico HPLC-UV230 nm) con acetonitrilo al 50% y ácido acético

al 1% se inyectaron directamente al espectrómetro de masas. Para los análisis a través del sistema LC-MS "on line" se usó las columnas capilares *Pico-Frit de la New Objective* (Woburn, MA, USA). Todos los espectros de masas colectados se obtuvieron en modo positivo.

3.8. Programas computacionales para análisis de datos espectrométricos y banco de datos.

Los programas de computación utilizados para la adquisición, almacenamiento y procesamiento de los datos generados por medio de los espectrómetros de masas fueron *Xcalibur* para el ESI-IT/MS.

Todos los espectros tipo CID se analizaron manualmente y a través del programa computacional SEQUEST (Thermo-Finnigan, San Jose, CA, USA) contra bancos de datos públicos nr.fasta, swissprot, pir, TrEMBL entre otros disponibles en los sitios web del NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information), ExpASY Proteomics Server, Protein Prospector, Mascot, Profound, etc. De la misma forma, todos los espectros CID se analizaron con nuestro banco de datos de toxinas de alacrán construido con datos generados por el grupo de trabajo del Dr. Lourival Possani (secuencias inéditas) y con las secuencias de dominio público.

3.9. Ensayos Electrofisiológicos

Los ensayos electrofisiológicos se realizaron como se describe por Batista y col. [**¡Error! Marcador no definido.**]. En resumen, las células de insecto Sf9 se cultivaron en medio Grace a 27° C y se infectaron con un baculovirus

recombinante, que contiene el cDNA de los canales de K⁺ tipo *Shaker B* [1]. Los registros electrofisiológicos se realizaron de 48 a 72 horas después de la infección.

La corriente se filtró a 5 kHz y se probó cada 100 μ s con una interfase TL1 (instrumentos Axon, Inc). Los electrodos son de cristal de silicato de boro (KIMAX 51) con una resistencia de 1.5 mOhm, y el 80% de la resistencia se compensa electrónicamente. El potencial usado a lo largo de estos trabajos fue de -90 mV. Las soluciones usadas para los ensayos fueron: solución externa (en mM) 145 NaCl, 10 CaCl₂ y 10 HEPES-Na a pH 7.2; solución interna (en mM): 90 KF, 30 KCl, 10 EGTA, 10 HEPES-K a pH 7.2 (ensayos realizados por el Dr. Froilan Gómez Lagunas de la facultad de Medicina de UNAM).

3.10. Ensayos de actividad hialuronidásica

La actividad enzimática de hialorunidasa se determino siguiendo el procedimiento descrito por Tolksdorf en 1954 [2]. Se midió la capacidad del ácido hialurónico para formar turbidez en una solución de cetilpiridina. La turbidez se mide a una $\lambda = 588$ nm como una función de la concentración del ácido hialurónico. En presencia de actividad hialuronidásica la turbidez disminuye como resultado de la hidrólisis del ácido hialurónico.

4 RESULTADOS

4.1. Separación del veneno, purificación, caracterización química y funcional de los componentes del veneno del *T. stigmurus*.

El perfil cromatográfico de la separación por HPLC de la fracción soluble del veneno del alacrán *T. stigmurus* se muestra en la figura 1. Todas las fracciones obtenidas se colectaron manualmente para la determinación de las masas moleculares.

En este veneno, bajo el sistema analítico previamente descrito (secciones 3.2 y 3.7 de Materiales y Métodos), se identificaron 100 masas moleculares diferentes como se observa en la tabla 1.

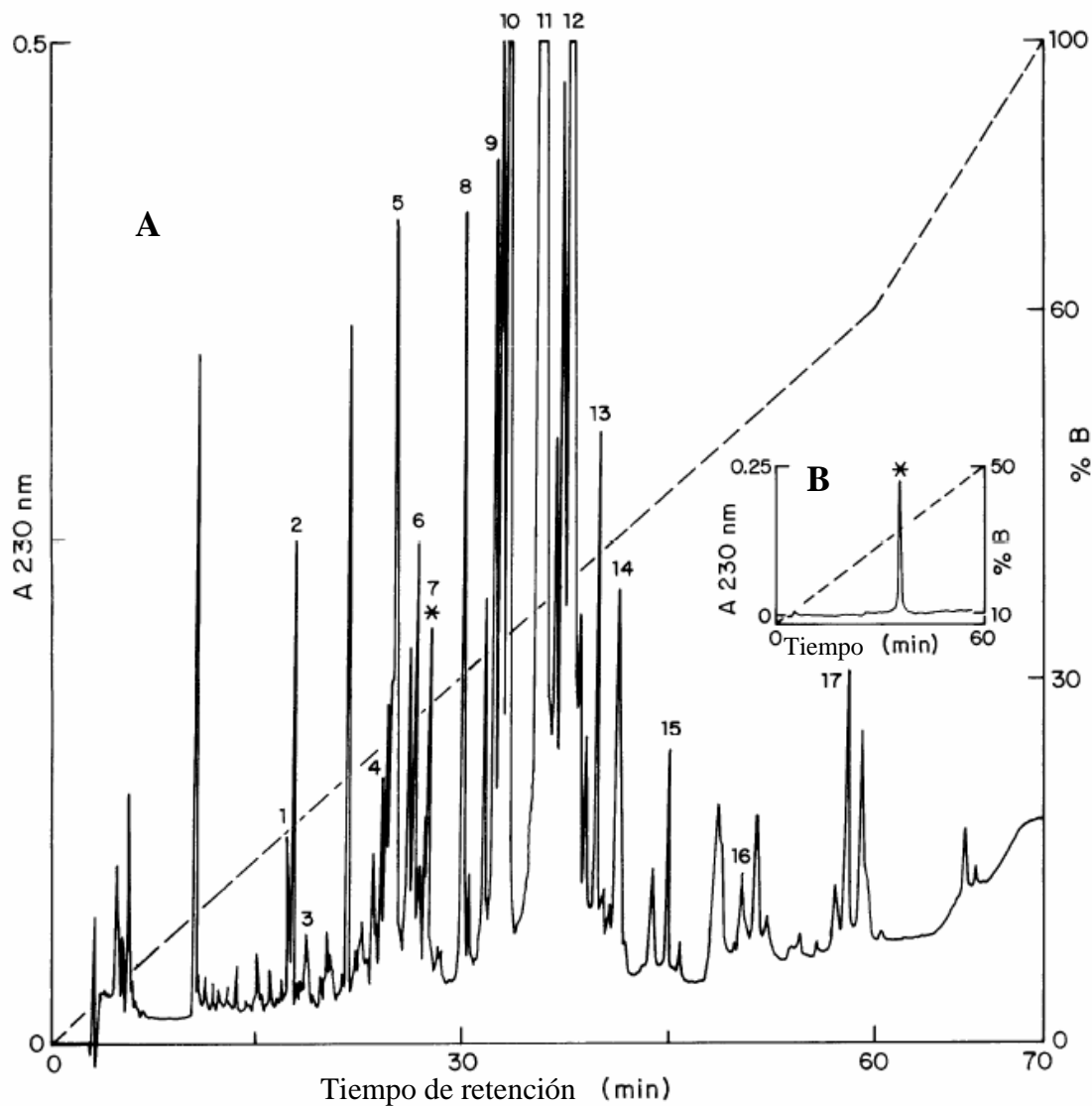


Fig. 1. Separación de los péptidos del veneno del alacrán brasileño *Tityus stigmurus* por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). (A) Una alícuota de 2mg de la fracción soluble del veneno del *Tityus stigmurus*, se inyectó en una columna analítica de fase reversa C_{18} , equilibrada con una solución de TFA al 0.1%. La purificación del veneno se hizo con un gradiente lineal de acetonitrilo con TFA al 0.1% (0-60% de acetonitrilo en 60 min) con un flujo de 1ml/min. La detección se hizo con luz ultravioleta a $\lambda=230$ nm y sensibilidad de 0.5 AUFS. La numeración del 1-17 señala a los péptidos que se han secuenciado total o parcialmente. (B) Purificación de uno de los péptidos obtenidos por HPLC con un gradiente de acetonitrilo de 10-50% en 60min.

En las figuras 1, 3 y 4, se puede observar: la separación por HPLC de los componentes obtenidos de la fracción soluble del veneno del alacrán brasileño *T. stigmurus*, las masas de estos, así como las secuencias de aminoácidos más relevantes obtenidas en este trabajo.

Los primeros péptidos de esta especie reportados en la literatura (Tst-1, Tst-2, y parcialmente Tst-3) [**¡Error! Marcador no definido.**], se identificaron igualmente en este trabajo. Este hecho nos condujo a realizar experimentos adicionales. Por ejemplo, la fracción correspondiente a la Tst-1 (también llamada Tst-gama de *T. stigmurus*) se digirió con Lisina-C y se analizó por LC-MS/MS en línea. Los valores $[M+H]^+$ obtenidos por la digestión de estos péptidos se sometieron al MS-Fit mediante el uso del programa Protein PROSPECTOR contra el banco de datos NCBI nr-2005.01.06. Los resultados ajustaron en un 100% con la toxina Tst-gama de *T. stigmurus* (figura 2). Todos los espectros obtenidos por CID (Collision-Induced Dissociation) se sometieron al SEQUEST para la identificación de proteínas.

En la figura 3 se observa el espectro CID del ion precursor con una relación masa/carga de 1281.6 Da, mientras que en la figura 2 se muestra el resultado de la búsqueda por SEQUEST de la toxina de alacrán en el banco de datos. El perfil de los experimentos de fragmentación por CID ajustaron en un 95.1% para la secuencia de aminoácidos al compararla con la fragmentación teórica generada por el SEQUEST a partir de la toxina Tst-1 de *T. stigmurus*, confirmando inequívocamente la identificación de esta toxina.

```

database=C:\Xcalibur\database\PDB-ScorpTox.fasta, accession=83.Tst1
peptide(s)=EGYLM DHEGCK LSCFIRPSGYCGRECTLKK LSCFIRPSGYCGRECTLK
KGSSGYCAWPACYCYGLPNWVK

>83.Tst-gama
GKEGYLM DHE GCKLSCFIRP SGYCGRECTL KKGSSGYCAW PACYCYGLPN WVKVWDRATN KC
>monoisotopic mass = 6969

position  sequence (NCBI BLAST link)
-----  -----
   3-13   EGYLM DHEGCK
  14-32   LSCFIRPSGYCGRECTLKK
  14-31   LSCFIRPSGYCGRECTLK
  32-53   KGSSGYCAWPACYCYGLPNWVK
Protein Coverage: 51/62 = 82.3% by amino acid count, 5710/6969 = 81.9% by
mass

```

Fig. 2. Resultado de la búsqueda a través del programa SEQUEST[®] de los datos obtenidos por la digestión enzimática con Lys-C de la toxina Tst-gama en el banco de datos privado de toxinas de alacrán, PDB-ScorpTox.fasta. La secuencia en negritas fue identificada inequívocadamente a través de los datos de espectrometría de masas.

El análisis molecular de las masas encontradas, secuencias de aminoácidos parciales y la determinación por espectrometría de masas, permitió la fácil identificación de otros péptidos ya conocidos, uno de ellos, la llamada Butantoxina y la Tst-2 de *T. stigmurus*. Se aislaron y secuenciaron Quince nuevos componentes, cuatro de ellos por completo: Tst-17, PAPE, Tst-3 y la TstβKTx (Fig. 4).

4.2. Determinación de masas moleculares de los componentes, nuevas secuencias y actividad enzimática.

Por motivo de comparación, en la tabla 1 se incluyen las "huellas digitales" de las masas moleculares de los componentes presentes en los venenos de otras tres especies de alacranes pertenecientes al género *Tityus* (*T. cambridgei* [3], *T. costatus* [4] y *T. pachyurus* [xviii]); los cuales se discutirán con más detalles en este trabajo. Los resultados de las tres últimas especies se obtuvieron en idénticas

condiciones, utilizando el mismo equipo y parámetros como se menciona en las referencias bibliográficas.

La mayoría de los componentes más abundantes del veneno se caracterizaron como se indica en la figura 1. La determinación de las masas moleculares fue esencial para la identificación de los componentes ya conocidos del veneno. De esta forma, se identificaron tres de las toxinas conocidas de este veneno: Butantoxin [**¡Error! Marcador no definido.**,5], Tst-1 y Tst-2 [**¡Error! Marcador no definido.**].

Tabla 1. Análisis de las "huellas digitales" de los venenos de cuatro especies de *Tityus*. Esta tabla muestra un análisis comparativo de los componentes de los venenos de los alacranes *T. stigmurus*, *T. cambridgei*, *T. pachyurus* y *T. costatus*.

<i>T. stigmurus</i>		<i>T. cambridgei</i>		<i>T. costatus</i>		<i>T. pachyurus</i>	
RT (min)	MW	RT (min)	MW	RT (min)	MW	RT (min)	MW
2.97	Biopolímero desconocido	3.23	414.7; 437.2; 453.1; 860.6	18.86	966.8; 2413.12	2.97	-
2.97-2	Biopolímero desconocido	3.53	331.2; 383.2; 404.2; 413.3; 461.3; 502.3;	19.77	3483.3	3.42	-
4.56	Biopolímero desconocido	4.20	244.0; 307.0; 331.2; 364.1	20.22	428.3; 413.3	4.00	388.4; 1018.5; 1754.9
5.02	216.5; 246.1	5.11	268.1; 316.2; 559.0	20.72	3467.5	4.15	460.3; 403.4; 303.3; 486.1; 540.3
5.48	486.0	5.90	251.7; 268.1; 367.1; 374.2; 502.4	21.14	628.6	14.32	330.2; 415.4; 613.5
5.80	431.3	8.75	402.4; 526.3; 742.3	21.95	948.7; 4241.5	14.92	438.2
6.72	414.1	15.09	439.2; 482.3; 588.4; 753.4	22.40	844.8; 613.5	15.57	Muchos pesos moleculares
10.54	382.2; 536.0	19.74	332.1; 487.4	23.07	399.3; 457.5; 828.5; 880.4	17.41	338.2; 419.2
10.80	545.2; 632.3; 648.3	20.37	1053.6; 2446.5*; 2791.2	23.84	431.3; 499.3; 672.5; 866.1	18.68	2447.0*
11.34	510.3	21.20	359.2; 2665.4	25.45	1284.9; 3777.3	19.28	2663.0; 2505.0
11.84	584.1; 690.3; 857.2; 982.2	23.39	962.5; 1327.5; 2456.4	25.72	676.5; 1095.9	19.57	1487.6; 664.4; 551; 837.5
12.29	411.3; 822.2	24.03	403.2; 429.2; 711.3; 879.6	26.21	1341.4; 1363.0; 3136.6	20.05	428.2
12.92	335.0; 559.4	25.17	2469.1; 2625.1	26.64	724.5; 809.1; 2716.0; 4176.6	20.30	2457.0
13.72	317.2; 363.2; 1185.0	25.74	4103.1; 4288.0; 4303.2	27.70	3986.0*; 4520.0	20.61	1064.4; 855.5; 751.3; 532.3
14.34	596.3	26.45	661.4; 801.6; 1224.8; 4272.0	28.04	1186.0	21.02	2515.6; 685.4
14.99	938.3; 1234.4	27.33	366.1; 607.4; 1310.8	28.53	803.5; 845.1	21.72	365.1; 526.2; 660.4
15.24	715.4; 1231.4; 2118.4	28.08	416.1; 705.4; 4168.1	29.26	3949.5	22.30	2736.6; 1837.8
15.24-2	265.3; 289.1; 344.2; 530.4	28.73	3946.0	29.59	1109.7; 4220.0; 4541.0	23.01	914.5; 642.4; 457.3; 399.1
16.21	401.3; 738.4; 802.4; 954.4	29.21	1277.5; 1734.6; 4150.0	30.06	4785.0; 5224.0	23.54	3978.4; 1733.6; 1533.6
16.74	473.3	31.70	2340.4; 3338.2; 3871.9	30.58	4564.0*	23.71	4107.0
17.53 (1)	2412.0*	33.31	471.2; 677.5; 3809.4; 3823.8; 4304.4	31.27	794.6; 4575.0; 4619.0	24.06	4107.0; 4015.0
17.85 (2)	2908.0	33.86	446.3; 912.6; 950.6; 3521.5*; 3807.6	31.86	2983.4; 5720.9	25.04	4863.0; 4519.0; 4222.0
18.26	716.2; 922.3; 1067.5; 1513.2	35.09	477.1; 2360.0; 2389.8; 2419.8; 3674.7; 3849.9	32.17	5281; 5720.9	25.40	3871.0; 3579.0
18.51	966.0	35.52	951.5; 4002.9	32.80	968.9; 3295.5	25.96	4451.0; 4519.0
18.98 (3)	1196.0	35.98	578.3; 750.4; 913.5	33.20	733.4	26.12	4518.3; 3670.8
19.04	1122.3	38.10	2744.2	33.88	5278.5	26.40	4518.0; 4243.2

19.44	1124.6	38.97	791.5; 2864.4;	34.08	10732.0	26.96	4237.0; 4518.0
20.03	1290.4	39.50	3870.6*; 3890.4 403.2; 629.3; 7780.8;	34.54	907.6; 1656.0	27.29	3790.0
20.47	2992.2	39.93	922.4; 870.5; 7796.0	35.00	6077.0	27.83	661.5; 912.5; 1300.2
21.51	572.3; 853.4;	42.82	1026.6	35.52	7529.0	29.62	2701.0; 858.6 fragmento (espectro CID)
21.87	1489.5	43.49	756.5; 2042.0; 2155.2;	36.14	1016.7; 6549.0;	30.66	2682.4; 675.3; 561.2; 1080.2
22.60	2163.0	43.81	2382.2; 2756.8; 5512.2 1048.0; 2778.8	36.62	6954.0; 7265.0	31.84	1349.4; 1173.6; 1045.5; 899.8; 587.1
22.60-2	828.2; 880.1;	44.74	6033.0	36.62-2	1067.6; 1692.4	32.82	3356.0
23.08	429.2; 880.1	45.66	2424.4; 2738.4; 7100.0	38.32-1	10942.0	33.16-2	2684.4; 1751.8; 1086.6; 1025.7
23.44 (4)	2628.4; 2699.5;	46.33	7318.3*.0	38.32-2	6566.0*	33.82	7079.0
23.98	2770.6	47.16					
24.12	3068.4	47.86	7384.2*	38.32-3	6622.5	34.18	7080.0; 1053.6
	2489.0		7404.0*;	39.20	1073.5; 10996.0	34.42	6047.0; 6105.0
			7472.0				
24.54	1070.6; 3243.0	48.81	7075.5; 6624.0	39.68	6975.0	35.16	2743; 2685; 2058; 2043
24.85	1084.3; 4527.8	49.73	608.2; 832.5; 1796.6	39.68-2	11218.0	36.21	7066.0
25.18 (5)	7629.0	52.48	7269.0; 7132.0	40.76-1	3688.8	36.21-2	7522.0*; 7504.0
25.38	3931.0	52.91	890.5; 7253.2	40.76-2	10824.0	36.21-3	7522.0; 7313.0
26.49	3940.0	54.00	731.4; 1074.4; 3900.9	40.76-3	2643.3	37.0 -1	7289.0; 6998.0
26.94 (6)	4913.1	54.70	1007.1; 1137.3;	41.46-1	7345.0	37.0 -2	7270.0
			1514.0; 2008.2				
27.33	1503.6; 1729.8	56.00	16100.0	41.46-2	7678.0*	37.0 -3	7518.0; 7270.0
27.76	3648.9	57.28	6291.0; 6321.5	42.14	1705.9; 6730.0	37.86	7261.0
27.97 (7)	4555.0	59.04	7105.0	42.14-2	1149.5	38.16	10982.0; 10950.0
28.76	852.4; 1650.0;	60.54	7170.4; 7197.0;	42.78	1573.0	38.40	10595; 10499.0
	3731.1		7634.0; 7653.0				
30.48 (8)	4506.6*	63.28	6937; 6974.0	44.78	1828.2	39.75	10611.0
31.05	4561.2	73.22	25321.1	45.63	45482.0	40.01	Muchos pesos moleculares
32.08	5552.0						
32.72 (9)	5536.0	83.12	25402.0	46.67	14121.0	41.00	Muchos pesos moleculares
33.66 (10)	7407.0*			47.42	No determinado	44.24	13519.0; 12175.0
36.24 (11)	6989.2*			48.80	44952.0	47.51	44724.0
37.17	1509.7; 7001.0			49.60	No determinado	48.22	Muchos pesos moleculares
37.62	2711.0			50.59	No determinado	50.25	29480.0; 27176.0
38.30 (12)	6983.0*			50.59-2	No determinado	51.85	Muchos pesos moleculares
38.97	1815.8; 3585.8			52.32	No determinado	56.75	25430.0; 25188.0
39.52	11051.0			53.12	No determinado	59.10	Muchos pesos moleculares
40.30 (13)	9797.0			54.88	1732.8		
41.84 (14)	6716.0*			56.48	1759.8		
45.68 (15)	14226.0			58.06	No determinado		
51.10 (16)	44800.0			63.00	No determinado		
57.90	25824.0						
58.64 (17)	25367.0						
67.34	25579.0						
68.11	26362.0; 26529.0						

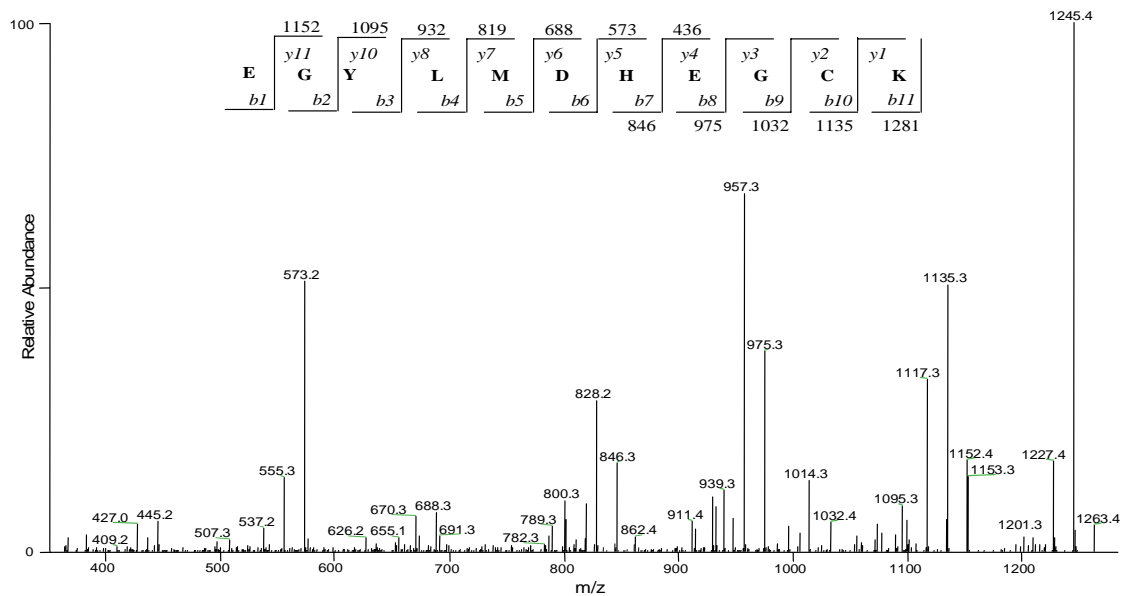


Figura 3. Espectro CID de uno de los péptidos obtenido por digestión con Lys-C de la Tst-1. Se muestra la secuencia que corresponde del E3 a la K13.

Como ya se ha mencionado anteriormente, las toxinas Tst-1 y Tst-2 son también conocidas por sus nombres originales Tst-gamma y Tst III-8, respectivamente [6]. Estos componentes están marcados en la Fig. 1 como 10 y 11, respectivamente. La identificación inequívoca de los componentes conocidos se determinó a través de la metodología LC-MS/MS.

En la figura 3 se observa un espectro tipo CID de uno de los péptidos con masa molecular de 1281.0 Da, que corresponde al segmento N-terminal de la toxina Tst-1, donde se puede ver prácticamente todos las series iónicas correspondientes a las fragmentaciones de las series "b" y "y" que representan los picos más abundantes del espectro.

Los alineamientos a nivel de secuencia de aminoácidos de esta proteína llegaron a un 95% según datos obtenidos a

través del programa SEQUEST utilizando el banco de datos SwissProt.

Para corroborar los resultados obtenidos en la caracterización por CID, estos datos también se identificaron a partir de la secuenciación de los N-terminales por degradación automática de Edman.

Los componentes marcados 1, 7, 10 y 13 en la Fig. 1 se secuenciaron totalmente y son reportados por primera vez en este trabajo (Fig. 4). Estos péptidos se nombraron por sus nombres triviales: Tst-17, PAPE, Tst-3 y Tst β KTx, respectivamente.

La presencia de actividad de hialuronidasa en el veneno de *T. stigmurus* se verificó por el método descrito en Materiales y Métodos (sección 3.10), confirmando los resultados previos obtenidos con el veneno de *T. serrulatus* [7]. En este trabajo se describe el aislamiento (figura 1, fracción 17), la masa molecular (44.800 kDa) y la secuencia de 24 aminoácidos del segmento N-terminal de esta enzima (tablas 1 y 2).

Tst-17 (RT: 17.53 min; MW: 2412.0 a.m.u.)

GCRQC¹⁰GGGCNKHGK²⁰CINGKCKCY

PAPE (RT: 27.79 min; MW: 4554.2 a.m.u.)

KQLLKEALAPEFAPKPAPEPAPEPAPEPAPEAAPEPAAAAPEAAPE

-----> Glu-C
-----> Glu-C

Tst-3 (RT: 33.66 min; MW: 7407.0.0 a.m.u.)

KKDGY¹⁰PVEYDNCAYICWNY²⁰DNAYCDKLC³⁰DKKADSGYCY⁴⁰WAHITCYCY⁵⁰GLPDSEPTKTNGK⁶⁰CKS

-----> Lys-C
-----> Chymotrypsin

TstTX-K beta (RT: 41.84 min; MW: 6716.8 a.m.u.)

KLVALIPND¹⁰QLRSILKAVVHKVAKT²⁰QFGCPAYEGY³⁰CNDHCNDIERK⁴⁰DGEGCHGFKCKCA⁵⁰KD⁶⁰

-----> Glu-C
-----> Glu-C

Figura 4. Secuencia completa de aminoácidos de 4 péptidos. La línea continua señala la secuenciación por degradación automática de Edman y en la línea punteada las secuencias hechas por CID. MW=Peso Molecular a.m.u.= unidades de masa atómica.

Tabla 2. Secuencia completa y N-terminales de péptidos purificados del veneno de *T. stigmurus*. Los N-terminales y las secuencias completas de 17 péptidos y/o proteínas de *T. stigmurus* se encuentran enlistados de acuerdo a sus tiempos de retención en el HPLC. Las secuencias nuevas se indican entre paréntesis y las que fueron tomadas de la literatura como ref.a [Holaday et al., 2000] y ref.b [Becerril et al., 1996]. Diez secuencias cuentan solamente con su N-terminal.

TR (min)	PM (Da)	Secuencia
17.53	2412.0	GCRQCGGCKNHGKINGKCKCY (Nueva)
17.85	2908.0	KRKCGLCKYRCCSGG...
18.98	1196.0	KIKETNA...
23.44	2699.5	KPAPEPAPEPAPEAAPEA...
25.18	7629.0	TKCPTCQNDTCSNKI...
26.94	4913.1	GKFGKCKPSIXATCQ...
27.97	4554.2	KQLLKEALAPEPAPKPAPEPAPEPAPEPAPEAAPEAAAAPEAAPE (Nueva)
30.48	4506.6	WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGRAHGKCMNNKRCYCT [Ref.a]
32.72	5536.0	KDKMKAGWERLTSQS...
33.66	7407.0	KKDGYPVEYDNCAYICWNYDNAYCDKCKDKKADSGYCYWAHITCYCYGLPDSEPTKTNGKCKS (Nueva)
36.24	6989.2	KEGYAMDHEGCKFSCFIRPAGFCGDYCKTHLKASSGYCAWPACYCYGVPDHIKVVWDYATNKC [Ref.b]
38.30	6983.0	GKEGYLMDHEGCKLSCFIRPSGYCGRECTLKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWDRAATNKC [Ref.b]
40.30	9797.0	AENRERVVQGEENTKELTGIEFENGFIQSCMQN
41.84	6716.8	KLVALIPNDQLRSILKAVVHKVAKTQFGCPAYEGYCNHDCNDIERKDGEGHGFCKCKCAKD (Nueva)
45.68	14226.0	SIYERCELARELINR...
51.10	44800.0	EHPALYRRYSKEHTFCKTKNQXCN...
58.64	25367.0	SPXIIIDYLCVTETX...

4.3. Caracterización química y fisiológica del componente Tst-17.

El componente con tiempo de retención de 17.53 min (Fig. 1, fracción 1) y con peso molecular de 2412.0 Da (tabla 1) se seleccionó para la caracterización estructural debido a la similitud con las toxinas bloqueadoras de canales de potasio Tc-1 aislada del *T. cambridgei* [¡Error! Marcador no definido.] y Tpa-1 del alacrán *T. pachyurus* [xviii].

El péptido seleccionado se purificó a través de HPLC analítico usando un gradiente de 10 a 40% de solvente B (acetonitrilo con TFA al 0.1%) en 60 min y se secuenció completamente por degradación automática de Edman. Para la determinación de esta secuencia, se alquiló una alícuota del péptido puro "in situ" y se secuenció directamente, produciendo una secuencia inequívoca (Figura 4).

La secuencia del C-terminal de este péptido del residuo G13 al Y23 es prácticamente igual a la de la toxina Tc1 (tabla 3).

Tabla 3. Comparación de las estructuras primarias de las toxinas Tst17 y Tc1 reportada por Batista y col. 2000.

Nombre	Secuencias
Tc1	ACGSCRKKCKGSGKCIINGRCKCY
Tst-17	GCRQCGGGCNKHGKCIINGKCKCY

El efecto fisiológico de la toxina Tst-17 se detectó a partir de ensayos electrofisiológicos utilizando células Sf9 cultivadas en medio *Grace* (ver sección 3.9 de materiales y métodos) en las cuales se expresaron canales de potasio *Shaker B*. Se han registrado corrientes microscópicas con la configuración completa de la célula a través de la técnica de *patch-clamp* [8], con un instrumento Axon (Axon Instruments, USA).

En la Fig 5-a se puede observar las series de control de corrientes de potasio microscópicas a través de estos canales. La adición de 3 μ M de Tst-17 en la solución externa disminuyó las corrientes (Fig. 5-b) de manera reversible (ver lavado en la fig. 5-c).

La búsqueda de similitud en estructura primaria de la toxina Tst-17 en los bancos de datos depositados en el NCBI-Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov) reveló un alto porcentaje de similitud con toxinas bloqueadoras de canales de potasio.

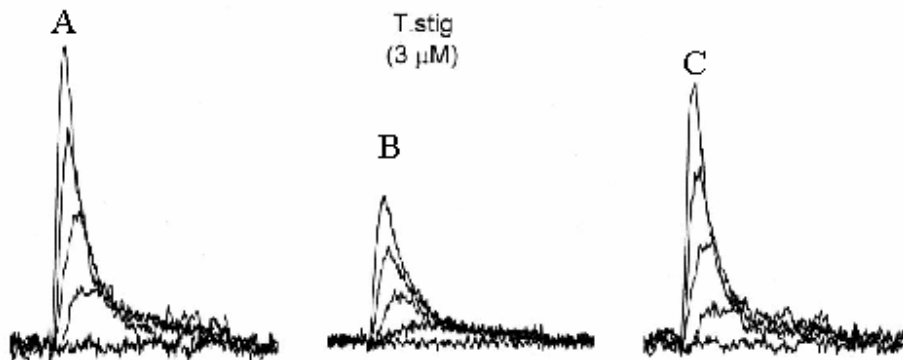


Figura 5. Gráfica de las pruebas electrofisiológicas con la toxina Tst-17, donde (A) muestra los rastros de control de corrientes microscópicas de K^+ a través de los canales de K^+ *shaker* B. El canal se activó mediante pulsos de 30 ms que iban de -30 a +50 mV con incrementos de 10 mV cada 20 segundos a partir de los 90mV del potencial. (B) corriente de K^+ después de la adición de la toxina Tst-17 y (C) corriente recuperada después del lavado de la célula con la solución control (datos obtenidos en colaboración con el Dr. Froilan Gómez Lagunas de la facultad de Medicina de la UNAM).

4.4. Análisis comparativo de las "huellas digitales" de masas moleculares del veneno de diferentes especies de alacranes del género *Tityus*.

Con los datos comparativos descritos en el presente trabajo, en este momento, nuestro grupo de investigación ha contribuido al análisis proteómico de los venenos de 4 diferentes especies del genero *Tityus* (*T. stigmurus* [este trabajo]; *T. cambridgei* [3], *T. costatus* [4] y *T. pachyurus* [xviii]). Por esta razón y con el fin de comparar, en la tabla 1 se muestra el tiempo de retención (TR) y sus masas correspondientes en una lista.

Los venenos de estas especies contienen moléculas de diferentes masas moleculares, se tienen datos fisiológicos de la función de algunas de estas moléculas. Con esto, se pueden comparar las masas moleculares encontradas con las reportadas y esperar una función farmacológica de estos péptidos. En

este análisis, los datos obtenidos del *T. serrulatus* por Pimenta en el 2003 [9]; Nacimiento en el 2006 [**¡Error! Marcador no definido.**] y de *T. discrepans* y *T. zulianus* por Borges en el 2006 [10]) no se emplearon en la comparación que se realizó, ya que las condiciones de experimentación no fueron las mismas. Sin embargo, sus datos coinciden con los reportados en este trabajo.

En la tabla 3 se resumen de manera comparativa los datos obtenidos. Existen diferentes tipos de péptidos con masas moleculares semejantes que corresponden muy bien con funciones similares. Estas han sido bien caracterizadas, tales como los péptidos que afectan canales iónicos (K^+ y Na^+) y otros para los cuales sus funciones siguen sin definirse.

Por lo regular, las moléculas cuya masa molecular se encuentra entre los 3500.0 Da y los 4500.0 Da son bloqueadoras de canales de K^+ (52 de estas se encuentran enlistadas en la tabla 1). Las que se encuentran dentro del rango de 6000.0 Da a 7500.0 Da se sabe que afectan el mecanismo de cierre y apertura de los canales de Na^+ (42 componentes de la tabla 1 entran en esta categoría). El tiempo de retención en la columna del HPLC es de 23 a 31 minutos, para las toxinas específicas de canales de K^+ , y para las toxinas que afectan específicamente canales de Na^+ es de 33 a 40 minutos. Esto no es una regla definida; solamente es un buen supuesto para una función en específico, ya que se han encontrado muchas excepciones.

Con respecto al gran rango de masas presentes en las 4 "huellas digitales" que muestra la tabla 1 y excluyendo a los dos grupos de toxinas que afectan a canales de K^+ y Na^+ , existen 36 componentes, los cuales se pueden dividir en 6 ó 7 grupos diferentes.

El primer grupo se compone de péptidos cortos pertenecientes a la subfamilia α -KTx 13 [**Error! Marcador no definido.**, xvii, xviii], del cual se han aislado tres componentes del veneno de alacranes pertenecientes al genero *Tityus*; Tc1 (2446.5 Da), Tpa1 (2447.0 Da) Tst-17 (2412.0 Da), esta última se reporta en este trabajo.

El segundo grupo de componentes muestra un rango de pesos moleculares de 5278.5 Da a 5720.9 Da y de tiempos de retención en el HPLC de 31.86 minutos a 43.29 minutos. Este grupo presenta masas moleculares intermedias a los grupos ya reportados como péptidos que afectan a canales de K^+ y Na^+ .

La tercera columna de la tabla 3 resume los componentes con tiempos de retención de alrededor de 40 min y masas moleculares de 10000 a 11000 Da. Aún no se ha descrito ninguna función para estos péptidos. Sin embargo, estos están ampliamente distribuidos en los venenos del genero *Tityus*.

El cuarto grupo comprende péptidos con masas moleculares que varían de 13519.0 Da a 16100.0 Da, con un tiempo de retención de alrededor de 45 min. El único ejemplo de estos péptidos es el obtenido a partir del componente Tst-45.68 min con masa de 14226.0 Da. El N-terminal de este componente se determinó por degradación automática de Edman (tabla 2). Su secuencia mostró similitud con lisozimas descritas anteriormente, las cuales se obtuvieron a partir de fuentes distintas de venenos. Por lo tanto, este puede ser descrito como un grupo nuevo de enzimas presentes en el veneno de las especies de *Tityus*.

Otras moléculas, las cuales cuentan con un peso molecular de alrededor de 25 KDa forman parte del siguiente grupo (quinto grupo). Estas tienen un tiempo de retención mayor en el HPLC y su función es completamente desconocida.

El último grupo (sexto) enlista a los componentes con los pesos moleculares más altos. El componente con 44800.0 Da (TR 51.10 min) se secuenció como se muestra en la tabla 2. Sin embargo, en su porción N-terminal, no se encuentran similitudes importantes para esta proteína en los bancos de datos públicos, esta proteína se probó en un ensayo enzimático, y como ya se mencionó se le encontró actividad de hialuronidasa. Se sabe que el veneno de los alacranes presenta actividad de hialuronidasa (7,11); sin embargo, este es el primer N-terminal reportado con esta actividad en las especies de *Tityus*.

Finalmente el péptido PAPE no se incluyó en esta relación, pero puede ser el primer ejemplo del séptimo grupo de los ya presentes en el veneno de los alacranes. Esta afirmación requiere ser confirmada.

Tabla 4. Comparación de Familias de péptidos entre masas moleculares con posibles funciones biológicas. Las especies de los alacranes están indicadas con las abreviaturas Tst (*T. stigmurus*), Tca (*T. cambridgei*), Tpa (*T. pachyurus*) y Tco (*T. costatus*). Las masas moleculares y tiempos de retención para cada péptido se indican entre paréntesis: tipo Tc1, toxinas tipo β KTx, lisozimas, hialuronidasas y dos familias con funciones desconocidas. En esta tabla no se encuentran indicadas las toxinas específicas para canales de K⁺ y Na⁺.

Especies de alacrán	Familia Tc-1	Toxinas tipo β KTx	Función desconocida	Lisozimas	Función desconocida	Hialuronidasas
Tst	2412.0 (17.53)	5536.0 (32.72) 5552.0 (32.08)	11051.0 (39.52); 9797.0 (40.30)	14226.0 (45.68);	25824.0 (57.90); 25367.0 (58.64); 25579.0 (67.34); 26362.0 - 26529.0 (68.11)	44800.0 (51.10)
Tca	2446.5 (20.37)	5512.2 (43.49)	-	16100.0 (56.00)	25321.0 (73.22); 25402 (83.12);	-
Tco	2413.1 (18.80)	5720.9 (31.86); 5281.0 (32.17); 5278.5 (33.88)	11218.0 (39.68); 10824 (40.76); 10996.0 (39.40); 10942.0 (38.22)	14121.0 (46.67)	-	45482.0 (45.63); 44952.0 (48.80)
Tpa	2447.0 (18.68)	-	10982.0 (38.16); 10595.0- 10499.0 (38.40); 10611.0 (39.75)	13519.0 (44.24)	29480.0-27176.0 (50.25); 25430.0 - 26188.0 (56.75)	44724.0 (47.51)

4.5. Caracterización química del PAPE, un péptido rico en prolinas.

El componente con tiempo de retención de 27.97 min se aisló de forma homogénea después de ser sometido a una recirculación por el HPLC, como se observa en el inserto de la figura 1. Este es un ejemplo de las muchas purificaciones adicionales realizadas con los componentes caracterizados después de la primera corrida cromatográfica (Fig. 1-B). La masa molecular de este componente es de 4555.0 Da. y cuando se sometió a secuenciación por degradación de Edman se pudo observar un número inusual de residuos de prolina y ninguna cisteína.

Este resultado es poco común en péptidos aislados de venenos de alacrán, ya que estos son ricos en residuos de cisteínas [11,xii]. Como se puede ver en la Fig. 3, los primeros 33 residuos de aminoácidos se identificaron por secuenciación directa y los residuos del segmento C-terminal (A33 - E42) se determinaron por ESI-MS/MS, después de ser sometidos a una digestión enzimática con la endopeptidasa Glu-C, seguida de separación por HPLC (datos no presentados).

Se secuenciaron tres péptidos a partir del péptido original por ESI-MS/MS, uno correspondiente al segmento N-terminal y otros dos que contienen los residuos del 32 al 42 y del 43 al 46, respectivamente, como está indicado en la Fig. 3. El péptido constituido de los residuos 32 al 42 presenta dos aminoácidos al principio ($A_{32}A_{33}$), los cuales ajustan perfectamente a los dos últimos aminoácidos de la secuencia directa obtenida por degradación de Edman. Mientras que el tetrapéptido C-terminal (43-46) corresponde

al fin de la secuencia, sin tener otra posibilidad de ajuste dentro de la secuencia que se ha determinado.

Esta secuencia de aminoácidos se justifica por el tipo de corte que produce la enzima utilizada, esto es, C-terminales de E que no vayan seguidos de P. El otro segmento de secuencia similar (A₃₂APE₃₅) presente en este péptido no se corta por esta enzima, ya que el E₃₅ es seguido por P₃₆. Finalmente, la secuencia obtenida es confiable ya que las masas, teórica y experimental son iguales (4555.0 Da).

La secuencia tetrapeptídica (PAPE) se repite consecutivamente cuatro veces de la posición 16 a la 31 (ocho prolinas). Por esa razón el péptido fue llamado trivialmente péptido "PAPE". La presencia de los tres segmentos: PEPAP, AAPE y PEPAAAPE, adicionan siete residuos de prolina a la molécula, dando un total de 15 residuos de prolina en una molécula de 46 aminoácidos.

La comparación de secuencias contra los bancos de datos públicos no revelaron similitud significativa con ningún péptido. Por lo tanto, este péptido es muy interesante desde el punto de vista toxicológico, por ser único con relación a su estructura molecular, y su función es totalmente desconocida.

4.6. Caracterización química del componente TstβKTx.

El componente con tiempo de retención de 41.84 min y masa molecular de 6716.0 Da (Tabla. 1) se purificó a través de una separación adicional por HPLC analítico en las mismas condiciones descritas en la Fig. 1, utilizando un

gradiente de 10-45% de solución B en 60 min (datos no presentados).

Este péptido se seleccionó para la caracterización estructural, ya que presentó la misma masa molecular de la toxina TsTX-K beta, previamente aislada del alacrán brasileño *T. serrulatus* por Rogowski y col [xiii].

Su secuencia completa se obtuvo por MS/MS a partir de los péptidos generados por la endopeptidasa Glu-C. Adicionalmente, el segmento N-terminal (38 residuos de aminoácidos) se secuenció por degradación automática de Edman. Estos datos estructurales permitieron afirmar que este péptido es el mismo caracterizado previamente en *T. serrulatus*.

El hecho de encontrarse toxinas iguales en diferentes especies de alacrán no es novedoso, ya que la Butantoxina, una toxina bloqueadora de canales de potasio, a sido encontrada en diferentes especies del género *Tityus*: *T. serrulatus*, *T. bahiensis*, *T. stigmurus* y *T. trivittatus* [xiv, ¡Error! Marcador no definido., 5,xv].

4.7. Estructura primaria de la toxina Tst-3.

La toxina Tst-3 fue descrita inicialmente por Becerril y col [13]. Los autores reportaron la secuencia de los primeros 30 residuos de aminoácidos de la región N-terminal del péptido.

Nuestro péptido con tiempo de retención 33.66 min (Fig.1, de este trabajo) posee una masa molecular de 7407.0 Da (Tabla. 1). Al someterse a la secuenciación directa, se observó que los primeros 35 aminoácidos son idénticos a los reportados para la toxina Tst-3, así como para la Ts-3 de *T. serrulatus* [xvi, ¡Error! Marcador no definido.].

Para completar la secuencia, se tomaron alícuotas de este péptido y se sometieron a digestión independiente con dos peptidasas distintas: Lys-C y Quimiotripsina. Los diferentes péptidos producidos por los cortes enzimáticos y separados por HPLC (datos no presentados) se analizaron por LC-MS/MS y por degradación de Edman. El solapamiento de los segmentos peptídicos secuenciados permitió dilucidar la secuencia completa (Fig.3). La masa molecular teórica (7407.3 Da) obtenida de su secuencia, coincide perfectamente con la masa experimental determinada (Tabla. 1).

4.8. Secuencias adicionales de N-terminales de otros componentes del veneno de *T. stigmurus*.

Prácticamente, todos los segmentos N-terminales de los componentes mayoritarios del veneno de *T. stigmurus* se caracterizaron total o parcialmente (Fig.1 y Tabla. 2). Por motivos de comparación estructural, las 17 secuencias obtenidas se incluyeron en la Tabla 2. De ellas, se obtuvieron solamente las secuencias de los segmentos N-terminales de una decena y las 7 restantes se secuenciaron completamente. Debido a que, estas últimas presentaron similitud en su secuencia lineal con péptidos ya reportados, o bien su secuencia era novedosa, como fue el caso del péptido "PAPE".

5. DISCUSIÓN.

5. DISCUSIÓN.

Desde las primeras publicaciones de "huellas digitales" en la década de los noventas, han surgido nuevas técnicas para el análisis proteómico. Tal es el caso del HPLC-RP acoplado al ESI-MS, ya que esta técnica permite la rápida separación e identificación de las moléculas, sin que sean modificadas químicamente.

La elaboración de la "huella digital" (tabla 1) del veneno del alacran *T. stigmurus*, nos dio un amplio panorama de la riqueza peptídica que estos organismos poseen en sus venenos. El HPLC-RP acoplado al ESI también nos permitió la rápida identificación de toxinas, mediante el uso de CID, a través de la cual pudimos descifrar la estructura primaria de las toxinas y realizar la búsqueda en los bancos de datos públicos como se muestra en la figura 2. En este caso la Tst-gamma, reportada previamente por Becerril y col. cuya secuencia se obtuvo a partir de la secuenciación automática de Edman, presentó un 100% de identidad con nuestros resultados obtenidos por CID (figura 3).

En la tabla 1, se presentan las "huellas digitales" de los componentes de los venenos de cuatro especies del genero *Tityus*. Es decir, los tiempos de retención de cada fracción obtenidos en el HPLC con sus masas correspondientes. Como nos muestra esta tabla, las masas de los primeros tiempos de retención (de 1 a 16 min) en cada una de las "huellas digitales" son muy pequeñas (entre 200 y 1000 Da). En los tiempos subsecuentes (23 a 31 min), las masas incrementan, dando paso a los pesos moleculares correspondientes a las toxinas que afectan a los canales de K^+ (entre 3500 y 4500 Da). Las toxinas que afectan a canales de Na^+ (entre 6000 y 7500 Da), las podemos observar en los tiempos de retención de 33 a 40 min.

Para tiempos de retención mayores (entre 40 y 60 min), las masas moleculares corresponden a moléculas de mayor peso, aunque también es posible detectar moléculas de bajo peso.

Esto nos puede dar la impresión de que a mayor masa, se requiere de mayor % de acetonitrilo en la columna de RP para la separación de los componentes del veneno en la columna. Sin embargo, es notable que para tiempos de retención mayores, nos podemos encontrar con moléculas de bajo peso molecular; lo que nos dice que el tiempo de retención de una molécula en una columna C₁₈, no está más que en función de su hidrofobicidad y no a su tamaño.

En la "huella digital" del *T. costatus*, es notable que sus péptidos no eluyen de la columna hasta los 18 min, aun cuando este veneno contiene péptidos muy pequeños. Esto es que la responsabilidad de que péptidos pequeños tengan mayor tiempo de retención, se debe a la hidrofobicidad de la molécula y no a su tamaño.

En el veneno analizado en este trabajo, se secuenciaron diez péptidos solamente en su N-terminal (Tabla. 2). Dos de estos componentes se clasificaron como enzimas: una hialuronidasa con 44.8 kDa de masa molecular, la cual presenta actividad sobre el ácido hialurónico. A pesar de que se purificó material suficiente para elaborar una curva de actividad enzimática, esta perdió su actividad, como consecuencia de los múltiples pasos de purificación por HPLC.

De igual forma, se obtuvo una secuencia nueva de tipo lisozima ("lisozima-like"), con una masa molecular de 14226.0Da y cuya secuencia se comparó con otras en un banco de datos de lisozimas aisladas de otras fuentes.

Los parámetros de pesos y tiempos de retención, dentro de la búsqueda de toxinas, sirven como una guía. Es por ello que la construcción de la tabla 3 se elaboró con este

mismo fin para moléculas cuyas funciones no han sido dilucidadas del todo. Estos datos ayudaran a la rápida identificación de estos compuestos en investigaciones futuras.

En las masas que se tomaron para elaborar las "huellas digitales" de estos venenos no se excluyen oxidaciones aparentes. Esto se aprecia en las fracciones con tiempo de retención 32.08 min y 32.72 min (con un peso de 5552.0 Da y 5536.0 Da respectivamente, tabla 1 y 3) cuya diferencia entre ellos es de 16 Da. Esta diferencia nos hizo pensar en una posible oxidación de la muestra con masa de 5536.0 Da. Sin embargo cuando se secuenciaron por degradación automática de Edman nos pudimos dar cuenta de que en los primeros 10 aminoácidos existían 2 diferentes (datos no mostrados), lo que nos dice que son 2 péptidos distintos.

La Tst-17 es una molécula que cuenta con 23 aminoácidos de longitud y una masa molecular de 2412.0 Da. Pertenece a la subfamilia α -KTx-13 de toxinas específicas de canales de K^+ . El nombre sistemático que le se le asignó es el de α -KTx-12.4. El primer miembro de esta subfamilia (Tc1) se aisló del alacrán Brasileño *T. cambridgei* [**¡Error! Marcador no definido.**]. El segundo miembro se aisló del alacrán *Orthochirus scrobiculosus* [ⁱrevisado en Rodríguez de la Vega and Possani, 2004], y el tercer miembro (Tpa1) se aisló a partir del alacrán colombiano *T. pachyurus* [ⁱⁱ].

Siendo la Tst-17 el cuarto miembro de esta subfamilia y aunque presenta similitudes de secuencias con las otras, también presenta cambios importantes en la secuencia de aminoácidos. El centro básico (R_6KK_8) presente, tanto en la Tc1 como en la Tpa1, se remplacea en la Tst-17 por un centro de Glicinas (G_6GG_8).

La lisina presente en la posición 14, conservada en todos los miembros conocidos de la subfamilia α -KTx 13, es homóloga para la K27 (Charybdotoxin numbering), la cual ha mostrado ser crítica para el reconocimiento y el bloqueo del canal de K^+ en otras toxinas de alacrán [revisión de Giangiacomo et al., 2004]. Como se muestra en la figura 5, el efecto de bloqueo de la toxina Tst-17 es débil comparado con el de la Tc1.

La estructura tridimensional de la Tst-17 no se ha determinado, pero esta toxina presenta muchas similitudes con la Tc1, por lo cual su estructura 3D puede ser muy parecida. Con respecto a las identidades, ambas toxinas presentan seis Cisteínas formando 3 puentes disulfuro, tienen el mismo número de aminoácidos en su secuencia primaria y una gran similitud en los residuos del C-terminal. Sin embargo, el cambio del centro básico (R₆KK₈) de la Tc1 y la Tpa1 por un centro hidrofóbico (G₆GG₈) en la Tst-17 podría estar jugando un papel muy importante en el reconocimiento y la afinidad por el receptor, cuando se comparan los efectos sobre los canales *Shaker B* K⁺ (figura 5). La presencia de tres Glicinas en el segmento correspondiente a la alfa hélice de la Tc1 [ⁱⁱⁱ] puede ser la causa de las diferencias encontradas, aunada a la directa interacción con la región externa del vestíbulo del canal o a la estabilidad de la estructura 3D de la Tst-17.

El péptido PAPE, como se mencionó en los resultados, es un péptido único, extremadamente rico en Prolinas, Alaninas y Ácidos Glutámicos. No cuenta con residuos de Cisteínas y su función es desconocida (figura 4).

La toxina Tst-3 cuenta con 63 residuos de aminoácidos, se encuentra estabilizada por 4 puentes disulfuro y cuenta con una masa molecular de 7407 Da. También presenta similitud con toxinas que afectan específicamente a canales de Na⁺ encontradas en muchas especies de *Tityus* (figura 4).

El péptido TstβKTx está conformado por 60 residuos de aminoácidos, cuenta con tan solo 3 puentes disulfuro y de acuerdo con la clasificación hecha por Tytgat [^{iv}], debe pertenecer a la familia beta de toxinas de alacrán específicas para canales de K⁺ (β-KTx). La secuencia de aminoácidos de esta toxina es la misma que la TsTx-Kβ reportada en *T. serrulatus* anteriormente [¡Error! Marcador no definido.]. Esta toxina ha mostrado una actividad de bloqueo de canales de K⁺ en sinaptosomas con una IC₅₀ de 30nM.

ⁱ Dudina, E.E., Korolkova, Y.V., Bocharova, N.E., Koshelev, S.G., Egorov, T.A., Huys, I., Tytgat, J., Grishin, E.V., 2001. OsK2, a new selective inhibitor of Kv1.2 potassium channels purified from the venom of the scorpion *Orthochirus scrobiculosus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286, 841-847.

ⁱⁱ Barona, J., Batista, C.V., Zamudio, F.Z., Gomez-Lagunas, F., Wanke, E., Otero, R., Possani, L.D., 2006. Proteomic analysis of the venom and characterization of toxins specific for Na⁺ - and K⁺-channels from the Colombian scorpion *Tityus pachyurus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1764, 76-84.

ⁱⁱⁱ Wang, I., Wu, S.H., Chang, H.K., Shieh, R.C., Yu, H.M., Chen, C., 2002. Solution structure of a K(+)-channel blocker from the scorpion *Tityus cambridgei*. *Protein Sci.* 11, 390-400.

^{iv} Tytgat, J., Chandy, K.G., Garcia, M.L., Gutman, G.A., Martin-Eauclaire, M.F., van der Walt, J.J., Possani, L.D., 1999. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 444-447.

CONCLUSIONES

Haciendo un análisis crítico de los datos obtenidos por espectrometría de masas, podemos concluir que es un método rápido, no muy caro y rentable. Permite aislar e identificar péptidos en particular, a partir de una mezcla compleja de moléculas. Tal es el caso de los venenos de alacranes, muchos de los cuales aun no han sido estudiados. Esto debe ser analizado en conjunto con el conocimiento de los distintos tiempos de retención de cada una de las fracciones presentes en la separación por HPLC.

Otra de las conclusiones, es la similitud en secuencia y función presentes en las moléculas de los venenos de distintas especies de *Tityus*. De las cuales se hace necesaria la purificación de más material para poder determinar con precisión su función dentro del proceso de envenenamiento.

Aunque se desconoce la función del péptido PAPE, no es el primer caso de péptidos ricos en prolina del que se tiene datos, ya que se ha reportado un péptido similar en *Tityus costatus* [39] y al igual que nuestro péptido, su función es completamente desconocida.

En este trabajo se determinó la secuencia primaria de siete péptidos y los N-terminales de otros diez. Con esta información se pudieron hacer alineamientos en la red para su comparación con péptidos ya reportados en la literatura y así poder asignarles una función hipotética.

Los múltiples pasos cromatográficos que fueron necesarios para la purificación de los venenos de alacrán *T. stigmurus* nos hace evidente la necesidad de otros métodos de separación en conjunto con el elegido para este trabajo, ya que se ha visto que la actividad enzimática

(hialuronidásica) se pierde a causa de los disolventes usados en la fase reversa. Sin lugar a duda, la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) es una herramienta sumamente útil para la separación de componentes proteicos, en conjunto con su compatibilidad con el espectrómetro de masas de tipo "electrospray" para la construcción de las "huellas digitales". Sin embargo, por otra parte, para los ensayos de actividad enzimática se podría separar el componente de interés por exclusión molecular o por afinidad.

Con el desarrollo de espectrómetros de masas cada vez más poderosos, así como el implemento de nuevas técnicas de separación, han facilitado el estudio de mezclas proteicas complejas, como es el caso de los venenos de alacrán y otras fuentes de moléculas biológicamente activas. Todo esto ha posibilitado el descubrimiento más rápido de nuevas moléculas, lo que se podrá extender a más especies, convirtiéndose de esta forma, en herramientas moleculares para el desarrollo de la investigación en agricultura y medicina.

ABREVIATURAS

MALDI: Matrix asisted lazer disorption ionization (ionizacion laser, aistida por una matriz).

ESI: Electrospray Ionisation (Ionizacion por electrospray)

DNA: Desoxiribonucleic acid (Acido Desoxiribonucleico)

PTM's: Post-ranslational Modifications (Modificaciones Postraduccionales)

RNA: Ribonucleic Acid (Acido Ribonucleico)

pI: Punto Isoelectrico

2D-PAGE: Bidimensional Poliacrilamide Gel Electrophoresis (Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida)

HPLC: High Performance Liquit Cromatografi (Cromatografía de alta resolución)

CID: Cillitionally Induced Dissociation (Disociación Inducida Por Colisión)

MS/MS: Tandem Mass Spectrometry (Espectrometría de masas en cadena)

PSD: Post Source Decay

FAB: Fast Atom Bombardment (bombardeo rapido de atomos)

ICAT: Isotope Code Affinity Tag

LC-MS/MS: Liquid Chromatography Mass Spectrometry (Espectrometría de Masas Acoplada la Cromatografía Liquida)

$[M+H]^+$: Forma Protonada de la molécula.

Na^+ : Ion Sodio

K^+ : Ion Potasio

GMPc. Guanidin Mono Fosfato ciclico.

IP_3 : Inositol Trifosfato.

TR: Tiempo de Retención

BIBLIOGRAFIA

- 1 Rejâne Maria Lira-da-Silva, Andréa Monteiro de Amorim e Tania Kobler Brazil,. 2000. Envenenamento por *Tityus stigmurus* (Scorpiones; Buthidae) no Estado da Bahia, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 33(3):239-245, mai-jun.
- 2 Holaday, S. K., Martin, B. M., Flechter, P. L., Krishna, N. R. (2000). NMR solution structure of Butantoxin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 379: 18-27.
- 3 Possani, L.D., Becerril, B., Delpierre, M., Tytgat, J., 1999. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *Eur. J. Biochem.* 264:287-300.
- 4 Goundet, C., Chi, Chen-Wu., Tytgat, J., 2002. An overview of toxin and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Toxicon*. 40:1239-1258.
- 5 Batista, C.V.F., Zamudio, F.Z., Lucas, F., Fox, J.W., Fraud, A., Prestipino, G., Possani, L.D., 2002. Scorpion toxins from *Tityus cambridgei* that affect Na⁺-channels. *Toxicon* 40: 557-562.
- 6 C. Legros., B. CeËard., P. E. Bougis., M. F., Martin-Eauclaire., 1998. Evidence for a new class of scorpion toxins active against K⁺ channels. *FEBS Letters*. 431: 375-380.
- 7 Hatta, S., Sakamoto, J., Horio, Y., 2002. Ion channels and diseases. *Med Electron Microsc.* 35:117-126.
- 8 Pimenta, A.M.C., Stöcklin, R., Favreau, P., Bougis, P.E., Martin-Aauclaire, M.F., 2001. Moving pices in a proteomic pulzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae). *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15:1562-1572.
- 9 Pimenta, A.M.C., Martin-Euclaire, M.F., Rochat, H., Figueiredo, G.S., Klapothakis, E., Afonso, L.C.C., De Lima, M.E., 2001. Purification, amino-acid sequence and partial characterization of two toxins whit anti-insect activity from the venom of the South American scorpion *Tityus bahiensis* (Buthidae). *Toxicon*. 39:1009-1019.

10 Batista, C.V.F., Gómez-Lagunas, F., Lucas, F., Possani, L.D., 2000. Tc1, from *Tityus cambridgei*, is the first member of a new subfamily of scorpion toxin that blocks K⁺-channels. *FEBS Lett* .486:117-120.

11 Possani, L.D., Selisko, B., Gurrola, G.B., 1999. Structure and function of scorpion toxins affecting K⁺-channels. Perspectives in drugs discovery and design. 15/16:15-40.

12 Rodríguez de la Vega, R. C., Possani, L. D. 2004. Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. *Toxicon* 43, 865-875.

13 Georgina B. Gurrola, Barbara Rosati, Marcella Rocchetti, Genaro Pimienta, Antonio Zaza, Annarosa Arcangeli, Massimo Olivotto, Lourival D. Possani,* and Enzo Wanke. 1999. A toxin to nervous, cardiac, and endocrine ERG K⁺ channels isolated from *Centruroides noxius* scorpion Venom. *FASEB J.* 13, 953-962.

14 Yuliya V. Korolkova, Sergey A. Kozlov, Aleksey V. Lipkin, Kirill A. Pluzhnikov, Jennifer K. Hadley, Alexander K. Filippov, David A. Brown, Kamilla Angeloi, Dorte Strøbæk, Thomas Jesperseni, Søren-Peter Olesen, Bo S. Jensen, and Eugene V. Grishin, . 2001. An ERG Channel Inhibitor from the Scorpion *Buthus eupeus*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, Vol. 276, No. 13, Issue of March 30, pp. 9868-9876.

15 Marzia Lecchi, Elisa Redaelli, Barbara Rosati, Georgina Gurrola, Tullio Florio, Olivia Crociani, Giulia Curia, Rita Restano Cassulini, Alessio Masi, Annarosa Arcangeli, Massimo Olivotto, Gennaro Schettini, Lourival D. Possani, and Enzo Wanke, . 2002. Isolation of a Long-Lasting eag-Related Gene-Type K_v Current in MMQ Lactotrophs and Its Accommodating Role during Slow Firing and Prolactin Release. *The Journal of Neuroscience*, May 1, 2002, 22(9):3414-3425

16 Nastainczyk, W., Meves, H., Watt, D. D., 2002. A short-chain peptide toxin isolated from *Centruroides sculpturatus* scorpion venom inhibits ether-á-go-go-related gen K⁺-channels. *Toxicon* (40) 1053-1058.

17 Becerril, B., Corona, M., Coronas, F.I.V., Zamudio, F., Calderon-Aranda, E.S., Fletcher, P.L.Jr., Martín, B.M.,

Possani, L.D., 1996. Toxic peptides and genes encoding toxin γ of the Brazilian scorpions *Tityus bahiensis* and *Tityus stigmurus*. *Biochem. J.* 313 : 753-760.

18 Norma A. Valdez-Cruz, Cesar V. F. Batista and Lourival D. Possani, . 2004. Phaiodactylipin, a glycosylated heterodimeric phospholipase A2 from the venom of the scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*. *Eur.J.Biochem.* 271, 1453-1464.

19 Renaud Conde, Fernando Z. Zamudio, Baltazar Becerril, Lourival D. Possani, . 1999. Phospholipin, a novel heterodimeric phospholipase A2 from *Pandinus imperator* scorpion venom. *FEBS Letters* (460)447-450.

20 Renaud Conde, Fernando Z. Zamudio, Mario H. Rodríguez, Lourival D. Possani, . 2000. Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion Venom. *FEBS Letters* (471) 165-168.

21 Torres-Larios A., Gurrola GB., Zamudio FZ., Possani LD., 2000. Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. *Eur. J. Biochem.* Aug; 267 (16): 5023-5031.

22 John B. Fenn., 2003. Electrospray Wings for Molecular Elephants (Nobel Lecture)**. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42: 3871-3894.

23 Koichi Tanaka, Hiroaki Waki, Yutaka Ido, Satoshi Akita, Yoshikazu Yoshida and Tamio Yoshida (Shimadzu Corporation, Nishinokyo-Kuwabaracho, Nakagyo-ku, . (1988) Protein and Polymer Analyses up to m/z 100,000 by Laser Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Vol.2 No.8, Page 151-153.

24 Raska CS, Parker CE, Sunnarborg SW, Pope RM, Lee DC, Glish GL, Borchers CH, . (2003). Rapid and sensitive identification of epitope-containing peptides by direct matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometry of peptides affinity-bound to antibody beads. *J Am Soc Mass Spectrom.* Oct;14(10):1076-85.

25 Dongre AR, Eng JK, Yates JR 3rd, . (1997). Emerging tandem-mass-spectrometry

techniques for the rapid identification of proteins. Trends Biotechnol. Oct;15(10):418-25.

26 Jennings LL, Malecki M, Komives EA, Taylor P,. (2003). Direct analysis of the kinetic profiles of organophosphate-acetylcholinesterase adducts by MALDI-TOF mass spectrometry. Biochemistry. Sep 23; 42(37):11083-91.

27 Andersen JS, Rappsilber J, Steen H, Pandey A, Molina H, Lund M, Podtelejnikov A, Lamond AI, Mann M,. (2002). Multi-protein complexes studied by mass spectrometry. Scientific World Journal. Jan 2;2(1 Suppl 2):91-2.

28 Cavanagh J, Benson LM, Thompson R, Naylor S,. (2003). In line desalting mass spectrometry for the study of noncovalent biological complexes. Anal Chem. Jul 15;75(14):2949-54.

29 Aebersold R,. (2003). Quantitative proteome analysis: methods and applications. J Infect Dis. Jun 15;187 Suppl 2:S315-20.

30 Mann M, Ong SE, Gronborg M, Steen H, Jensen ON, Pandey A,. (2002). Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. Trends Biotechnol. Jun;20(6):261-8.

31 MacCoss MJ, McDonald WH, Saraf A, Sadygov R, Clark JM, Tasto JJ, Gould KL, Wolters D, Washburn M, Weiss A, Clark JI, Yates JR 3rd,. (2002). Shotgun identification of protein modifications from protein complexes and lens tissue. Proc Natl Acad Sci U S A. Jun 11;99(12):7900-5.

32 Pandey A, Mann M,. (2000). Proteomics to study genes and genomes. Nature, 405, 837-846.

33 Hochstrasser, D.F., Sanchez, J. C., Appel, R. D., (2002). Proteomics and its trends facing nature's complexity. Proteomics. 2, 807-812.

34 Dunham I, Shimizu N, Roe BA, Chissoe S, Hunt AR, Collins JE, Bruskiwich R, Beare DM, Clamp M, Smink LJ, Ainscough R, Almeida JP, Babbage A, Bagguley C, Bailey J, Barlow K, Bates KN, Beasley O, Bird CP, Blakey S, Bridgeman

AM, Buck D, Burgess J, Burrill WD, O'Brien KP, et al, .
(2000). The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature*.
1999 Dec 2;402(6761):489-95. Erratum in: *Nature* Apr
20;404(6780):904.

35 Aebersold, R., Goodlett, D.R., (2001). Mass Spectrometry
in Proteomics. *Chem. Rev.* 101:269-295.

36 McCormack, A., Schieltz, D., Goode, B., Yang, S.,
Barnes, G., Drubin, D., Yates III, J. R., 1997. Direct
analysis and identification of proteins in mixtures by
LC/MS/MS and database searching at the low-femtomole level.
Anal. Chem., 69, 767-776.

37 Carol V. Bradley, Dudley H. Williams and Michael R.
Hanley. 1982. Peptide sequencing using the combination of
Edman degradation, carboxypeptidase digestion and Fast Atom
Bombardment mass spectrometry. *Biochemical and Biophysical
Research Communications*. 104 (4); 1223-1230.

38 Palma MS., Itagaki Y., Fujita T., Hisada M., Naoki H.,
Nakajima T. 1997. Mass Spectrometric structure determination
of spider toxins: arginine-containing acylpolyamides from
venom of Brazilian garden spider *Nephilengys cruentata*. *Nat
Toxins*. 5(2):47-57.

39 Pierre Escoubas , Marie Louise Célérier and Terumi
Nakajima. 1997. High-performance Liquid Chromatography
Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight
Mass Spectrometry Peptide Fingerprinting of Tarantula
Venoms in the Genus *Brachypelma*: Chemotaxonomic and
Biochemical Applications. *Rapid Communications in Mass
Spectrometry*, VOL. 11, 1891-1899.

40 Nascimento, D.G., Rates, B., Santos, D.M., Verano-Braga,
T., Barbosa-Silva, A., Dutra, A.A.A., Biondi, I., Martin-
Eauclaire, M.F., De Lima, M.E., Pimenta, A.M.C. 2006.
Moving pieces in a taxonomic puzzle: Venom 2D-LC/MS and
data clustering analyses to infer phylogenetic
relationships in some scorpions from the Buthidae family
(Scorpiones). *Toxicon* 47(6):628-369.

41 Man, M. and Jensen, O. N. (2003). Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat. Biotech.* 21:255-261.

42 <http://mbcf.dfci.harvard.edu/docs/DeltaMass.html>

43 Venter, J.C., The sequence of the human genome (2001). *Science*, 291:1304-1351.

44 Zolnierowicz, S. and Bollen, M. (2000). Protein phosphorylation and protein phosphatases. *EMBO J.* 19:483-488.

45 Mann, M., Ong, S., Gronborg, M., Steen, H., Jensen, O. N., Pandey, A (2002). Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *TRENDS in Biotech.* 20:261-268.

46 Alan C. Rigby, Estelle Lucas-Meunier, Dario E. Kalume, Eva Czerwiec, Björn Hambe, Ingrid Dahlqvist, Philippe Fossier, Gérard Baux, Peter Roepstorff §, James D. Baleja, Barbara C. Furie, Bruce Furie, and Johan Stenflo, . 1999. A conotoxin from *Conus textile* with unusual posttranslational modifications reduces presynaptic Ca²⁺ influx. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 96, pp. 5758-5763.

47 Gina D'Suze, Cesar V.F.Batista, Andrea Frau, Anna Rosa Murgia, Fernando Z.Zamudio, Carlos Sevcik, Lourival D.Possani, Gianfranco Prestipino, . 2004. Discrepin, a new peptide of the sub-family a ktx15, isolated from the scorpion *Tityus discrepans* irreversibly blocks K⁺-channels (I_A currents) of cerebellum granular cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 430 (2004)256-263.

48 Miklós Bagdány, Cesar V. F. Batista, Norma A. Valdez-Cruz, Sándor Somodi, Ricardo C. Rodriguez de la Vega, Alexei F. Licea, Zoltán Varga, Rezső Gáspár, Lourival D. Possani, and György Panyi, . 2005. Anuroctoxin, a New Scorpion Toxin of the α -KTx 6 Subfamily, Is Highly Selective for Kv1.3 over IKCa1 Ion Channels of Human T Lymphocytes. *Mol Pharmacol* 67:1034-1044.

49 Michael P., Washburn., Dirk Wolters., and John R.Yates III. 2001. Large-scale analysis of the yeast proteome by

multidimensional protein identification technology. *nature biotechnology*. Mar;19(3):242-7.

50 Klaiber K, Williams N, Roberts TM, Papazian DM, Jan LY, Miller C. 1990. Functional expression of Shaker K⁺ channels in a baculovirus-infected insect cell line. *Neuron* Aug;5(2):221-6.

51 Tolksdorf S. 1954. The in vitro determination of hyaluronidase. *Methods Biochem Anal.* 1:425-57.

52 C. V. F. Batista, L. del Pozo, F. Z. Zamudio, S. Contreras, B. Becerril, E. Wanke and L.D. Possani., (2004). Proteomics of the venom from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of prolines on mass spectrometry analysis of toxins. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 803, 55-66.

53 E. Diego-García., C. V. F. Batista., B. I. García-Gómez., S. Lucas., D. M. Candido., F. Gómez-Lagunas., L. D. Possani., 2005. The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: genes, peptides and function. *Toxicon*. 45, 273-283.

54 Coronas, F.V., de Roodt, A.R., Portugal, T.O., Zamudio, F.Z., Batista, C.V., Gomez-Lagunas, F., Possani, L.D., 2003. Disulfide bridges and blockage of Shaker B K⁽⁺⁾-channels by another butantoxin peptide purified from the Argentinean scorpion *Tityus trivittatus*. *Toxicon* 41, 173-179.

55 B. Becerril., S. Marangoni., L. D. Possani., 1997. TOXINS AND GENES ISOLATED FROM SCORPIONS OF THE GENUS *TITYUS*. *Toxicon*. 35, 821-835.

56 Possani, L.D., Alagon, A.C., Fletcher, P.L. Jr, Erickson, B.W., 1977. Purification and properties of mammalian toxins from the venom of Brazilian Scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. *Arch. Biochem. Biophys.* 180,94-403.

57 Hamill OP., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth FJ. 1981. Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording cells and cells-free membrane patches. *Pflugers Arch.* Aug;391(2):85-100.

58 Pimenta A.M, De Marco Almeida F., de Lima M.E., Martin-Eauclaire M.F., Bougis P.E. 2003. Individual variability in *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae) venom elicited by

matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 17, 413-418.

59 Borges, A., García, C.C., Lugo, E., Alfonzo, M.J., Jowers, M.J., Op den Camp, H.J.M. 2006. Diversity of long-chain toxins in *Tityus zulianus* and *Tityus discrepans* venoms (Scorpiones, Buthidae): Molecular immunological and mass spectral analyses. *Comp. Biochem. Physiol.(C)* 142, 240-252

60 Pessini, A.C., Takao, T.T., Cavalheiro, E.C., Vichnewski, W., Sampaio, S.V., Giglio, J.R., Arantes, E.C., 2001. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon* 39, 1495-1504.

61 Rodríguez de la Vega, R.C., Possani, L.D., 2005. Overview of scorpion peptides specific for Na⁺ channels: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon* 46, 831-844.

62 Rogowski, R.S., Krueger, B.K., Collins, J.H., Blaustein, M.P., 1994. Tityustoxin K alpha blocks voltage-gated noninactivating K⁺ channels and unblocks inactivating K⁺ channels blocked by alpha-dendrotoxin in synaptosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1475-1479.

63 Novello, J.C., Arantes, E.C., Varanda, W.A., Oliveira, B., Giglio, J.R., Marangoni, S. 1999. TsTX-IV, a short chain four-disulfide-bridged neurotoxin from *Tityus serrulatus* venom which acts on Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Toxicon* 37, 651-66.

64 Elia Diego-García, Elisabeth F. Schwartz, Gina D'Suze, Sergio A. Román González a , Cesar V.F. Batista a , Blanca I. García, Ricardo C. Rodríguez de la Vega a , Lourival D. Possani. 2007. Wide phylogenetic distribution of Scorpine and long-chain β -KTx-like peptides in scorpion venoms: Identification of "orphan" components. *Peptides* (28) 31-37.

65 Possani, L.D., Martin, B.M., Mochca-Morales, J., Svendsen, I., 1981. Purification and chemical characterization of the major toxins from the venom of the

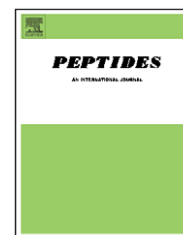
Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello.
Carlsberg Res. Commun. 46, 195-205.

66 Dudina, E.E., Korolkova, Y.V., Bocharova, N.E., Koshelev, S.G., Egorov, T.A., Huys, I., Tytgat, J., Grishin, E.V., 2001. OsK2, a new selective inhibitor of Kv1.2 potassium channels purified from the venom of the scorpion *Orthochirus scrobiculosus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 286, 841-847.

67 Barona, J., Batista, C.V., Zamudio, F.Z., Gomez-Lagunas, F., Wanke, E., Otero, R., Possani, L.D., 2006. Proteomic analysis of the venom and characterization of toxins specific for Na⁺ - and K⁺-channels from the Colombian scorpion *Tityus pachyurus*. Biochim. Biophys. Acta 1764, 76-84.

68 Wang, I., Wu, S.H., Chang, H.K., Shieh, R.C., Yu, H.M., Chen, C., 2002. Solution structure of a K(+)-channel blocker from the scorpion *Tityus cambridgei*. Protein Sci. 11, 390-400.

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

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/peptides

Wide phylogenetic distribution of Scorpine and long-chain β -KTx-like peptides in scorpion venoms: Identification of “orphan” components

Elia Diego-García^a, Elisabeth F. Schwartz^{a,b}, Gina D’Suze^{a,c},
Sergio A. Román González^a, Cesar V.F. Batista^a, Blanca I. García^{a,d},
Ricardo C. Rodríguez de la Vega^a, Lourival D. Possani^{a,*}

^aDepartment of Molecular Medicine and Bioprocesses, Institute of Biotechnology, National Autonomous University of Mexico, Avenida Universidad, 2001, Cuernavaca 62210, Mexico

^bLaboratory of Toxinology, Department of Physiological Sciences, University of Brasilia, Brazil

^cInstituto Venezolano de Investigaciones Científicas-CBB, Caracas, Venezuela

^dInstituto Bioclon S.A. de C.V., km 15 Carretera Teoloyucan, Huehuetoca 54680, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 March 2006

Received in revised form

27 June 2006

Accepted 27 June 2006

Published on line 1 December 2006

Keywords:

Amino acid sequence determination

cDNA cloning

Scorpion toxins

ABSTRACT

Scorpine and toxins specific for potassium channels of the family beta (β -Ktx) are two types of structurally related scorpion venom components, characterized by an unusually long extended N-terminal segment, followed by a Cys-rich domain with some resemblance to other scorpion toxins. In this communication, we report evidence supporting the ubiquitous presence of Scorpine and β -KTx-like polypeptides and their precursors in scorpions of the genus *Tityus* of the family Buthidae, but also included is the first example of such peptides in scorpions from the family Iuridae. Seven new β -KTxs or Scorpine-like peptides and precursors are reported: five from the genus *Tityus* (*T. costatus*, *T. discrepans* and *T. trivittatus*) and two from *Hadrurus gertschi*. The cDNA precursors for all of these peptides were obtained by molecular cloning and their presence in the venoms were confirmed for various peptides. Analysis of the sequences revealed the existence of at least three distinct groups: (1) β -KTx-like peptides from buthids; (2) Scorpine-like peptides from scorpionid and iurid scorpions; (3) heterogeneous peptides similar to BmTXX β of buthids and iurids. The biological function for most of these peptides is not well known; that is why they are here considered “orphan” peptides.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Scorpion venoms are complex mixtures in which toxic polypeptides constitute the most prominent components [7]. Most of the presently described peptides are generically classified as either short-chain scorpion toxins (23–42 amino acids long) shown to block potassium channels [16], or long-chain scorpion toxins (53–78 residues) capable of modulating

the gating mechanism of sodium channels [17]. Both types of toxins are structurally related, adopting the denominated “cysteine stabilized α/β motif” (Cs $\alpha\beta$ -motif), in which two strictly conserved disulfide bridges cross-link an α -helix segment of the peptide with the second strand of an $\alpha\beta$ minimum topology [12]. This distinction holds for most scorpion components described thus far (extensive annotated lists are available at Tox-Prot [9] and SCORPION2 [19]). There

* Corresponding author. Tel.: +52 77 73 171209; fax: +52 77 73 172388.

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

0196-9781/\$ – see front matter © 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.peptides.2006.06.012

are, however, some scorpion venom polypeptides which do not fit into this classification. Among these are non-disulfide bridged cytolytic peptides such as Hadrurin, Pandinins and IsCT's (reviewed in Ref. [10,22]), as well as several precursors identified by molecular cloning of genomic and/or cDNAs obtained from venomous glands [23]. It is worth noting that the prevalence of unusual components has been verified in several scorpion species, although their precise role in the context of venom function has not been clarified. With the exception of those with cytolytic activity (which are linear peptides), most of them are functionally ill characterized.

The majority of these scorpion venom components constitute unique examples of their kind. One type, however, appears to be widely distributed among scorpion species from two different families, including polypeptides from buthids: *T. serrulatus* [18,11] and *T. costatus* (two variants [8]), and one from the family Scorpionidae: *Pandinus imperator* [5]. Furthermore, there are also precursors cloned from the buthids: *Androctonus australis* [11] and *Mesobuthus martensii* (two variants [24]), and from the scorpionid *Opisthophthalmus carinatus* (four variants [25]). These polypeptides are 59–75 amino acid residues long, contain six cysteines forming three disulfide bridges, and present two structural domains: a putative α -helical N-terminus and a Cys-rich C-terminus, with the consensus signature of CS α β -motif [5,25]. Interestingly, the linear domain resembles cationic antimicrobial peptides [5,25], whereas the CS α β -motif domain is more similar to some invertebrate defensins than to typical scorpion toxins [5,11,25]. Unfortunately, only native TsTX-K β from *T. serrulatus* and Scorpine from *P. imperator* were assayed extensively. TsTX-K β is a potassium channel blocker [18], whereas Scorpine is an antimicrobial and antiparasitic agent [5]. Additionally, a recombinant version of BmTxK β from *M. martensii* [4] and the synthetic N-terminal segment of Opiscorpine 1 [25] were assayed functionally. Due to the inhibitory action of TsTX-K β on K⁺ currents [18], its close homologues from buthid scorpions have been classified as belonging to the β -KTx family of scorpion toxins [21].

In this report, we present evidence supporting the ubiquitous presence of Scorpine and β -KTx-like polypeptides and their precursors in scorpions of the genus *Tityus*. We also present the first example of such peptides in scorpions from the family Iuridae. Overall, we are reporting seven new β -KTxs or Scorpine-like peptides and precursors, five from three species of *Tityus* and two from the Iuridae scorpion *H. gertschi*. The cDNA precursors for all of these peptides were obtained by PCR and RACE methods. The presence of the corresponding peptides in the venom was confirmed for two species, one from each scorpion family studied. Additionally, a peptide identical to TsTXK β was isolated and fully sequenced from *T. stigmurus* venom. Based on their amino acid sequences, these long-chain scorpion venom peptides were classified according to three different groups: (1) β -KTx-like peptides, closely related to the previously characterized TsTX-K β , AaTX-K β and BmTXK β 2 (all from buthid species); (2) Scorpine-like peptides from scorpionid and iurid scorpions; (3) heterogeneous peptides from the *M. martensii*, *H. gertschi* and *Tityus* species. Comparative analysis showed that the three groups are characterized by high pairwise identity within the group (50–97%) and low average identity between groups (<30%).

2. Materials and methods

2.1. Venom source and purification procedures

Venom from the scorpions studied was obtained by electrical stimulation of CO₂-anesthetized scorpions. The material was dissolved in water and centrifuged 10,000 $\times g$ for 10 min. The soluble fractions of the venoms were separated as described: *T. discrepans* [2], *T. costatus* [8], *H. gertschi* [20] and *T. stigmurus* (Batista et al., see Note added in proof).

2.2. Mass spectrometry determinations

Five microlitres of the native peptides were injected into a LC/MS system composed of a Finnigan LCQDuo ion trap mass spectrometer (San Jose, CA, USA) with a nanoelectrospray ionization (ESI) source using a Surveyor MS syringe pump delivery system and a C18 PicoFrit column/needle (75 μ m \times 10.1 cm) which was set on an xyz multi-axis translational stage for optimizing the ESI signal. The LC/ESI-MS/MS data acquisition program was set up to collect ion signals from the peptides using an automatic, data-dependent scan procedure, in which a cyclic series of three different scan modes (full scan, zoom scan and MS/MS scan) were performed. First, the most abundant peptide ion peak in a full scan (m/z 300–2000) was selected as the precursor ion. Second, a zoom scan was performed to determine the charged state of the precursor ion. Finally, an MS/MS scan was used to determine the sequence of the precursor ion using collisionally induced dissociation (CID) with relative collision energy of 40%. The enzyme digested peptides were separated using mobile phases A and B with a linear gradient of 5–60% B (mobile phase A, 0.5% acetic acid–water; mobile phase B, 0.5% acetic acid in acetonitrile), at a flow rate of 0.2 μ L min⁻¹. The data acquisition and the automatic analysis of data were performed with Xcalibur software on a Windows NT PC system. The MS/MS spectra from peptides enzymatically generated were analyzed manually and via Sequest software (Finnigan, San Jose, CA, USA).

2.3. Amino acid sequences

Amino acid sequence determination of toxin (Tst β KTx) from the venom of *T. stigmurus* was obtained using a native peptide and its fragments generated by enzymatic cleavage. Automatic Edman degradation was performed in a Beckman LF 3000 Protein Sequencer (Palo Alto, CA, USA) using the chemicals and procedures previously described [1,3]. The enzyme used for this work was endoproteinase Glu-C (protease V8) from Roche Diagnostics (Basel, Switzerland). Three additional peptides from *T. costatus* (TcoKIK) and *H. gertschi* (Hge Scorpine-like and Hge β KTx) were directly sequenced using the procedure previously described [8].

2.4. Construction of cDNA libraries

The cDNA libraries were constructed with RNA extracted from single individuals, using only the telson (last post-abdominal segment of the scorpion, which contains the stinger and a pair of venomous glands) of each one of the

four species studied: *T. discrepans*, *H. gertschi*, *T. trivittatus* and *T. costatus*. All libraries were prepared using total RNA, isolated by means of the Total RNA Isolation System of Promega (Madison, WI, USA). For *T. discrepans* and *H. gertschi* full-length cDNA phagemid libraries were obtained with the SMART cDNA Library Construction Kit (CLONTECH Lab., Palo Alto, CA, USA). For *T. trivittatus* the plasmid cDNA library was prepared by means of Creator SMART cDNA library (CLONTECH Lab.). The titers of the amplified cDNA libraries and percentages of recombinant clones obtained were: 1×10^7 with 99% for *T. discrepans*, 1.5×10^9 with 99% for *T. trivittatus* and 5.23×10^{10} with 99% for *H. gertschi*. Construction of the library of *T. costatus* was described previously [8].

2.5. Gene cloning and DNA sequencing

Based on the information obtained from direct sequencing of the peptide TcoKIK from *T. costatus*, an oligonucleotide was designed and synthesized: 5'-AAR ATY AAR AGY GGN TGG GAR CG-3'. The DNA Synthesizer model 391 of Applied Biosystems (Foster city, CA, USA) was used. N, R and Y stand for degenerated nucleotides. For the polymerase chain reaction (PCR), this primer was used in conjunction with the pair CD3/3' primer (5'-AAT CTA GAG GCC GAG GCG GCC GAC ATG-3'), designed on the basis of the CDSIII/3' sequence tag used for libraries construction. The library from *T. costatus* was used as template for the PCR reaction. A random sequencing strategy was followed for screening the other cDNA libraries (*T. discrepans*, *T. trivittatus* and *H. gertschi*). For the PCR the oligonucleotides TripIEx2-5' (from CLONTECH Lab.) and CD3/3' were used as primers. The Creator library (*T. trivittatus*) was screened using M13 primers provided with the kit. The PCR reaction was performed in $1 \times$ Taq DNA polymerase PCR buffer, $200 \mu\text{M}$ dNTPs, $0.25 \mu\text{M}$ degenerate forward primer, $0.25 \mu\text{M}$ reverse primer (SMART Library) and one unit of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Brazil) in $50 \mu\text{L}$ final volume. The PCR protocol was as follows: hot start with 5 min denaturation at 94°C , 1.5 min alignment at 45°C and 2.5 min elongation at 72°C . After this pre-cycle, the mixtures were incubated for 1 min at 94°C , 1 min at 50°C and 1 min at 72°C , repeated 35 folds, followed by a 7 min final step at 72°C . PCR products were purified using a Centricon 100 column (Amicon) following the manufacturer's instructions, then ligated into the pGEM-plasmid (Promega, Madison, WI, USA). The ligation reaction was used to transform competent *Escherichia coli* DH5- α cells. Positive clones were sequenced from both ends using an automatic machine (Model 3100, Applied Biosystems, Foster city, CA, USA). The nucleotide sequences obtained in this work are deposited in GeneBank (accession numbers: DQ465345–DQ465351).

2.6. Analysis and comparison of sequences

Similarity searches were performed with BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) and FASTA 3 (www.ebi.ac.uk/fasta) protocols. Multiple sequence alignments were obtained using T-COFFEE [15]. The pairwise identities were calculated with BioEdit (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html).

3. Results

3.1. Molecular cloning of Scorpine- and βKTx -like precursors

Systematic screening and sequencing of clones from cDNA libraries constructed for *T. discrepans*, *T. trivittatus* and *H. gertschi* scorpion venom glands revealed the presence of a group of precursors with high similarities to either βKTx scorpion toxins or Scorpine-like peptides. The nucleotide sequences of all these clones were confirmed by sequencing from both ends. We have found two distinct precursors in each one of these libraries, which were named according to the species and the most similar peptides found in public databases. The nucleotide sequences found showed that all genes from *Tityus* species have a similar organization which includes a putative 19–25 residues-long signal peptide (italics in the figure) followed by a putative short pro-sequence of 8–19 residues (underlined in the figure) and the presumed mature sequence of 47 or 60 amino acid residues (Fig. 1). Clones from *H. gertschi* do not have the pro-region like sequence, presenting 19 (Hge βKTx) or 21 (Hge Scorpine-like) residues long signal peptides and mature sequences of 58 (Hge βKTx) or 76 (He Scorpine-like) amino acid residues. Due to the library construction strategies (see Section 2), for all these clones we determined 26–30 bp of the 5' and 3' non-translated sequences up to the polyA region (for details refer to the GenBank entries). All together, in Fig. 1, we report for the first time seven new sequences of precursors for scorpion venom components.

Following our previous study on the proteomic analysis of *T. costatus* venom [8], the amino acid N-terminal sequence of the component eluting at 33.88 min (see reference) was determined. The first 29 residues of this peptide were determined by automatic Edman degradation. The results showed some resemblance between this component and that of the βKTx family. The molecular mass determined, however, was rather low when compared to the reported peptides of this kind (5278.5 amu against 6500–8000 amu). Based on the amino acid sequence obtained, an oligonucleotide was synthesized and used for conducting a 3' RACE, allowing the determination of the entire sequence. The full sequence indicates that the corresponding peptide has 47 amino acid residues, with a theoretical molecular mass of 5278.1 amu, which matches exactly with that of a peptide experimentally determined by mass spectrometry (5278.5 amu); it was named TcoKIK.

3.2. Identification of Scorpine and βKTx -like peptides in scorpion venoms

Since several precursors of putative peptides were identified based on nucleotide sequences (Fig. 1), it was important to confirm the presence of the peptides encoded by these genes in the corresponding venoms. The venoms from *T. discrepans* and *H. gertschi* were separated by high performance liquid chromatography ([2,20], Schwartz et al., see Note added in proof) and several peptides were subjected to Edman degradation in order to determine their N-terminal amino acid sequences. The results obtained allowed the verification of the presence of two peptides in each of the *T. discrepans* and

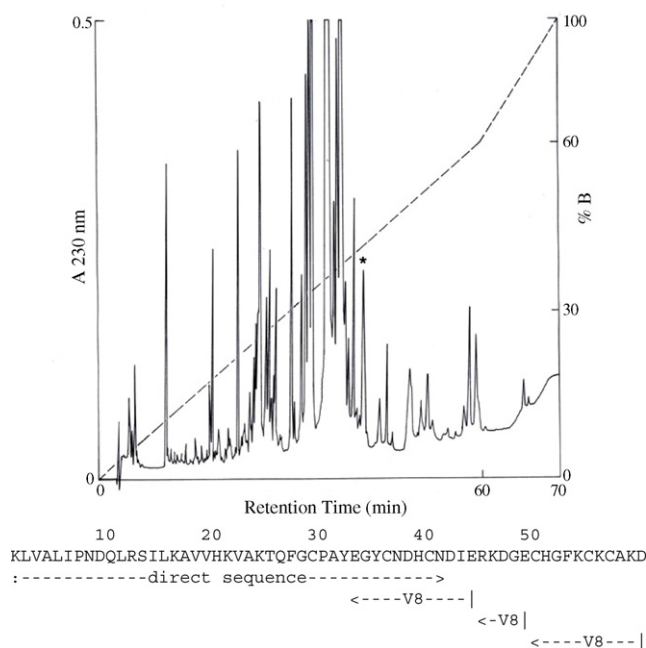


Fig. 2 – Chromatographic separation and sequence determination of Tst β KTx from *T. stigmurus*. Upper part shows the HPLC profile of 1 mg of soluble venom from *T. stigmurus*, using the gradient indicated by broken lines and described in Section 2. Asterisk indicates the component from which Tst β KTx was obtained. The lower part of the figure shows the amino acid sequence determined by direct Edman degradation (direct sequence) and the overlapping segments after endoproteinase V8 (V8) digestion and mass spectrometry identification.

Butantoxin from *T. serrulatus* [14] and *T. trivittatus* [6]). More recently, a phenetic analysis based on the determination of mass fingerprinting of venom from *T. serrulatus* and *T. stigmurus* confirms the close relationship between both species [13].

3.3. Sequence comparison

Similarity searches, BLAST and FASTA 3, with any of the seven new sequences reported here retrieved only β KTx and Scorpine related sequences with good expectance values. In order to characterize their relationship, a multiple sequence alignment was performed using T-COFFEE [15] and this alignment was used to construct a pairwise identity matrix with BioEdit (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html). According to this matrix, two clear groups could be identified on the basis of their identities. Within each group the identity is high (>50%). Pairwise identities between groups are low (<40%). The third group is similar to the parent sequence of BmTXK β [24], presenting a more heterogeneous identity (30–65% identity), although it does show better BLAST expectance values (E values $<10^{-5}$) when compared to BmTXK β . Fig. 3 shows the sequence of the groups obtained in which the last columns represent the degree of identity found within members of each group.

4. Discussion

In this communication we show the presence of at least three distinct groups of precursors, containing signal peptides, possible pro-peptides and mature peptides, in the venom and venomous glands of three distinct families of scorpions, Buthidae, Scorpionidae and Iuridae, whose functions are not well defined. For this reason we have called them “orphan” peptides. Seven new sequences are reported here for the first time (Fig. 1), identified in the scorpions: *T. costatus* and *T. discrepans*, *T. trivittatus* (buthids); *H. gertschi* (Iurid), and compared with 10 components (Fig. 3) described in the literature from the species: *A. australis*, *M. martensii*, *T. serrulatus* (buthids); *P. imperator* and *O. carinatus* (scorpionids). This shows that these kinds of peptides are widely distributed phylogenetically, which suggests that they might play an important but as yet unidentified functional role. It is well known that TsTX-K β is a K⁺ channel blocker [18] and that Scorpine is an antibacterial and antimalaric agent [5]. It is also known that a segment of BmTXK β produced by recombinant DNA techniques is active on the blockage of K⁺ channels of myocytes [4]. It is worth mentioning that the putative peptide encoded by the precursor BmTXK β , to the best of our knowledge, was never directly isolated from the venom. The sequence used for expression of BmTXK β assumed that the mature peptide starts with Lys-Asn-Ile-Lys-... sequence in position 10–14 (as indicated in Fig. 3), however, in the light of the results reported here, the real peptide may start at position 24 (Lys-Met-Lys-His-...) instead. In the case of the precursors identified in *Tityus* species this segment corresponds to the sequence Lys-Ile-Lys-Ser-..., which matches the sequences of the real peptides found in the venom studied here (TcoKIK and TdiKIK). Furthermore, the precursors of both TcoKIK and TdiKIK encode for “pro-sequences”, which align very well with that of BmTXK β (positions 3–23). These resemblances suggest that at least BmTXK β , TcoKIK, TdiKIK and TtrKIK are authentic orthologous genes. The relationship of Hge β KTx with this family remains to be clarified, but the good BLAST expectance values suggest it is a bona fide iurid homologue of the BmTXK β -related peptides of buthid scorpions.

The fact that we were able to identify and sequence peptides of the venoms, and were able to correlate the structure found with those of the cloned genes, allowed us to reach the conclusion that the putative pro-peptides proposed need to be re-evaluated. In *T. costatus* venom, there are two peptides sharing the same 60 residue-long sequences (Fig. 3, Tco Scorpine-like and Tco42.14), one of them possessing an eight residue-long extension at the N-terminus [8]. This region corresponds exactly to the proposed propeptide of homologous TsTX-K β , AaTX-K β [11] and BmTXK β 2 [24]. Gene cloning reveals the existence of two types of precursors in *T. costatus*, differing only in a single non-synonymous nucleotide substitution within the region corresponding to the signal peptide, but encoding the same putative pro-sequences. It is worth emphasizing that the word “pro-peptide” has a strict scientific meaning, surmising the existence of a longer precursor which is inactive due to the presence of a particular fragment which needs to be processed in order to liberate the active segment. Due to the lack of information regarding whether or not the unprocessed N-terminus extension inactivates the mature form of

	10	20	30	40	50	60	70	%Identity with TsTX-K β				
P69940 TsTX-K β	-glrekhvq	KLVA-LIPNDQLRSILKAVV	-HKVAKTQFGCPA	---	YEGYCN	DHCNDIERKDGEGCHGFKCKCAKD	----	100				
P69939 AaTX-K β ts	-glrekhvq	KLVKYAVPVGTLRTILQTVV	-HKVGKTQFGCPA	---	YQGYCDDH	CQDIKKEEGFCHGFKCKCGIPMGF	----	61				
Q9N661 BmTXK β 2 ts	-glrekhfg	KLVKYAVPEGLRTIIQTAV	-HKLGKTQFGCPA	---	YQGYCDDH	CQDIKKEEGFCHGFKCKCGIPMGF	----	56				
Q5G8A6 Tco Scorpine-like n.d.e. Tco42.14	-----	KLVA-LIPNDQLRSILKAVV	-HKVAKTQFGCPA	---	YEGYCN	NHCQDIERKDGEGCHGFKCKCAKD	----	95				
n.d.e. Tst β KTX	-----	KLVA-LIPNDQLRSILKAVV	-HKVAKTQFGCPA	---	YEGYCN	NHCQDIERKDGEGCHGFKCKCAKD	----	88				
DQ465347 Tdi β KTX	-glrekhvq	KLVT-LIPNDTLRSIMKTIV	-HKLAKTQFGCPA	---	YEGYCM	NHCQDIERHDGSCGHGFKCKCEKS	----	78				
DQ465345 Ttr β KTX ts	-glrekhvq	KLVA-LIPNDTVRSILKAVV	-HKAAKTQFGCPA	---	YEGYCN	NHCQDIERKDGEXCXGFKCKCAKD	----	85				
with Scorpine												
P56972 Scorpine	GWINEEKI	QKKIDERMGNTVLGGMAKAIIV	-HKMAKNEF	QCMANMDMLGNCEKHCQ	-TSGEGKY	CHGHTKCKCGTPLSY-		100				
Q5WR03 Opiscorpine1 ts	KWFNEKSI	QNKIDEKIGKNFLGGMAKAVV	-HKLAKNEF	MFCVANVDMTKSCDTHCQKASGEKGY	CHGHTKCKCGVPLSY-			70				
Q5WR02 Opiscorpine2 ts	KWLNEKSI	QNKIDEKIGKNFLGGMAKAVV	-HKLAKNEF	MFCMANMDPTGSCETHCQKASGEKGY	CHGHTKCKCGVPLSY-			73				
Q5WQZ7 Opiscorpine3 ts	KWLNEKSI	QNKIDEKIGKNFLGGMAKAVV	-HKLAKNEF	MFCVANVDMTKSCDTHCQKASGEKGY	CHGHTKCKCGVPLSY-			70				
Q5WQZ9 Opiscorpine4 ts	KWLNEKSI	QNKIDEKIGKNFLGGMAKAVV	-HKLAKNEF	MFCVANIDMTKSCDTHCQKASGEKGY	CHGHTKCKCGVPLSY-			70				
DQ465351 HgeScplp	GWMSKKVQ	GILDKLPEGIIIRNAAKAIIV	-HKMAKNQ	FGFCFANVDVVKGDCKRHC	-AEDKEGI	CHGHTKCKCGVPLSYL		51				
with BmTXK β												
Q9NJC6 BmTXK β ts	--grgkeim	<i>KNIKEKLTE</i> --VKDKMKHSWNKLTSMSEYACPV	---	IEKWCEDHCA	-AKKAI	GKCEDTECKLKLK--		100				
DQ465349 TcoKIK	-----	-----	-----	KIKSGWERLTS	ESEYACPA	---	IDKFCEDHCA	-AKKAVG	CDDFKNCIKL	----	54	
DQ465348 TdiKIK	--gkgkevl	gkiknklve--vkeKI	KAGWDLTSKSEYACPV	---	IDKFCEDHCA	-AKNAI	GKCDDFKQCQLNS	----	67			
DQ465346 TtrKIK ts	--gkgkevl	gkikdklie--akDKI	KSGWERLTSQSEYACPA	---	IEKFCEDHCA	-AKKAVG	KCDDFKNCIKL	----	67			
DQ465350 Hge β KTX	----	KSTVGQK	LKKLNQ--AVDKVK	----	EVLNKSEY	MCVPV	---	VSSFCKQ	HCA-RLGKSG	QCDDLLEICTS	----	26

Fig. 3 – Multiple sequence alignment of Scorpine and β KTx-like scorpion venom peptides and precursors. The alignment was obtained with T-COFFEE [15] and the pairwise identities (last column) were calculated with BioEdit. The sequences are labeled with their Swiss-Prot or GenBank accession numbers. Lower case letters refers to putative pro-sequences as derived from gene cloning of precursors. Italics represent the N-terminus extension included in the functionally tested recombinant BmTXK β [4], which might correspond to a pro-sequence on the light of the identified peptides in Tityus species homologs. Translated sequences (without confirmation of its presence in the corresponding venoms) are indicated as “ts” after the names. The abbreviation n.d.e. means: no data bank entry. X means unknown amino acid.

β KTx-like peptides, the entire matter is poorly defined for the case discussed here. More experiments should be conducted before a clear-cut conclusion can be reached.

All Scorpine- and β KTx-like peptides from scorpion venoms seem to be related to each other when analyzed by current bioinformatics tools.

Here, we corroborate and extend the wide phylogenetic distribution of these scorpion venom components and provide a rationale for their classification. It is clear that at least three different groups can be assigned, as mentioned earlier. The widely distributed presence of Scorpine- and β KTx-like peptides in scorpion venom suggests that they should play an important role in the venom biology. Unfortunately, the poorly characterized function of these peptides hampered a more in-depth discussion about their possible physiological role. It remains to be clarified if, firstly, the peptides like TsTX-K β (AaTX-K β , BmTXK β 2, Tco β KTx, Tco42.14, Tdi β KTx, Tst β KTx and Ttr β KTx) display a similar activity as blockers of K⁺ channels; secondly, if the Scorpine-like peptides (Opiscorpines 1–4 and Hge Scorpine-like peptide) display a bona fide antimicrobial activity or if they perform another, as yet uncharacterized function in the context of the venom, and finally; which is the real mature functional form of BmTXK β and which is the real function of its homologues described here: TcoKIK, TdiKIK and TtrKIK.

Batista CVF, Román-González SA, Salas-Castillo SP, Zamudio FZ, Gómez-Lagunas F, Possani LD. Proteomic analysis of the venom from the scorpion Tityus stigmurus: biochemical and physiological comparison with other Tityus species. *Comp Biochem Physiol* (accepted for publication). Schwartz EF, Schwartz CA, Gómez-Lagunas F, Zamudio F.Z, Possani LD. HgeTx1, the first K⁺-channel specific toxin characterized from the venom of the scorpion Hadrurus gertschi Soleglad. *Toxicon* 2006;48:1046–53.

Acknowledgements

The authors acknowledged Dr. Adolfo de Rodt for *T. trivittatus* specimens and Instituto Butantan (Sao Paulo, Brazil) for the venoms from the other Tityus species. This work was partially financed by grants from CONACyT-Mexico Salud-2005-01-14109 and MOR-2004 C02-002 (to LDP), CONACyT-Mexico 47879-Q (to CVFB), CNPq-Brazil number 201294/2003-6 (to EFS), CONACyT-Mexico and CNPq-Brazil (to LDP and EFS), Dirección General de Asuntos del Personal Academico of the National Autonomous University of Mexico IN-206003 (to LDP) and IN-214705 (to CVFB); FONACIT-Venezuela S1-2001000908 (to GD).

REFERENCES

- [1] Batista CVF, del Pozo L, Zamudio FZ, Contreras S, Becerril B, Wanke E, et al. Proteomics of the venom from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of

Note added in proof

While this report was in the process of evaluation/editing, two references labeled as “submitted” and “in preparation” were accepted or published. They are:

- prolines on mass spectrometry analysis of toxins. *J Chromatogr B* 2004;803:55-66.
- [2] Batista CVF, D'Suze G, Gómez-Lagunas F, Zamudio FZ, Encarnación S, Sevcik C, et al. Proteomic analysis of *Tityus discrepans* scorpion venom and amino acid sequence of novel toxins. *Proteomics* 2006;6:3718-27.
- [3] Brune DC. Alkylation of cysteine with acrylamide for proteins sequence analysis. *Anal Biochem* 1992;207:285-90.
- [4] Cao Z, Xiao F, Peng F, Jiang D, Mao X, Liu H, et al. Expression, purification and functional characterization of a recombinant scorpion venom peptide BmTXKbeta. *Peptides* 2003;24:187-92.
- [5] Conde R, Zamudio FZ, Rodriguez MH, Possani LD. Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Lett* 2000;471:165-8.
- [6] Coronas FV, de Roodt AR, Portugal TO, Zamudio FZ, Batista CV, Gomez-Lagunas F, et al. Disulfide bridges and blockage of Shaker B K(+) channels by another butantoxin peptide purified from the Argentinean scorpion *Tityus trivittatus*. *Toxicon* 2003;41:173-9.
- [7] da Silva WD, Kipnis TL. Venoms. In: *Encyclopedia of life sciences*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.; 2001. doi: 10.1038/npg.els.0000939.
- [8] Diego-Garcia E, Batista CV, Garcia-Gomez BI, Lucas S, Candido DM, Gomez-Lagunas F, et al. The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: genes, peptides and function. *Toxicon* 2005;45:273-83.
- [9] Jungo F, Bairoch A. Tox-Prot, the toxin protein annotation program of the Swiss-Prot knowledgebase. *Toxicon* 2005;45:293-301.
- [10] Kuhn-Nentwig L. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:2651-68.
- [11] Legros C, Ceard B, Bougis PE, Martin-Eauclaire MF. Evidence for a new class of scorpion toxins active against K⁺ channels. *FEBS Lett* 1998;431:375-80.
- [12] Mouhat S, Jouirou B, Mosbah A, De Waard M, Sabatier JM. Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochem J* 2004;378:717-26.
- [13] Nascimento DG, Rates B, Santos DM, Verano-Braga T, Barbosa-Silva A, Dutra AA, et al. Moving pieces in a taxonomic puzzle: venom 2D-LC/MS and data clustering analyses to infer phylogenetic relationships in some scorpions from the Buthidae family (Scorpiones). *Toxicon* 2006;47:628-39.
- [14] Novello JC, Arantes EC, Varanda WA, Oliveira B, Giglio JR, Marangoni S. TsTX-IV, a short chain four-disulfide-bridged neurotoxin from *Tityus serrulatus* venom which acts on Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Toxicon* 1999;7:651-60.
- [15] Notredame C, Higgins DG, Heringa J. T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 2000;302:205-17.
- [16] Rodríguez de la Vega RC, Possani LD. Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. *Toxicon* 2004;43:865-75.
- [17] Rodríguez de la Vega RC, Possani LD. Overview of scorpion peptides specific for Na⁺-channels: biodiversity, structure-function and evolution. *Toxicon* 2005;46:831-44.
- [18] Rogowski RS, Krueger BK, Collins JH, Blaustein MP. Tityustoxin K alpha blocks voltage-gated noninactivating K⁺ channels and unblocks inactivating K⁺ channels blocked by alpha-dendrotoxin in synaptosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1475-9.
- [19] Tan PJ, Veeramani A, Srinivasan KN, Ranganathan S, Brusica V. SCORPION2: a database for structure-function analysis of scorpion toxins. *Toxicon* 2006;47:356-63.
- [20] Torres-Larios A, Gurrola GB, Zamudio FZ, Possani LD. Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. *Eur J Biochem* 2000;267:5023-31.
- [21] Tytgat J, Chandy KG, Garcia ML, Gutman GA, Martin-Eauclaire MF, van der Walt JJ, et al. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20:444-7.
- [22] Zeng XC, Corzo G, Hahin R. Scorpion venom peptides without disulfide bridges. *IUBMB Life* 2005;57:13-21.
- [23] Zhijian C, Feng L, Yingliang W, Xin M, Wenxin L. Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification. *Toxicon* 2006;47:348-55.
- [24] Zhu S, Li W, Zeng X, Jiang D, Mao X, Liu H. Molecular cloning and sequencing of two 'short chain' and two 'long chain' K(+) channel-blocking peptides from the Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. *FEBS Lett* 1999;457:509-14.
- [25] Zhu S, Tytgat J. The scorpine family of defensins: gene structure, alternative polyadenylation and fold recognition. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:1751-63.