



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Caracterización Bioquímica y Fisiológica de los componentes del veneno de
*Conus regularis***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M en C. Sergio Agustín Román González

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Roberto Alejandro Arreguín Espinosa de los Monteros
Instituto de Química.**

COMITÉ TUTOR:

Dr. Abel Moreno Cárcamo.

Instituto de Química.

Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade.

Instituto de Fisiología Celular.

CIUDAD DE MÉXICO. Octubre, 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Caracterización Bioquímica y Fisiológica de los componentes del veneno de
*Conus regularis***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M en C. Sergio Agustín Román González

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Roberto Alejandro Arreguín Espinosa de los Monteros

ENTIDAD DE ADSCRIPCIÓN: Instituto de Química.

COMITÉ TUTOR:

Dr. Abel Moreno Cárcamo.

ENTIDAD DE ADSCRIPCIÓN: Instituto de Química.

Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade.

ENTIDAD DE ADSCRIPCIÓN: Instituto de Fisiología Celular.

CIUDAD DE MÉXICO. Octubre, 2017.

Agradecimientos

Se agradece al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por el apoyo a la realización de este trabajo de investigación.

Así como con el apoyo otorgado al M en C. Sergio Agustín Román González como becario de CONACyT con registro 189808.

Esta tesis se realizó en el laboratorio del Dr. Roberto Alejandro Arreguín Espinosa de los Monteros del Departamento de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma De México (IQ-UNAM) en Ciudad Universitaria.

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

Dr. Roberto Alejandro Arreguín Espinosa de los Monteros

Dr. Abel Moreno Cárcamo

Dr. Julio Enrique Roque Moran Andrade

Agradecimientos a título personal

Al Dr. Lourival Domingos Possani Postay del Instituto de Biotecnología de la UNAM, por su apoyo invaluable para el desarrollo de esta tesis.

De igual forma se agradece al Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro del "Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California" por la colaboración y aporte invaluable del veneno de *Conus regularis*.

A la Dra. Johanna Bernáldez Sarabia del "Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California" por su valiosa colaboración en el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Eloísa Rivera y a la Lic. Ariadna Rivera por sus valiosas observaciones y correcciones a este escrito.

A mis compañeras de trabajo en la Unidad de Proteómica del INMEGEN, Diana, Monserrat y Adriana por todo el apoyo que me han mostrado a lo largo de estos años.

Dedicatorias

A mis padres por el amor que me han dado y gracias al cual he tenido la fuerza para seguir mis sueños, por el apoyo que me han dado desde que decidí estudiar Biología y no una carrera convencional.

A mis hermanas Patricia y Estefanía por su cariño y amistad más allá de los lazos de sangre que nos unen.

A mis sobrinos Larissa e Isaac por la fuerza que me han mostrado tener en momentos difíciles de la vida.

A la familia Portillo González por apoyarme siempre que lo necesité, en especial a mis hermanas Lalo, Lupita, Karlibeth, Pola y Nana.

A mis amigos Edmundo y Rodrigo, que en 20 años de amistad no hemos dejado de apoyarnos y aconsejarnos.

A mi tía Rocío González y a mis primas Vianey y Nayeli Zepeda por acompañarme en las dificultades.

A mis amigos de laboratorio Edson, Miguel, Ari, Lazcano, López, Pablo, Juan Pablo, Gris, Cynthia, Aby por los grandes momentos de amistad, bromas tontas y apoyo que vivimos juntos a lo largo de estos años.

Al Dr. Barbarín Arreguín Lozano por su amistad, consejos y tantas historias de sus aventuras científicas que solo inspiran a seguir adelante.

† A mi abuelo Jorge González Diez, aún escucho tus historias, nuestras conversaciones amenas a pesar de lo mucho que nuestras ideas diferían y gracias por lo mucho que creías en mí.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	6
RESUMEN	10
ABSTRACT.....	11
INTRODUCCIÓN	12
CANALES IÓNICOS.....	17
ANÁLISIS PROTEICO.....	20
ANTECEDENTES	22
DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE EN ESTUDIO.	23
OBJETIVOS	24
METODOLOGÍA.....	25
RESULTADOS:	30
MODELAJE 3D.....	37
MASS FINGERPRINT.....	41
CR-1	43
CR-12.....	44
CR-17.....	46
CR-20.....	47
DISCUSIÓN	50
CR-1	50
PERSPECTIVAS	53
BIBLIOGRAFÍA	56
ANEXO I	60
ANEXO II.....	61

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Rádula de <i>Conus</i> por microscopia electrónica de barrido. B) muestra la estructura puntiaguda y la parte abierta por donde es depositado el veneno. C) muestra la punta del diente y su forma de hipodérmica.....	14
Figura 2 Diagrama de organización de los conopéptidos, indicando la superfamilia de genes a la que pertenece, arreglo de cisteínas y blancos farmacológicos conocidos.....	16
Figura 3. Cromatograma del veneno total de <i>Conus regularis</i> en un gradiente de 0 a 60 % de solución B en 60 minutos. La flecha indica las fracciones que se purificaron para cada una de las secuencias reportadas en este trabajo.....	30
Figura 4. Cromatografía de fase reversa del pico 40 de la figura 3 en un gradiente de 20 a 50% de solución B en 60 minutos y 0.1% de TFA.....	31
Tabla 1. Mass Fingerprint del veneno de <i>Conus regularis</i> , en la columna RT se indica el tiempo de retención en minutos y la columna LC/MALDI Off-line [M+H] ⁺ la masa monocargada de los compuestos.....	33
Figura 5. Cromatografía de fase reversa de la fracción 20 en un gradiente de 0 a 30 % de Acetonitrilo al 0.1% de TFA.....	34
Figura 6. Secuencia de aminoácidos de la RsXXVIA.....	34
Figura 7. CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment of ω -conotoxins.....	35
Figura 8.- Relación dosis-respuesta de la inhibición de la corriente de Ca ²⁺ por la RsXXVIA de <i>C. regularis</i> . (A) Superposición de la corriente de calcio bajo condiciones control contra el efecto de la RsXXVIA aplicada a distintas concentraciones. (B) Calculo de la dosis media efectiva EC ₅₀ de la RsXXVIA.....	35
Figura 9. A) Pulsos empleados para los registros electrofisiológicos 1.- corriente normal de calcio(Ca ²⁺), 2.- efecto de la conotoxina sobre la corriente de Ca ²⁺ , 3.- corriente de calcio después del lavado de la toxina, 4.- efecto del Cadmio (Cd ²⁺) sobre la corriente de Ca ²⁺ . B) Porcentaje de inhibición de los canales de Ca ²⁺ con Cd ²⁺ , conotoxina y su recuperación después del lavado (wash). C) registros electrofisiológicos correspondientes al grafico 1.- corriente normal de calcio(Ca ²⁺), 2.- efecto de la conotoxina sobre la corriente de Ca ²⁺ , 3.- corriente de calcio después del lavado de la toxina, 4.- efecto del Cadmio.....	36
Tabla 2. Conectividades entre las Cisteínas involucradas en la formación de los puentes S-S.....	38
Tabla 3. Modelos con sus respectivas estabilidades energéticas de menor a mayor energía.....	39
Figura 10. Modelo C12 mostrando a los aminoácidos clave en la conformación de bola y bastón.....	40
Figura 11. Modelo C6 mostrando a los aminoácidos clave en la conformación de bola y bastón.....	41

Figura 12. Cromatografía de fase reversa del veneno total de <i>Conus regularis</i> en un gradiente de 0 a 60 % de Acetonitrilo al 0.01% de TFA.....	42
Figura 13. Secuencia de aminoácidos de la CR1.....	43
Tabla 4. Comparación de la CR1 en el ConoServer.....	43
Tabla 5. Comparación de la CR1 en el NCBI.....	44
Figura 14. Ensayos de FLIPR sobre células de neuroblastoma de la línea SH-SY5Y.....	45
Figura 15. Secuencia de aminoácidos de la CR12.....	45
Figura 16. Secuencia de aminoácidos de la CR17.....	47
Figura 17. Alineamiento de la CR17.....	47
Figura 18. Secuencia de aminoácidos de la CR20.....	48
Tabla 6. Análisis de la CR20.....	48
Tabla 7. Análisis de la secuencia señal de CR20.....	49

ABREVIATURAS

MALDI: Matrix assisted laser desorption ionization (ionización laser, asistida por una matriz).

TOF: Tiempo de vuelo (por sus siglas en inglés Time of fly).

TFA: Acido trifloro acético (por sus siglas en inglés Trifluoroacetic acid)

ESI: Electrospray Ionization (Ionización por electrospray).

DNA: Desoxiribonucleic acid (Ácido Desoxirribonucleico).

PTM's: Post-translational Modifications (Modificaciones Postraduccionales).

hPa: hectopascales.

pI: Punto isoeléctrico.

ACN: Acetonitrilo.

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

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía de alta resolución).

CID: Collision 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 rápido de átomos).

ICAT: Isotope Code Affinity Tag.

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

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

Na^+ : Ion Sodio.

K^+ : Ion Potasio.

GMPC. Guanidina mono fosfato cíclico.

Na₂GTP: trifosfato de guanosina sódico.

TR: Tiempo de retención.

RP-HPLC: Cromatografía líquida de fase reversa (por sus siglas en inglés).

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

RESUMEN

Los conos marinos son uno de los grupos de organismos más diversos dentro del ecosistema marino. Pertenecientes al género *Conus*, estos caracoles marinos cuentan con alrededor de 500 a 700 especies distintas, las cuales pueden producir entre 100 y 200 moléculas diferentes dentro de sus venenos, los cuales son producidos para defenderse y alimentarse. Cada una de estas moléculas, de origen peptídico, llamadas conotoxinas tienen un blanco fisiológico distinto, principalmente canales iónicos, transportadores y receptores de membrana. Dentro de estos blancos podemos mencionar que algunas de estas toxinas pueden afectar a canales responsables de la transmisión del dolor, provocando efectos de analgesia. Esto ha llamado la atención de los investigadores, ya que las múltiples y variadas funciones de estas toxinas podrían llegar a ser una valiosa herramienta en el desarrollo de nuevas drogas que ayudarían en el tratamiento de neuropatías o el desarrollo de nuevos fármacos contra el dolor. Estas moléculas también pueden ayudar a dilucidar el mecanismo por el cual los canales se activan o inactivan, según sea el efecto que estas ejerzan sobre ellos. La proteómica ha desempeñado un papel crucial en el estudio sistemático de estos componentes, haciendo uso de herramientas como la Espectrometría de Masas, con la cual se han dilucidado secuencias peptídicas así como las modificaciones postraduccionales que a estas afectan para su correcta función. *Conus regularis* es una especie distribuida en el mar de Cortés, de alimentación vermívora de la cual anteriormente no se tenía información. En el presente trabajo se realizó un estudio sobre los componentes más abundantes de su veneno, en particular de la toxina RsXXVIA, una toxina con una similitud muy alta con la MVIIA de *Conus magus*. Esta toxina presentó actividad sobre canales de Ca^{+} de tipo N, lo cual la colocaba como una omega conotoxina. Sin embargo, a diferencia de la MVIIA que presenta una alta afinidad por los canales de Ca de tipo N, la toxina RsXXVIA presentó una afinidad de un orden de magnitud menor. Tratando de explicar qué es lo que provoca esta baja afinidad, nos dimos a la tarea de elaborar un modelo tridimensional que nos diera información sobre la disposición espacial de los aminoácidos responsables de la actividad fisiológica, los cuales están altamente conservados dentro de las omega-conotoxinas.

ABSTRACT

The cone snails are one of the most diverse groups of organisms in the marine ecosystem. From the *Conus* genus, these carnivorous slugs have between 500-700 different species which can produce from 100 to 200 different molecules in their venoms what are made to defense or to feed themselves. Many of this molecules are peptides called conotoxins and have a specific physiological target, principal ionic channels, transporters and membrane receptors. Some conotoxins can affect channels that are involved in the pain transmission, producing an analgesic effect. This had been taken the attention of a great number of research groups, because the many different functions that these toxins have they could be valuable tools in the development of new drugs to treat neuropathologist or to design new drugs against pain. In the same way, these molecules can be used to figure the mechanism of action of the channels in the activated form or in the inactivated mode depending of the action of the toxin. The proteomics had a key role in the systematic studies of these components, using tools as the Mass Spectrometry to elucidated sequence and postraductional modifications that are the structural key in the physiological role of the toxins. *Conus regularis* is a Mexican specie distributed in the Sea of Cortés vermivorous feeding which have no previous information. In this work, we did a study of the most abundant components of the venom of this specie, the RsXXVIA a conotoxin with a high similarity to the MVIIA from *Conus magus*. This toxin showed an activity against the N-type calcium channels to figure as an omega-conotoxin but with a low affinity. In order to explain the low affinity of this toxin, we made a 3D model to have an idea of the spatial position of the key amino acid in the physiological action, which are highly preserved among the omega conotoxins.

INTRODUCCIÓN

Los animales venenosos han cautivado a la humanidad desde épocas inmemorables. En muchas culturas los animales venenosos eran venerados y considerados mágicos o con poderes curativos. Un ejemplo es el uso de productos de abeja con fines medicinales, esto está bien documentado desde el antiguo Egipto [1, 2] y está reportado en la historia de Europa y Asia. De igual forma existen registros de que personajes como Iván el Terrible y Carlomagno hacían uso de la picadura de abeja para tratar problemas de articulaciones. En muchas culturas antiguas, por miles de años se tuvo la creencia de que la serpiente tenía poderes curativos. De hecho desde la antigua Grecia hasta nuestros días es el símbolo de la medicina, asociado a Asclepius, el Dios Griego de la medicina. Igualmente se sabe que en la medicina tradicional china es común el uso del veneno de serpiente y de alacranes, incluso en historias de la tradición Islámica se cuenta que ante la ausencia de medicina para tratar un mal, el personaje Muhammed ill permitía el uso de veneno de serpiente para el tratamiento de los enfermos [2].

Hoy en día, estas prácticas aún siguen vigentes y la investigación sobre el uso de estos venenos con propósitos terapéuticos se ha llevado a cabo de manera sistemática desde el principio del siglo XX [1].

Estos organismos, a lo largo de millones de años han desarrollado un cóctel de moléculas biológicamente activas con blancos fisiológicos muy diversos de entre los cuales destacan los canales iónicos y la proteínas G acopladas a receptores. Estas moléculas son de origen peptídico y no peptídico. Los péptidos encontrados en estos venenos se encuentran en un rango de pesos moleculares que van de 1 hasta 10 kDa.

Evolutivamente la elaboración de una herramienta tan sofisticada les ha brindado a estos organismos habilidades muy particulares para poder interactuar con su medio y ocupar un nicho en ecosistemas muy competitivos [3].

Esta magnífica estrategia de defensa y ataque ha sido adoptada por casi todos los grupos de organismos; peces, reptiles, anfibios, mamíferos, artrópodos, moluscos etc.

En un principio, este interés se enfocó en la elaboración de antídotos contra el envenenamiento por la interacción con estos organismos, ya que algunos de éstos como arañas, alacranes y víboras ocasionan problemas de salud pública [1] como alergias,

intoxicación o pueden resultar en infecciones. Dependiendo de qué tipo de veneno produzca el animal en cuestión, esto podría causarle a la víctima problemas hematológicos como coágulos, infarto y la muerte o anemia provocada por hemorragia y sobre tejido nervioso causando parálisis o secuelas neurales [4] o la necrosis del tejido afectado.

En la actualidad estos grupos de organismos han captado la atención de muchas líneas de investigación debido a la gran cantidad de moléculas biológicamente activas, que estos organismos presentan dentro de sus venenos y a su potencial para el desarrollo de nuevos fármacos [5-7], uno de los ejemplos más citados es el de la conotoxina MVIIA, extraída de un caracol marino del género *Conus* (*Conus magus*).

Los conos son caracoles marinos que pertenecen al género *Conus*. Este particular grupo de organismos han sido el foco de las investigaciones los últimos 30 años debido en gran parte a la publicación de la ω -conotoxina MVIIA también llamada Ziconotide o Prialt [6]. Esta conotoxina es el único inhibidor de canales de Ca^{+} de tipo N aprobado por la FDA para su uso en pacientes que no responden al tratamiento con opiáceos. La MVIIA es 100 veces más efectiva que la morfina sin los efectos adversos como disnea, somnolencia, nistagmo o ataxia. Cuenta con 25 aminoácidos de longitud y está estabilizada con 3 puentes de disulfuro [8-10].

Los primeros reportes de envenenamiento a causa de estos organismos, datan de mediados del siglo XIX y principios del siglo XX, esto ocasionado por la manipulación de estos gasterópodos, por parte de coleccionistas de conchas marinas. Es por parte del Dr. Hermitte que se hace una descripción del proceso de envenenamiento de un individuo por picadura de un *Conus geographus*, la especie más venenosa de este género [11].

Se trata de uno de los grupos de organismos más diversos, conteniendo en este género entre 500 y 700 especies distribuidas en todo el mundo, las cuales habitan en aguas tropicales mayoritariamente. Sin embargo, existen algunas especies que han colonizado aguas frías como las del Mediterráneo [12].

Este género apareció relativamente de forma reciente en el registro fósil, con su registro más temprano en el Eoceno (de 54.8 a 40 millones de años atrás). Se cree que posiblemente la extinción masiva, que ocurrió al final del Mesozoico (65 millones de años atrás) dio una oportunidad ecológica a un nuevo taxón para establecerse y posteriormente proliferar. Probablemente la extinción de los ammonites, moluscos predadores altamente especializados, proveyó la oportunidad de radiación de un nuevo género de caracoles depredadores [13, 14].

Estos organismos cuentan con 50 millones de años de evolución y en este proceso han elaborado una compleja mezcla de péptidos farmacológicamente activos dentro de su veneno. Estos péptidos son usados por los conos para capturar a sus presas, las que generalmente pueden moverse mucho más rápido que estos cazadores, por lo que la acción de estos debe de ser rápida y eficaz. Sin embargo el uso del veneno no está restringido a la captura de su presa. El veneno también es usado como defensa contra posibles predadores o bien en la competencia por ocupar un nicho ecológico contra otras especies de este género [15]. De acuerdo a su alimentación los conos marinos pueden ser clasificados en tres grupos; piscívoros (que se alimentan de peces) molusquívoros (que se alimentan de moluscos) y vermívoros (que se alimentan de gusanos)[16]. Los péptidos producidos en el veneno de los conos son conocidos coloquialmente como conopéptidos si en su estructura forman uno o cero puentes disulfuro o como conotoxinas si presentan dos o más puentes disulfuro [17].

Durante la captura de sus presas, los conos arman a su probóscide con un diente radular modificado en forma de arpón (Fig. 1), el cual se proyecta hacia su presa. El veneno es inyectado por medio del arpón e inmediatamente después la presa se paraliza por efecto de las toxinas contenidas en el veneno [6, 18].

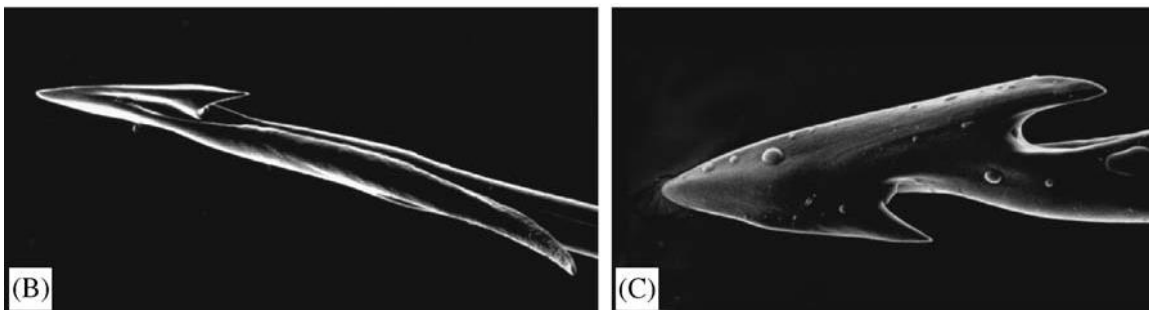


Figura 1. Rádula de Conus por microscopia electrónica de barrido. B) muestra la estructura puntiaguda y la parte abierta por donde es depositado el veneno. C) muestra la punta del diente y su forma de hipodérmica [18].

De acuerdo a su dieta, los conos han desarrollado distintas técnicas de captura, y una de las que mejor se conoce, es la empleada por los piscívoros, los cuales pueden ser divididos en dos grandes grupos, los cazadores con “gancho y línea” y los “cazadores de red”. El modo en que actúan las toxinas de estos organismos consta de dos fases:

Primero las toxinas que actúan híper-excitando la zona de inyección del veneno, mientras que un segundo grupo de toxinas suprime el circuito motor de la presa. El primer grupo que actúa dando un choque excitatorio, requiere de la combinación de péptidos que actúan inhibiendo el cierre de canales de Na^+ , lo que provoca el incremento de la entrada de este ión y un segundo grupo de toxinas que bloquean ciertos subtipos de canales de K^+ , impidiendo la salida de este ión. Esto provoca una despolarización masiva del circuito neuronal en el momento de la inyección del veneno, lo cual provoca el aturdimiento del pez.

Un segundo grupo de toxinas que actúan de manera sinérgica en el mismo veneno, consiste en toxinas que bloquean la transmisión neuromuscular. Se ha descrito que estas toxinas tienen un efecto sobre canales presinápticos de Ca^+ , inhibiendo la liberación de neurotransmisores. También actúan de manera competitiva y no competitiva sobre receptores de acetil colina (AcChRs), lo que previene la despolarización de la placa muscular. Esto inhibe el potencial de acción muscular, provocando la parálisis del pez [15].

Se estima que estos organismos pueden producir en su veneno, de 50 a 200 distintas moléculas, cada una con un blanco fisiológico específico. Con estos datos se ha calculado que potencialmente dentro de éste género se encuentran aproximadamente entre 50,000 y 100,000 distintas moléculas biológicamente activas, de las cuales hasta el momento se tiene conocimiento de solo el 0.2% del total de éstas [6, 12, 18, 19].

Las conotoxinas tienen una longitud promedio de 10-50 aminoácidos (aa) y muchas están estabilizadas por dos o tres puentes disulfuro, pero algunas, aunque en menor número, tienen cuatro o cinco enlaces de este tipo [20].

De igual forma, una de las características más notables de estas moléculas, es que presentan modificaciones postraduccionales muy variadas, las cuales están altamente relacionadas con su función farmacológica. Dentro de éstas podemos mencionar algunas

como: hidroxilaciones, bromaciones, glicosilaciones, amidaciones, bloqueo de N-terminales, entre otras. Estos péptidos pueden ser clasificados en dos grandes grupos: 1) los que son ricos en cisteínas y 2) los que no son ricos en cisteínas (con un puente o sin puentes disulfuro) [17, 21, 22].

Los conopéptidos se agrupan en 27 “Superfamilias” de genes [23] de acuerdo al orden de sus cisteínas y en “Familias” de acuerdo a su efecto farmacológico.

Las “Superfamilias” se han denominado con letras mayúsculas del alfabeto arábigo como A, M, O, P, S, T, e I y recientemente fueron reportadas las Superfamilias L, J, y V (Fig 2), y cuatro a las cuales no se les ha asignado una letra (conopresinas, contrifanos, conatokinas, y contulakinas) [24].

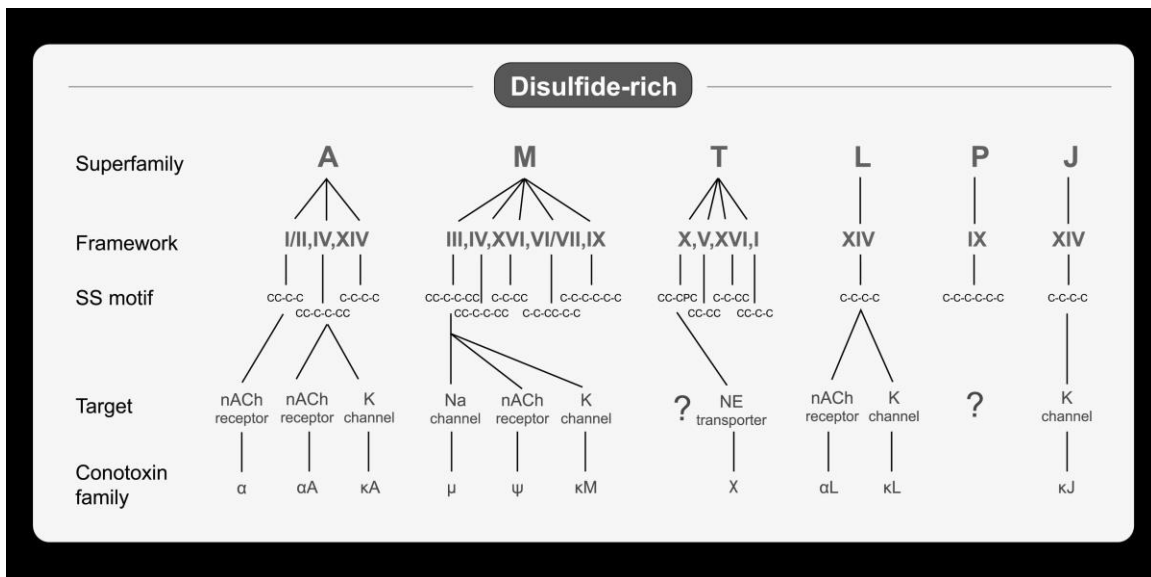


Figura 2.-Diagrama de organización de los conopéptidos, indicando la superfamilia de genes a la que pertenece, arreglo de cisteínas y blancos farmacológicos conocidos [25].

Una “Superfamilia” puede ser subdividida en varias “Familias” con actividades farmacológicas distintas. Las conotoxinas que afectan a canales dependientes de voltaje comprenden a aquellas que retardan la inactivación de los canales de Na^+ (conotoxina- δ); así como bloqueadores específicos de canales de Na^+ , K^+ y Ca^+ (conotoxinas- μ , κA -, ω -, etc.), entre otros. De igual forma, podemos encontrar péptidos que afectan a canales iónicos dependientes de ligando, como el receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) (conantokinas) y receptores de serotonina (conotoxina- σ); así como antagonistas

competitivos y no competitivos de receptores nicotínicos de acetilcolina (ACh) (conotoxinas- α y ψ respectivamente). Por otro lado, las conotulakinas y las conopresinas son agonistas de los receptores acoplados a proteínas G de neurotensinas y vasopresinas respectivamente. Las conotoxinas- ρ actúan como antagonistas de receptores adrenérgicos α_1 [5, 6, 18].

Es importante remarcar que muchos péptidos del veneno producido por el género *Conus* pueden contener en su estructura el mismo arreglo de cisteínas, sin embargo sus blancos fisiológicos pueden ser muy diferentes. Tal es el caso de los péptidos pertenecientes a la “Superfamilia A”, en la que podemos encontrar péptidos que afectan tanto a canales de K^+ y receptores de ACh, donde el orden de sus cisteínas es el mismo. Por otro lado, podemos observar que las conotoxinas- κ y κA , que pertenecen a las “Superfamilias” O y A respectivamente, afectan a canales de potasio y sus cisteínas se encuentran en un orden completamente diferente [19].

La selectividad única de los conopéptidos por sus distintos blancos fisiológicos puede ser conferida por la organización estructural de sus enlaces disulfuro, la variabilidad de sus asas y el arreglo espacial de los grupos funcionales en su estructura tridimensional. Es importante notar que, si bien, podemos encontrar en el veneno de un sólo Cono más de un péptido de la misma “familia”, como por ejemplo las α -conotoxinas que afectan a receptores nicotínicos de ACh, estas conotoxinas pueden diferenciar entre subtipos de receptores, como por ejemplo, neuromusculares (nm-nAChr) y receptores neurales (n-nAChr) [26]. Debido a las características mencionadas, las conotoxinas se han convertido en importantes herramientas de investigación dentro de las neurociencias [27] como se explicará a continuación.

CANALES IÓNICOS

Las células, mediante su bicapa lipídica impiden el libre paso de los iones intracelularmente y extracelularmente, y éstos encuentran su entrada mediante proteínas de membrana, bombas y canales iónicos. Los canales iónicos son proteínas transmembranales formadoras de poros que ayudan a establecer un gradiente de voltaje a

través de las membranas plasmáticas de todas las células por medio del paso selectivo de iones a través de la membrana [28]. Estas juegan un papel muy importante en el proceso de señalización de células excitables y no excitables. Se han clonado diversos canales iónicos, por ejemplo, 40 distintos tipos de canales de potasio dependientes de voltaje y diez canales de calcio dependientes de voltaje [29].

Uno de los ejemplos sobre los cuales enfocaremos nuestra atención serán los canales de Ca^+ dependientes de voltaje debido a la relevancia que estos han tomado para esta tesis debido al reporte de una toxina por parte de nuestro grupo [30]. Estos canales son proteínas heteroméricas que cuentan con cinco subunidades; una subunidad formadora del poro $\alpha 1$ y cuatro subunidades auxiliares pequeñas (β , $\alpha 2$, δ y γ). La subunidad $\alpha 1$ es la más importante para estos canales ya que su expresión es necesaria para la función de la proteína. La subunidad $\alpha 1$ está compuesta de cuatro dominios homólogos, cada uno con seis segmentos transmembranales, los cuales forman el poro del canal. Se han descrito diez distintas subunidades $\alpha 1$ y es la expresión de estas subunidades lo que da la clasificación de los canales de Ca^+ dependientes de voltaje (L, N, P/Q, R, y T). En la subunidad $\alpha 1$ cuenta con el filtro de selectividad para Ca^+ y el sensor de voltaje. Las subunidades auxiliares en estos canales ayudan a la expresión, estabilidad de la conformación y el tráfico de la subunidad $\alpha 1$ dentro de la bicapa lipídica [10].

Una de las características más importantes de los canales iónicos es su selectividad. Por ejemplo, los canales de calcio dejan pasar iones calcio selectivamente, pero no dejan pasar iones potasio. De manera similar ocurre con los canales de sodio, donde solo pueden pasar iones Na^+ [29]. La velocidad en que este proceso ocurre es de entre 1,000,000 a 100,000,000 de iones por segundo. La mayor parte de los canales iónicos, son capaces de hacer cambios conformacionales de apertura a inactivación. La apertura y cierre de estos canales, puede ser inducida mediante ligandos extracelulares, segundos mensajeros intracelulares, metabolitos, interacciones proteína-proteína, fosforilaciones y otros factores, además del voltaje que regula el funcionamiento de muchos canales iónicos. El mal funcionamiento de cualquier mecanismo de acción de los canales se traduce en patologías y dependiendo del tipo celular donde se localice el mal funcionamiento, esto determinara la gravedad de la patología. Estas patologías pueden abarcar desde el movimiento involuntario o torpe del cuerpo hasta alucinaciones

auditivas, epilepsia, estadios febriles [31], incluso la transmisión de dolor sin la presencia de un estímulo de daño [32] o la falta de dolor ante un estímulo doloroso [33]. En el mismo sentido podemos mencionar afecciones gastrointestinales, como anomalías en secreciones, motilidad, absorción e incluso el desarrollo del síndrome del intestino irritable por el mal funcionamiento de canales de Na^+ [34], cardiopatías asociadas al mal funcionamiento de estos mismos canales como el síndrome del QT largo, de Brugada incluso el síndrome de muerte de cuna [35]. Hasta el momento se han identificado diez genes de canales iónicos los cuales se han relacionado como causales de enfermedades hereditarias [28] como la muerte súbita, síndromes arrítmicos o el mismo síndrome de Brugada [36].

Se han descrito múltiples patologías asociadas al mal funcionamiento de canales iónicos, dentro de las cuales destacan el síndrome del QT largo, ataxia, excitación anormal [29], entre otras. Estas patologías pueden afectar al sistema motor del cuerpo debido a una mala comunicación sináptica en la placa neuromuscular. De igual manera, estas mutaciones pueden afectar de manera significativa al individuo en su desarrollo neural, si estas mutaciones se presentan en canales expresados en células del sistema nervioso central (SNC). Por otra parte el mal funcionamiento de canales iónicos no es exclusivo de mutaciones hereditarias, también puede ser provocado por otra patología o daño externo a tejido nervioso [29].

En consecuencia, el estudio de las toxinas y sus efectos sobre blancos fisiológicos específicos, no es únicamente para encontrar antídotos contra los efectos de envenenamiento como se ha realizado desde hace muchos años. La especificidad de estas moléculas nos ha abierto la visión de nuevas líneas de investigación, en las cuales, las toxinas funcionan como herramientas moleculares que permiten la evaluación y comprensión de mecanismos de acción de los distintos tipos de canales iónicos dependientes de voltaje, dependientes de ligando, receptores, transportadores, entre otros [5, 37].

ANÁLISIS PROTEICO

Ya que estas toxinas tienen una naturaleza peptídica, se han hecho necesarias herramientas bioquímicas para su estudio, como son las utilizadas por la proteómica.

Durante todo el siglo XX, los avances en investigación biomédica se enfocaron en la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan a la salud pública. Sin embargo, las epidemias actuales como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), tuberculosis, y malaria, aunado a nuestra inhabilidad para tratar enfermedades crónicas como Alzheimer o esclerosis múltiple, nos hacen ver que nuestra comprensión sobre la biología de estas enfermedades es incompleta. Esto se debió a que los investigadores no tenían la oportunidad de investigar la compleja relación entre proteínas y genes a un nivel genómico [38].

Desde la publicación del genoma humano, el esfuerzo por secuenciar la mayor cantidad de genomas de distintos organismos ha sido exhaustivo, así como la de organismos infecciosos para comprender mejor enfermedades de importancia en la salud pública. Obtener una secuencia de DNA nos puede dar idea del posible producto final de un gen determinado, una “proteína madura”, así como los posibles sitios donde ésta podrá sufrir modificaciones co- y post-traduccionales (PTMs por sus siglas en inglés Postraductional Modifications), pero no podrá decirnos en qué momento se producirán o si estas modificaciones realmente se llevarán a cabo para dar como resultado una proteína funcional o relacionada con alguna enfermedad [39, 40]. Simplemente esto último solo se podrá determinar analizando el producto final del “genoma”, el “proteoma” o “peptidoma” de una línea celular u organismo. La proteómica es el estudio de todo o de las partes del complemento proteico de los genes de un organismo. Comúnmente se involucra al análisis de muestras complejas de péptidos y/o proteínas [41-43].

En las últimas tres décadas, el estudio de mezclas proteicas derivadas de distintas fuentes ha sido el objeto de diversos proyectos de investigación. Esto ha sido posible mediante los distintos métodos de separación, determinación de secuencia y estructura. La piedra angular en el estudio de mezclas proteicas son los geles de poliacrilamida bidimensionales (2D-PAGE), técnica que utiliza tanto los pesos moleculares como las cargas de las moléculas de la mezcla para una eficiente separación de las proteínas. Estos estudios nos proveen de un amplio panorama de la diversidad molecular con la que nos

enfrentamos, mostrada en las motas del gel. Debido a la gran cantidad de proteínas que pueden ser extraídas de un medio ($\sim 10^6$) y a que el mejor gel bidimensional solo podrá resolver aproximadamente 1000 proteínas, solo las proteínas más abundantes podrán ser visibles [42].

Los métodos que se han empleado para la separación de péptidos de manera individual, han hecho uso de estrategias a través de las cuales se toman en cuenta características fisicoquímicas como el tamaño, carga e hidrofobicidad de las moléculas. Las mismas técnicas de separación que se utilizan para la separación de péptidos, se encuentran disponibles para la separación de proteínas. El uso de distintas técnicas cromatográficas como la exclusión molecular, intercambio iónico y fase reversa, son las técnicas a las que comúnmente se recurre en la purificación de péptidos en proteómica. El uso de la cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC) puede ser usada como paso único de separación de péptidos, previo a análisis por espectrometría de masas. La fase reversa tiene particular importancia, ya que esta última se ha podido acoplar de manera importante a experimentos de espectrometría de masas con una fuentes de ionización de tipo electrospray (ESI por sus siglas en inglés) [43].

Todos estos métodos de separación, junto con los estudios de secuenciación tanto por degradación automática de Edman, como por espectrometría de masas, son la base en el estudio de los distintos proteomas. Esta última ha cobrado gran importancia en las últimas dos décadas; sus dos modos de ionización de proteínas, Ionización Laser Asistida por Una Matriz (MALDI) y ESI, no solo nos dan información de la secuencia lineal de proteínas en estudio, sino que también podemos obtener información sobre las modificaciones postraduccionales (PTM's) que estas presenten en su secuencia [41, 43]. La espectrometría de masas se ha convertido en parte central en el estudio de mezclas complejas de proteínas y/o péptidos a una gran escala, dando como resultado perfiles definidos de la producción proteica de un organismo o línea celular [41], como sería el caso de los venenos producidos por animales, de los cuales se obtiene poco material, el cual es altamente modificado pos-traduccionalmente [6, 7]. A este último campo de estudio y en pleno auge de todas las "Omicas" u "Omas" y su papel en la comprensión de las funciones de la enorme cantidad de productos metabólicos tanto de líneas celulares en particular, como de un organismo completo, se ha acuñado en los últimos años el término

“Venómica”. Esto se refiere al estudio sistemático de los genes y productos genéticos de animales venenosos [44]. Debido a que una gran cantidad de investigaciones alrededor del mundo, han demostrado que los animales venenosos pueden fungir como una gran fuente de moléculas biológicamente activas [6], y debido a las actividades farmacológicas tan particulares de cada una, se ha propuesto que estas podrían ser herramientas para el diseño de fármacos o la producción sintética de estos productos para su uso en la industria farmacéutica [2, 3, 45].

ANTECEDENTES

En los últimos años el estudio de toxinas de diversas especies de artrópodos, reptiles y moluscos ha adquirido gran relevancia, debido a la gran variedad de blancos fisiológicos que estas moléculas presentan. El veneno de los animales ha tenido una evolución funcional, permitiendo que los organismos que los producen se adapten a su medio, ya sea defendiéndose de sus predadores o alimentándose de otros organismos.

El veneno contiene moléculas especializadas en la parálisis de la presa atacando al sistema nervioso, modulando la generación y propagación de potenciales de acción en varios sitios moleculares, como axones, neuronas, uniones neuromusculares o sinapsis. Esto nos revela la importancia que estos componentes tienen como herramientas moleculares en el estudio del mecanismo por el cual funcionan sus blancos, los cuales tienen un papel muy importante en procesos fisiológicos o en procesos patológicos [7].

Por lo antes mencionado y debido a la poca información acerca de las toxinas que producen la mayor parte de las especies del género *Conus*, se hace necesaria la investigación sistemática de cada uno de los venenos de las especies contenidas en este género. De esta manera se escogió a una especie de las cuales no se tiene ninguna referencia, o es poca en la literatura, y la cual se encuentra distribuida en el Golfo de Baja California (*Conus regularis*) para realizar el estudio de los componentes presentes en su veneno. Por ello nos dispusimos a caracterizar los componentes de mayor abundancia dentro del veneno de esta especie.

Las conotoxinas tienen una gran selectividad por su blanco, pueden diferenciar entre varios subtipos de canales, y por ello se han vuelto herramientas de estudio en neurociencias. Estas toxinas también han mostrado ser útiles para el tratamiento terapéutico de dolor crónico, como es el caso del “Ziconotide”, un péptido sintético originalmente aislado del veneno del *Conus magus*, el cual se ha visto que bloquea los canales de calcio de tipo N, teniendo como efecto la analgesia (Patente registrada en la Unión Americana con el número US 7265244) y la cual ya se utiliza en pacientes con dolor crónico. Este efecto es muy similar al inducido por la morfina, con la ventaja de que este péptido no produce los efectos adversos secundarios de la adicción [9].

Al igual que éste, muchos otros péptidos derivados del veneno de los caracoles marinos del género *Conus* son blanco de estudio ya que su gran selectividad por los canales iónicos los hacen potenciales fármacos terapéuticos para combatir neuropatías ligadas al mal funcionamiento de los canales, como por ejemplo, dolor crónico [10] y epilepsia [6]. Debido a la gran oportunidad que estas toxinas nos ofrecen en el desarrollo de nuevos fármacos y al reducido conocimiento que se tiene sobre la variedad de toxinas que estos organismos producen, se hace necesaria la investigación sobre los componentes que estos animales nos ofrecen para tratar de entender la naturaleza y el mecanismo de acción de enfermedades que aquejan a la humanidad [5, 15, 46].

DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE EN ESTUDIO.

Conus regularis: Esta especie se encuentra reportada en el Golfo de California. Su tamaño va desde los 2.5 a los 4 cm de longitud. Se le encuentra en aguas someras, bajo o alrededor de rocas o coral, zona intermareal a 1.5 metros de profundidad. Es de hábitos carnívoros, alimentándose de gusanos (vermívoro). De forma cónica y espiral poco elevada.

HIPÓTESIS

Debido a que antes de este trabajo no se tenía ningún reporte sobre el veneno que esta especie produce, sabíamos que cada una de los péptidos obtenidos tendría una secuencia única. Lo cual nos daría un reto muy importante para definir los blancos fisiológicos a escoger para determinar su actividad. Sabemos que *Conus regularis* presenta una dieta vermívora, por lo que el veneno de estos organismos no es toxico para mamíferos, ya que se sabe que los conos más tóxicos para mamíferos son los que se alimentan de peces. Por esta razón y tomando en cuenta la cantidad de veneno con la que se contaba, no se realizaron pruebas de toxicidad en ratones.

OBJETIVOS

Objetivo general.

Aislar, purificar y caracterizar bioquímicamente los componentes más abundantes del veneno de *Conus regularis*, así como determinar la función farmacológica de los componentes más abundantes del veneno del *Conus regularis*.

Objetivos particulares.

- 1.- Determinar la secuencia primaria de las conotoxinas más abundantes mediante el uso de la degradación automática de Edman y la técnica usada por espectrometría de masas conocida como disociación inducida por colisión (CID por sus siglas en inglés).
- 2.- Determinar las modificaciones postraduccionales presentes en los péptidos más abundantes en el veneno de *Conus regularis*.
- 3.- Evaluar la función fisiológica de los compuestos más abundantes del veneno.

METODOLOGÍA

Recolección.

Los organismos fueron colectados en el Golfo de California. Se procesaron y se les extrajo el veneno en el laboratorio del Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro del Laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas, Departamento de Biotecnología Marina, C.I.C.E.S.E.

Obtención del veneno.

Se extrajo el ducto venenoso de los individuos colectados. El ducto extraído a 4 °C, se dispuso en un tubo de 1 mL y tratado como lo describe Romero et al. [12]. La parte soluble en agua se liofilizó para experimentos de separación.

Procedimiento de aislamiento.

Las soluciones empleadas para los experimentos de cromatografía líquida de fase reversa fueron A (agua desionizada al 0.1% de TFA) y B (acetonitrilo al 0.1% de TFA).

El veneno liofilizado se sometió a separación en una columna C₁₈ analítica de fase reversa MERCK (Darmstadt, Germany), con un gradiente lineal de 0 a 60% de acetonitrilo (ACN) al 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA), en 60 min.

Una vez obtenidas las masas y verificando la pureza de las fracciones más abundantes dentro del veneno, se procedió a la secuenciación de estos productos.

Determinación de la secuencia de aminoácidos.

La secuencia de aminoácidos fue obtenida por espectrometría de masas y confirmada por degradación automática de Edman en un secuenciador de proteínas automático con fase gaseosa (LF-3400D TriCart with high sensitivity chemistry; Beckman Coulter, Fullerton, USA), con muestras de aproximadamente 1 nmol de cada toxina nativa (Edman, 1960) [47]. Todos los experimentos de MS/MS se realizaron en un espectrómetro de masas SYNAPT G2 HDMS, con fuentes de ionización por nanoelectrospray. Todos los datos se analizaron en el procesador MassLynx (Waters Corp., Milford, MA, USA). Los Parámetros usados para la obtención de datos fueron: un voltaje del capilar de 1.85 kV, la

colección de datos se ajustó a 40 V y la temperatura de la fuente se fijó a 100 °C. La presión de Argón (Ar) en la trampa de iones de guía de onda viajera (TWIG-trap) y la onda de transferencia de iones guía (TWIG-transfer) fue de 2.44×10^{-2} y de 2.61×10^{-2} mbar, respectivamente. La amplitud, velocidad de onda y la presión del nitrógeno de la de la célula derivativa IM de la onda de viaje (TW) fue de 32.0 V, 850 m/s y 2.96 mbar, respectivamente. Las muestras fueron inyectadas directamente al espectrómetro de masas en un flujo de 0.5 a 0.8 $\mu\text{l}/\text{min}$. Todos los datos de IM-MS fueron colectados en periodos de 2 minutos. Todos los experimentos de fragmentación se condujeron por medio de colisiones con Argón. La energía de colisión de CID fue ajustada para cada péptido y su carga. El voltaje de la trampa de colisión generalmente se encuentra en un rango de 23 a 50 V.

MALDI-TOF - La determinación de las masas moleculares exactas de los péptidos puros y semi-puros, así como la determinación del número total de compuestos presentes en los venenos, fueron realizadas en un espectrómetro de masas del tipo MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight) con sistemas de análisis iónico de tiempo de vuelo lineal y con el reflector (Ion mirror). Las fracciones fueron reconstituidas con una solución de H₂O: ACN: TFA (50:50:0.1) a concentraciones en el orden de nano- a femtomolares. Para la formación de los cristales, 0.5 μl de la muestra fue mezclada con 1.0 μl de la matriz en concentración micromolar y depositadas en placas de acero inoxidable a temperatura ambiente hasta la evaporación completa y simultánea formación de los cristales. Diferentes matrices fueron utilizadas, (los ácidos orgánicos dihidroxibenzoico-DHB y alfa-ciano hidroxicinámico-CHC son los más comunes) dependiendo del rango de masa molecular del péptido sometido a análisis. Para la ionización de la muestra se utilizaron pulsos de láser con fuente de nitrógeno y longitud de onda de 337 nm. La duración, la intensidad y el número de pulsos se ajustaron dependiendo de la matriz utilizada y de la facilidad de ionización de la muestra, la cual está directamente relacionada con la estructura química de las moléculas. Las señales detectadas fueron almacenadas y analizadas a través del programa Voyager versión 5 acoplado al programa Data Explorer.

Búsqueda de alineaciones con secuencias de proteínas, específicamente toxinas reportadas en la literatura.

Las comparaciones de secuencia se realizaron a través del programa de análisis FASTA en los bancos de datos de proteínas (PDB) SWISSPROT, NCBI y CONOSERVER.

Ensayos Electrofisiológicos

Los ensayos electrofisiológicos se realizaron mediante la técnica de “Patch Clamp” como lo describe Hamill et al. [48]. Las células que se emplearon para estos ensayos fueron neuronas SCG. Estas células fueron disociadas enzimáticamente y obtenidas de ratas Wistar de 5 semanas. Los animales fueron manipulados de acuerdo a los procedimientos aprobados por la Norma Oficial Mexicana NOM 0062-ZOO-1999, denominada especificaciones técnicas para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Después de la disección, los ganglios fueron rebanados en 8 a 10 piezas y transferidos en una solución de Hank modificada, que contenía 20 U/ml papaína.

Registros electrofisiológicos sobre canales de Ca^{2+}

Las neuronas fueron constantemente bañadas (1-2 ml/min) con una solución diseñada para aislar a los iones que fluyen a través de los canales de calcio dependientes de voltaje de tipo N (Cav2.2). La corriente de los canales de Calcio Cav2.2 fue definida como el componente de la corriente sensible a 100 μ M de Cd^{2+} en presencia de 5 μ M nifedipina. La solución que se usó para bañar a las células contenía (en Moles) 160 de NaCl, 2.5 KCl, 10 HEPES, 8 glucosa, 5 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 0.0002 TTX. Se ajustó a pH de 7.4 con NaOH. La solución interna, contenía (en moles) 140 de CsCl, 20 TEA-Cl, 10 HEPES, 0.1 BAPTA4Cs, 5 $MgCl$, 4 mg ATP, 0.3 guanósín trifosfato (Na_2GTP) y 0.1 de leupeptina. Esta solución fue ajustada a un pH de 7.2 con CsOH. Para las pruebas de toxicidad, el péptido RsXXIVA se alicuotó con agua destilada en una solución estándar a 30 μ M, así como en diluciones de 0.03, 0.3, 3 y 24 μ M para los registros con la solución externa previamente para su uso. La toxina fue aplicada localmente por una bomba de infusión Eppendorf 5246 y un micromanipulador 5171 (Eppendorf, Madison, WI), desde una pipeta larga de borosilicato (de 3 a 5 μ m de diámetro) localizada de 20 a 50 μ m de distancia de la membrana celular. La presión de inyección fue ajustada a 250

hectopascuales (hPa), la compensación de presión a 10 hPa, y el tiempo de inyección fue de 20 segundos. Todos los reactivos fueron adquiridos en Sigma Aldrich.

Registros de corriente y análisis de datos

Los registros de membrana fueron medidos en el modo “célula completa” de la técnica de “Patch-Clamp”, usando un amplificador EPC-9 (HEKA Instruments) y pipetas de borosilicato con una resistencia de 1-2 M Ω cuando se llena con la solución interna. Una vez que la configuración de célula completa fue estandarizada, las células fueron ajustadas a -80 mV, la capacitancia transitoria fue cancelada, y la resistencia en serie fue compensada al >70%. Los protocolos de voltaje y la digitalización de los datos fueron grabados mediante el uso del programa PULCE (HEKA Instruments).

Modelaje computacional

En colaboración con el grupo del Dr. Fernando Cortés del Instituto de Química de la UNAM y con el fin de explicar las diferencias en cuanto a la actividad que presentó la conotoxina RsXXVIA en comparación con la MVIIA se modelaron 12 arreglos de cisteínas, teniendo como antecedentes que la primera cisteína está enlazada a la quinta y que las cisteínas contiguas en conotoxinas (Cisteínas 7 y 8 en la secuencia primaria de RsXXVIA) no forman puentes de disulfuro.

Cada una de las combinaciones anteriores se sometió a un modelado por homología con el servidor I-Tasser. Este servidor utilizó como molde la estructura tridimensional contenida en el archivo del Protein Data Bank con código 1HY9, para generar los modelos tridimensionales de cada combinación [49-51]. Los doce modelos obtenidos únicamente tenían las cisteínas en una posición cercana, sin formar los enlaces disulfuro correspondientes. Para la formación de los enlaces disulfuro se utilizó el programa VMD, que también sirvió para añadir hidrógenos al péptido, solvatarlo y neutralizar la carga +3 debida a la protonación.

Para cada sistema peptídico solvatado y neutro obtenido para cada combinación se realizó una minimización de 100 pasos y una dinámica molecular de 2500 pasos a una temperatura de 310 K.

Se utilizó el programa Discovery Studio 3.5 para visualizar los modelos de las secuencias lineales obtenidas por degradación automática de Edman y/o por espectrometría de masas.

Todas las estructuras de las combinaciones antes señaladas se sometieron a otro estudio de dinámica molecular que consistió en el siguiente protocolo:

Paso 0.- Para cada sistema obtenido con VMD, se le realizó una minimización de 100 pasos y una dinámica molecular de 2500 pasos con el programa NAMD 2.6 con el campo de fuerza CHARMM27, a una temperatura de 310 K.

Paso 1.- La minimización de 1000 pasos fue hecha por el sistema exceptuando a los átomos del péptido.

Paso 2.- Se realizó una Dinámica Molecular de 1500 pasos a todo el sistema a 0 K.

Paso 3.- El sistema fue calentado de 0 a 310 K con 50000 pasos de DM.

Paso 4.- Se sometió el sistema al protocolo NTP durante 10 ns para reducir contactos anómalos iniciales y para evitar espacios vacíos, a una temperatura de 310 K.

Paso 5.- Finalmente se sometió el sistema al protocolo NTV con una duración de 50 ns, a una temperatura de 310 K, para obtener datos que se sometieron al análisis estructural correspondiente.

Ensayos de fluorescencia FLIPR^{TETRA} con colorantes sensibles a calcio.

Fluo-3 y Fluo-4 son los colorantes más utilizados para estos ensayos para medir cambios en la concentración intracelular de Ca⁺. Las células son cargadas con el colorante, se aplica un estímulo externo para provocar la afluencia de Ca⁺. Los colorantes se excitan a una longitud de onda de 480 nm y tiene su emisión más fuerte a 525 nm. La intensidad de la fluorescencia de estos colorantes se ve incrementada proporcionalmente al incremento de la concentración de calcio intracelular. En células no estimuladas, la concentración de

calcio intracelular oscila entre 0.1 a 0.2 μM , mientras que la concentración extracelular es de 2 mM.

Sé utilizó una placa de 264 pozos, los cuales contenían los cultivos celulares de 5H-SY5Y. En cada uno de estos pozos se utilizaron activadores y moduladores de canales en dependencia de que canal sería el objeto de estudio en un experimento en particular. Los activadores fueron KCl para canales de Cav 1.2 y Cav 1.3, Nifedipina, KCl y CaCl_2 para los Cav 2.2, PNU-120596 y colina para los $\alpha 7\text{nAChR}$, nicotina para los $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 3\beta 2$ y nAChR y Veratrina para los canales de Na^+ Nav 1.7, Nav 1.2 y Nav 1.3.

RESULTADOS:

El veneno total fue fraccionado mediante el uso de la técnica de RP-HPLC con una columna C18 analítica (Figura 3).

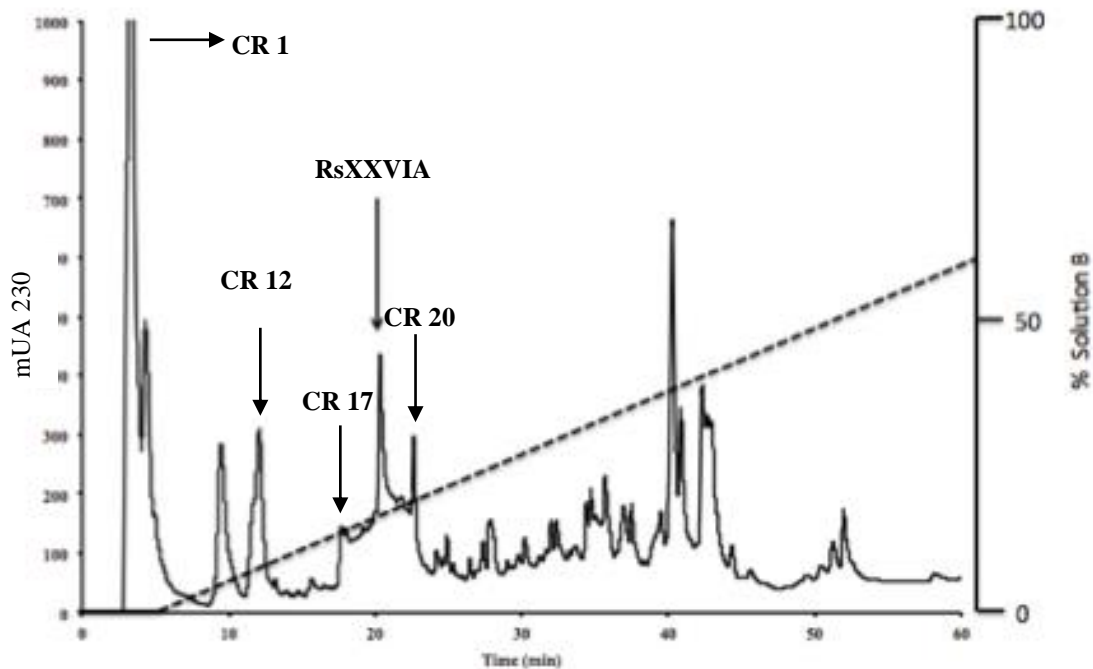


Figura 3. Cromatograma del veneno total de *Conus regularis* en un gradiente de 0 a 60 % de solución B en 60 minutos. La flecha indica las fracciones que se purificaron para cada una de las secuencias reportadas en este trabajo.

Como se puede observar en el cromatograma del veneno crudo (figura 3), las fracciones no presentaron una separación adecuada, por el contrario, se observa que muchos picos aun contienen material proveniente de picos adyacentes. Por lo cual fueron colectadas en

espacios de 10 minutos aproximadamente. Cada fracción es referida de acuerdo con el minuto en que fue colectada.

Cada una de estas fracciones, colectadas en los minutos 10, 20, 30, 40, 50 y 60 fueron liofilizadas y almacenadas a -40°C para su posterior repurificación mediante el uso de distintos gradientes de acuerdo con su tiempo de retención original en la cromatografía del veneno total.

Cada una de las repurificaciones que se realizaron arrojó como resultado de entre 4 y 10 compuestos distintos (Figura 4).

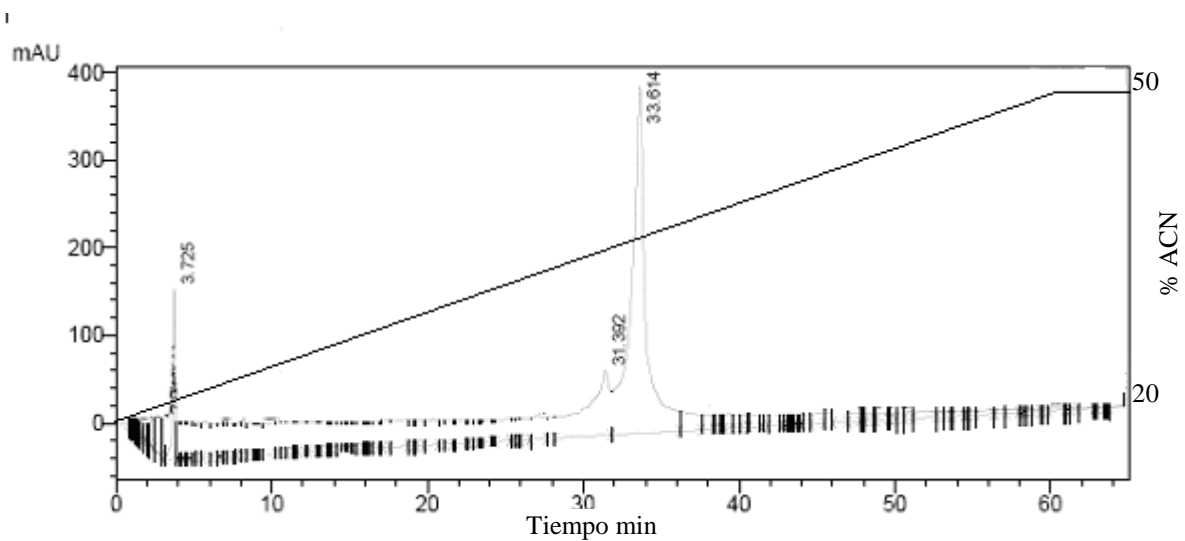


Figura 4. Cromatografía de fase reversa del pico 40 de la figura 3 en un gradiente de 20 a 50% de solución B en 60 minutos y 0.1% de TFA.

Cada uno de los picos obtenidos por repurificación fueron sometidos a experimentos de espectrometría de masas tipo MALDI para obtener el peso molecular y pureza de la fracción, tras lo cual, se procedió a determinar la secuencia por espectrometría de masas de tipo ESI-MS/MS y su confirmación por Edman.

En la figura 5 podemos observar la repurificación de la fracción colectada a los 20 min del cromatograma en la figura 3 (marcada con una flecha). Esta repurificación nos arrojó dos fracciones distintas. En la figura 5 se observa que las dos fracciones, con tiempos de retención 2.942 y 7.083 min presentan señales limpias. La segunda fracción fue examinada por espectrometría de masas y se determinó una masa de 4121.5 Da. La

misma fracción fue digerida con la endopeptidasa Tripsina y se obtuvieron fragmentos de la secuencia, por lo que pudimos obtener la secuencia completa de este péptido con la técnica de CID.

RT (min)	LC/MALDI Off-line [M+H] ⁺	RT (min)	LC/MALDI Off-line [M+H] ⁺	RT (min)	LC/MALDI Off-line [M+H] ⁺
3.065		24.045-24.361	2663.132; 3872.313 ; 4390.885; 5088.127; <u>5291.787</u>	37.703	3644.066; 5402.201; 6981.282; 8682.681; 10258.037 ; 17367.129
3.570		24.771	1645.135 ; 2293.280; <u>3872.327</u> ; 5090.446; <u>6013.501</u>	38.777	4144.316; 5403.138; 6772.251; 8647.705; 10259.520; 13551.211
4.360		25.530	1644.974 ; 2494.806; 2947.241; 3714.342; 4503.967	39.409	4240.466; 6944.489; 8491.906; 13896.792
4.992	12 KDa (posterior)	25.909-26.004	1645.026 ; 3006.316; 3715.793; 3979.466; 4515.165	40.546	
6.983	7623.592	27.057	1644.938; 2479.651 ; 2650.722; 3214.748; 3626.900	41.368	5380.773; 8337.675; 10767.505
11.817		28.468	1604.210; 2446.730 ; 3627.150; 3809.431; 3956.740; 4089.021	46.960	3581.868; 4080.445; 5166.494; 5979.121; 6537.982; 7865.478; 11582.907; 14299.684
12.417	4958.764; 5163.047; 7594.662 ; 7011.429	28.816	1464.379; 1741.441 ; 2446.920; 2554.416	47.651	3929.158 ; 5191.677; 6645.345; 8476.582; 16952.634
16.082	1416.558 ; 3912.624; 4167.174	29.321	1725.521 ; 3824.519; 4440.903 ; 4835.378	48.982	3468.527; 4503.673; 5137.817; 5919.337; 6733.309; 7409.327; 8506.673; 9554.103; 16738.000
17.283	2076.380; 2901.647; 4146.949	30.552	1451.479; 1690.652 ; 4818.831	53.88	2867.681 ; 2956.276; 3378.041 ; 19179.343
17.946	1268.275; 2079.459; 2858.149; 4150.397	31.059	1653.582; 2798.126; 4802.616		
18.547	1425.047; 1742.455; 2945.207; 4138.638 ; 4722.818	32.3293	1955.010; 2875.028; 3498.914		
19.305-19.716	4152.087 ; 5018.044	33.492	1726.621; 2875.192 ; 4022.008; 7849.571		
19.969	1425.039; 1743.267; 2945.192; 4137.952 ; 5018.591	34.218	3948.587; 5441.081; 7907.758 ; 8537.621; 10893.456; 17043.452		
22.212	2206.816; 4137.734 ; 5020.095	35.586	3391.068; 6792.614 ; 10233.717; 13583.683		
22.816	2834.491 ; 3293.361; 4121.082 (; 5018.481	36.218	6789.369; 8317.413; 8698.025		

Tabla 1.- Mass Fingerprint del veneno de *Conus regularis*, en la columna RT se indica el tiempo de retención en minutos y la columna LC/MALDI Off-line [M+H]⁺ la masa monocargada de los compuestos.

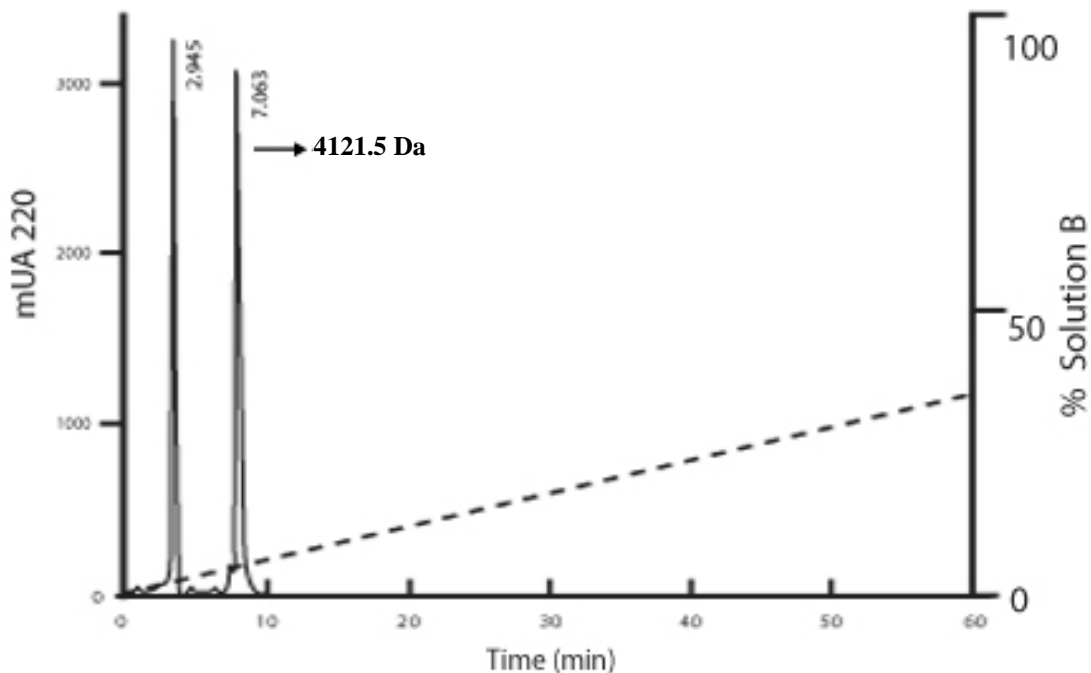


Figura 5. Cromatografía de fase reversa de la fracción 20 en un gradiente de 0 a 30 % de Acetonitrilo al 0.1% de TFA.

Con los datos obtenidos por fragmentación y con la identificación de la secuencia, se fueron empalmando las secuencias coincidentes. Posteriormente se analizó la secuencia obtenida con la base de datos pública del Conoserver [22]. La base de datos Conoserver cuenta con la información de todas las toxinas producidas por el género *Conus* publicadas hasta el momento. El resultado obtenido por el empalme de estas secuencias fue:

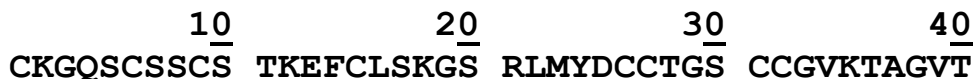


Figura 6. Secuencia de aminoácidos de la RsXXVIA.

Esta secuencia fue sometida a comparación con secuencias de otras conotoxinas en la base de datos Conoserver, lo cual dio como resultado el alineamiento con diecisiete conotoxinas y de manera importante con secuencias de ω -conotoxinas (figura 7). Con base a su secuencia lineal, arreglo y número de cisteínas, así como la especie de donde se obtuvo como marca la nomenclatura de conotoxinas [22], se le asignó el nombre de RsXXVIA.

Peptide sequence by MS/MS

		No.aa
MVIIC	CKGKGAP-CR-----KTMVDCCSGSCG---RRGKC	26
CVIC	CKGKGQS-CS-----KLMYDCCTGSCS---RRGKC	26
MVIIA	CKGKGAK-CS-----RLMYDCCTGSC---RSGKC	25
CVID	CKSKGAK-CS-----KLMVDCCSGSCSG--TVGRC	27
MVIIB	CKGKGAS-CH-----RTSYDCCTGSCN---RGKC	25
RgXXVIA	CKGQSCSSCSTKEFCLSKGSRMLYDCCTGSCCGVKTAGVT	40

Fig 7 CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment of ω -conotoxins

Tomando en cuenta la similitud que nuestra secuencia presenta contra ω -conotoxinas (figura 7), en la colaboración que realizamos con la Dra. Johanna Bernáldez Sarabia se realizaron pruebas sobre canales de Ca^{2+} de tipo N. El resultado fue positivo para las pruebas realizadas sobre células de ganglio superior de rata (Figuras 7 y 8) [30].

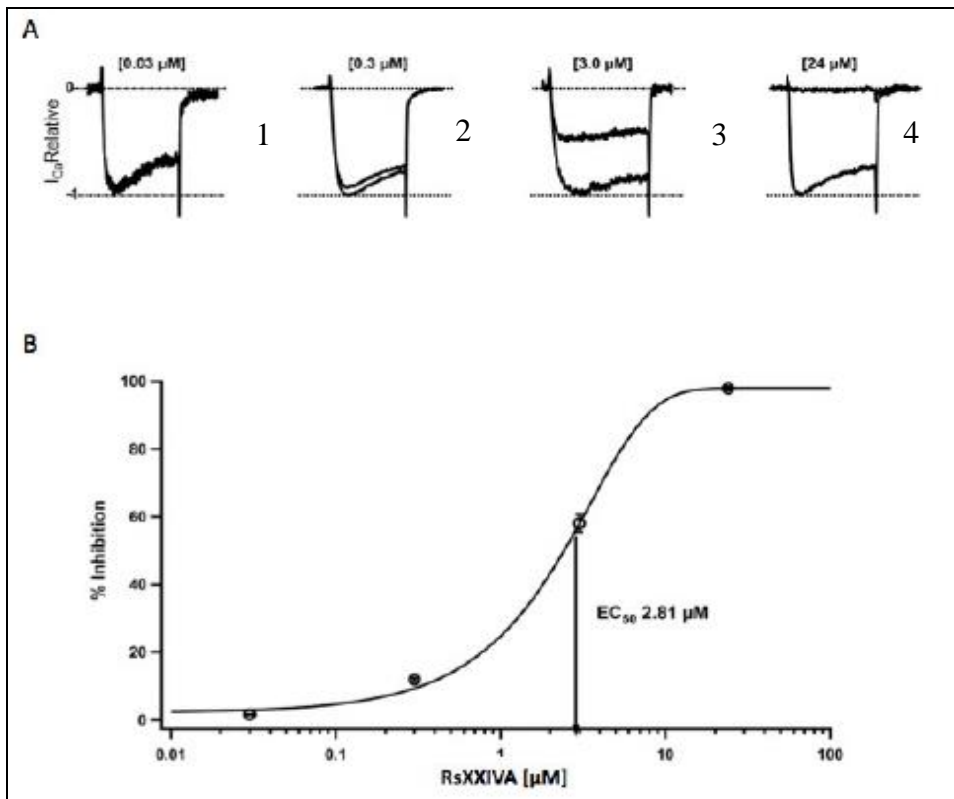


Figura 8.- Relación dosis-respuesta de la inhibición de la corriente de Ca^{2+} por la RsXXIVA de *C. regularis*. (A) Superposición de la corriente de calcio bajo condiciones control contra el efecto de la RsXXIVA aplicada a distintas concentraciones. (B) Cálculo de la dosis media efectiva EC_{50} de la RsXXIVA [30].

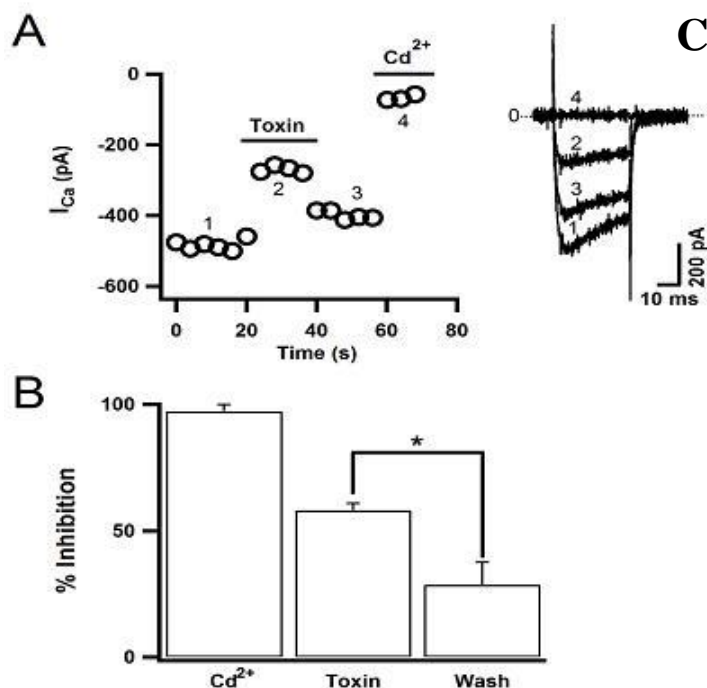


Figura 9.- A) Pulsos empleados para los registros electrofisiológicos 1.- corriente normal de calcio(Ca^{2+}), 2.- efecto de la conotoxina sobre la corriente de Ca^{2+} , 3.- corriente de calcio después del lavado de la toxina, 4.- efecto del Cadmio (Cd^{2+}) sobre la corriente de Ca^{2+} . B) Porcentaje de inhibición de los canales de Ca^{2+} con Cd^{2+} , conotoxina y su recuperación después del lavado (wash). C) registros electrofisiológicos correspondientes al grafico 1.- corriente normal de calcio(Ca^{2+}), 2.- efecto de la conotoxina sobre la corriente de Ca^{2+} , 3.- corriente de calcio después del lavado de la toxina, 4.- efecto del Cadmio [30].

En la figura 7, podemos apreciar los efectos de la conotoxina sobre los canales de Ca^{2+} de tipo N. Es importante notar que la toxina inhibe a los canales de Ca^{2+} en poco más de 50% (Fig. 7-B) y que el efecto es reversible, aunque la recuperación de los canales no es del 100% (Fig. 7-C).

Posteriormente se realizaron experimentos para determinar la dosis / respuesta de nuestra toxina (Figura 6), donde podemos observar los pulsos para estandarizar la corriente de los canales (Figuras 7 y 6 A-1). En las figuras 7 y 6 A-2: se pueden observar los pulsos en presencia de la toxina. En las figuras 7 y 6 A-3: podemos observar la recuperación del canal después del lavado. Y en las figuras 7 y 6 A-4 se puede apreciar el efecto del control positivo ejercido por el cadmio.

Es importante mencionar que la toxina inhibe a los canales de Ca^{2+} en poco más de 50% y que el efecto es reversible, aunque la recuperación de los canales no es del 100%.

Debido a las altas concentraciones (2.8 μM) de toxina RsXXVIA que se necesitaron para obtener una respuesta sobre los canales de Ca^{2+} de tipo N, se concluyó que este no es el blanco principal de esta toxina, por lo cual se decidió hacer pruebas en otro tipo de sistemas. El sistema por el cual se optó para las siguientes pruebas fue el de “hot-plate”. Se inyectaron ratas vía intraperitoneal (IP). Las ratas son dispuestas en un cilindro transparente donde una base metálica es calentada con la finalidad de ver su respuesta al estímulo calorífico. Como se describe en el anexo 2, el resultado fue un efecto analgésico superior al del control positivo, teniendo como resultado la ausencia de reacción por parte de los individuos a tal estímulo [30].

MODELAJE 3D

Con el fin de explicar la baja afinidad que presentó nuestra conotoxina por los canales de Ca^{2+} de tipo N y tomando en cuenta la gran similitud (80% de similitud) que la RsXXVIA tiene con la MVIIA, se dispuso a realizar un modelo 3D teórico de la misma teniendo presente la disposición espacial de los aminoácidos involucrados en el reconocimiento de la toxina por el canal. Se tomó como referencia estructural de la MVIIA la estructura 1OMG publicada en el PDB (Protein Data Bank). De igual forma se determinó por espectrometría de masas que la cisteína 1 está conectada con la cisteína 5 (dato no mostrado) y que no hay reportes de cisteínas vecinas formando puentes disulfuro en conotoxinas.

El modelaje nos arrojó como resultado 12 estructuras diferentes con las conectividades siguientes:

Combinación	Cisteínas involucradas
1	1-26, 6-9, 15-31, 27-32
2	1-26, 6-9, 15-32, 27-31
3	1-26, 6-15, 9-31, 27-32
4	1-26, 6-15, 9-32, 27-31
5	1-26, 6-27, 9-31, 15-32
6	1-26, 6-27, 9-32, 15-31
7	1-26, 6-31, 9-15, 27-32
8	1-26, 6-31, 9-27, 15-32
9	1-26, 6-31, 9-32, 15-27
10	1-26, 6-32, 9-15, 27-31
11	1-26, 6-32, 9-27, 15-31
12	1-26, 6-32, 9-31, 15-27

Tabla 2. Conectividades entre las Cisteínas involucradas en la formación de los puentes S-S.

Se utilizó el servidor I-Tasser¹ con la finalidad de obtener modelos tridimensionales de la secuencia problema para cada una de las 12 combinaciones de enlaces disulfuro que se presentaron anteriormente. Los modelos que se obtuvieron tenían las cisteínas de cada uno de los 4 pares en una posición cercana, sin formación del enlace disulfuro correspondiente. El templete utilizado fue **1HY9** debido a su tamaño y similitud con la RsXXVIA.

A partir de los modelos anteriores, se utilizó el programa Visual Molecular Dynamics² (VMD) para formar los enlaces disulfuro de cada una de las 12 combinaciones, adicionar átomos de hidrógenos a la secuencia de aminoácidos de cada modelo y se solvató cada péptido con moléculas explícitas de agua de tipo TIP3P. Se neutralizaron los sistemas correspondientes con tres átomos de cloro, pues el péptido presentó una carga total de +3.

A partir de los archivos de trayectoria de cada uno de los sistemas neutros y solvatados de cada combinación, se obtuvo la conformación más frecuente con el programa Chimera y finalmente se aislaron los átomos de los péptidos de cada uno de los sistemas, para saber qué péptido era el más estable energéticamente.

Se realizó un cálculo de energía para determinar la combinación de enlaces disulfuro más estable y se encontraron los siguientes resultados:

Péptido	Energía: kcal
C7	0.0
C1	21.8
C12	65.9
C6	94.2
C3	104.5
C11	109.5
C9	116.2
C8	133.3
C10	151.8
C5	203.4
C4	240.1
C2	306.4

Tabla 3. Modelos con sus respectivas estabilidades energéticas de menor a mayor energía.

Se seleccionaron las combinaciones que presentaron un acomodo “adecuado” en los aminoácidos Arg21, Lys35 y Lys18, que corresponderían a los aminoácidos involucrados en la afinidad del péptido por el canal en otras ω -conotoxinas, y en los aminoácidos Lys2 Tyr 24 y Lys35 que corresponden a los aminoácidos involucrados en actividad [52].

De tal manera, se seleccionaron las estructuras de las combinaciones: C6, C7, C12 y C3, con especial atención a esta última, para poder proponer un modelo “adecuado” de la estructura tridimensional de la secuencia problema.

El modelo 12 (Figura 9), que se refiere a la estructura más estable, cumple con la disposición espacial de los aminoácidos importantes para la actividad farmacológica de la K2 y Y13 (MVIIA) y K2 y Y24 (RsXXVIA). Al tomar en cuenta que el aminoácido responsable por la afinidad hacia el canal de MVIIA es la R21 y su símil dentro de la secuencia RsXXVIA que podría ser la K35, el acomodo espacial que presenta la K35 podría explicar que no cumpla con su papel en la afinidad por el canal.

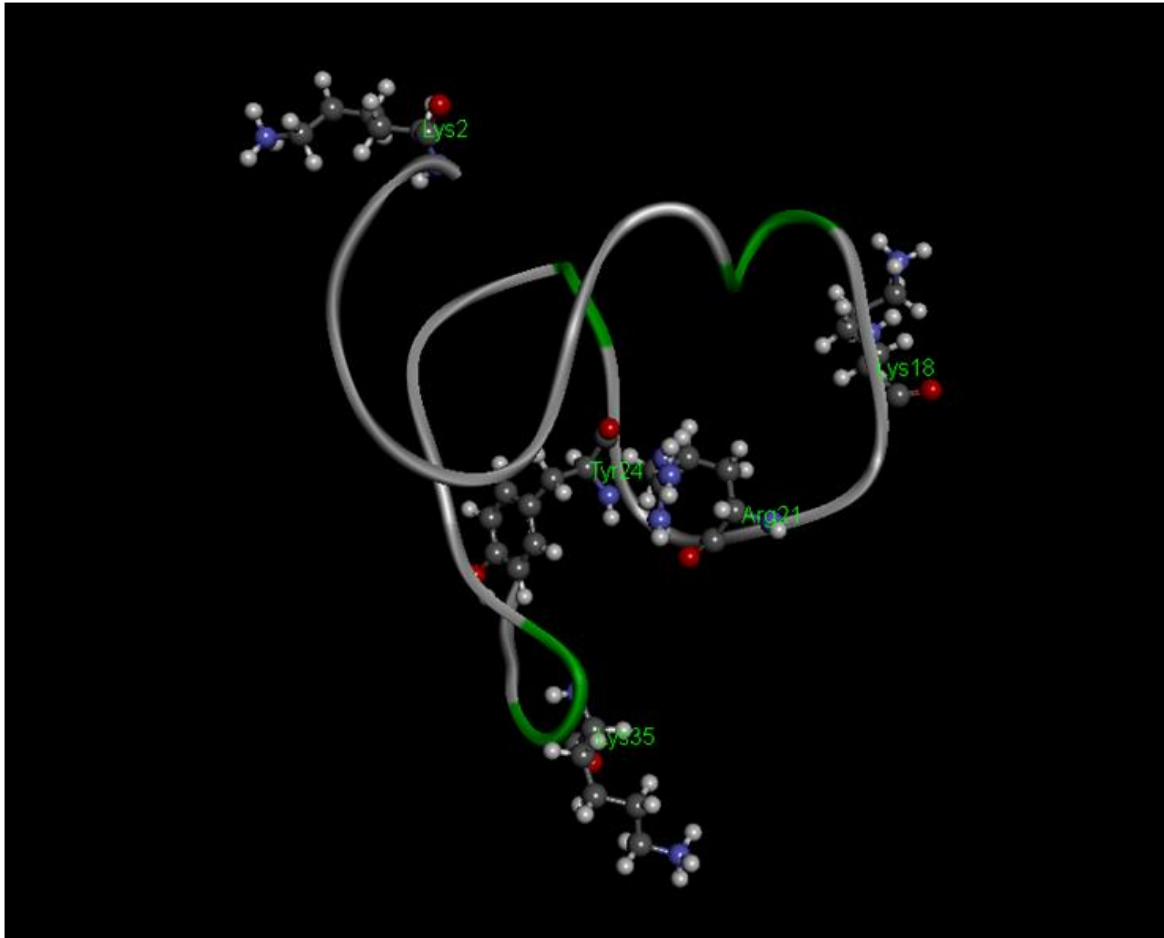


Figura 10. Modelo C12 mostrando a los aminoácidos clave en la conformación de bola y bastón.

Por otra parte, en el modelo 6 (Figura 11), que es ~ 66 kcal/mol menos estable que la 12, podemos observar que tanto los aminoácidos responsables de la actividad farmacológica, como el aminoácido que pudiese ser responsable de la afinidad por el canal se encuentran distribuidos espacialmente de manera similar que en MVIIA, lo cual nos puede hablar de que el cambio en el C-terminal de una R21 dentro de la MVIIA por una K en la posición 35 podría explicar la baja afinidad que presenta la RsXXVIA por el canal de calcio de tipo N.

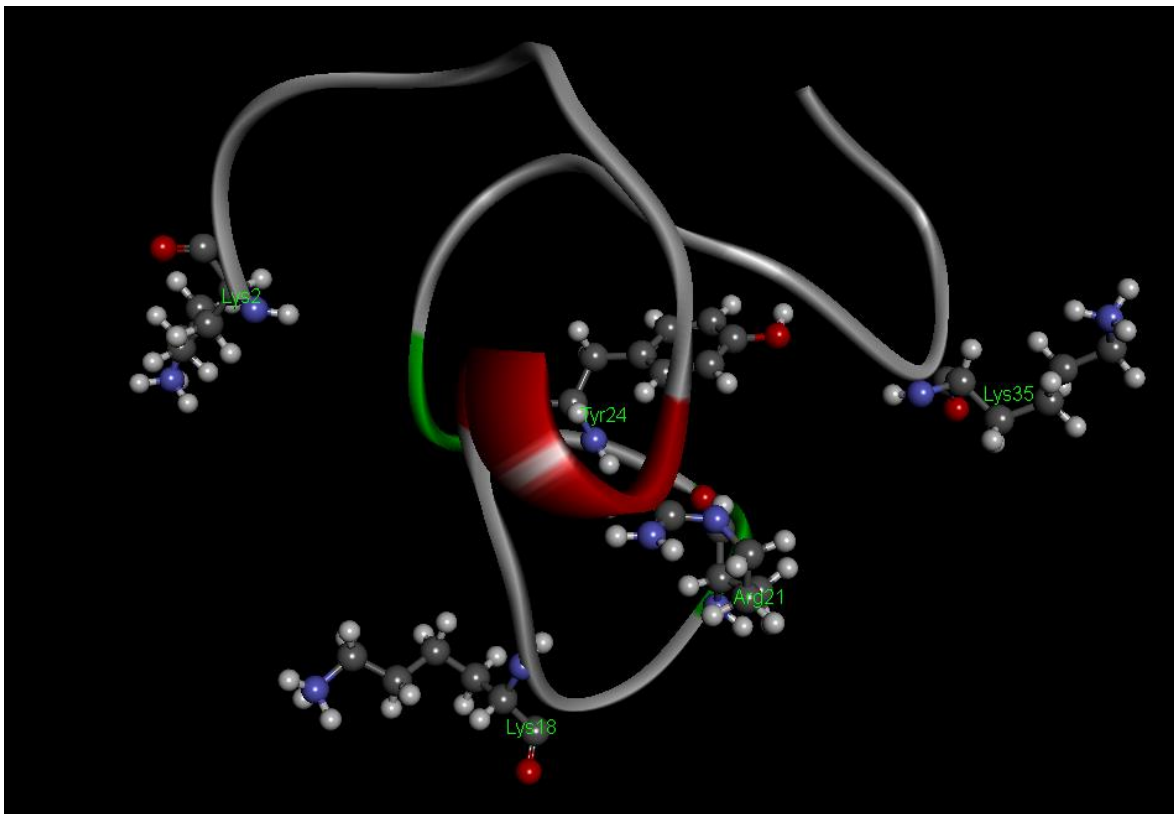


Figura 11. Modelo C6 mostrando a los aminoácidos clave en la conformación de bola y bastón.

Como podemos observar en las figuras 8 y 9 del anexo I, las dos estructuras que más se acercaron a la disposición espacial de los aminoácidos clave para la interacción y afinidad por los canales de Ca^{2+} de tipo N fueron C6 y C12.

Todo lo antes discutido se detalla en el anexo I.

MASS FINGERPRINT

Debido a la poca resolución que presenta nuestro cromatograma del veneno total de *C. regularis* en la figura 3, se decidió correr una nueva muestra de veneno total con una concentración de 1 mg en un mL (figura 12).

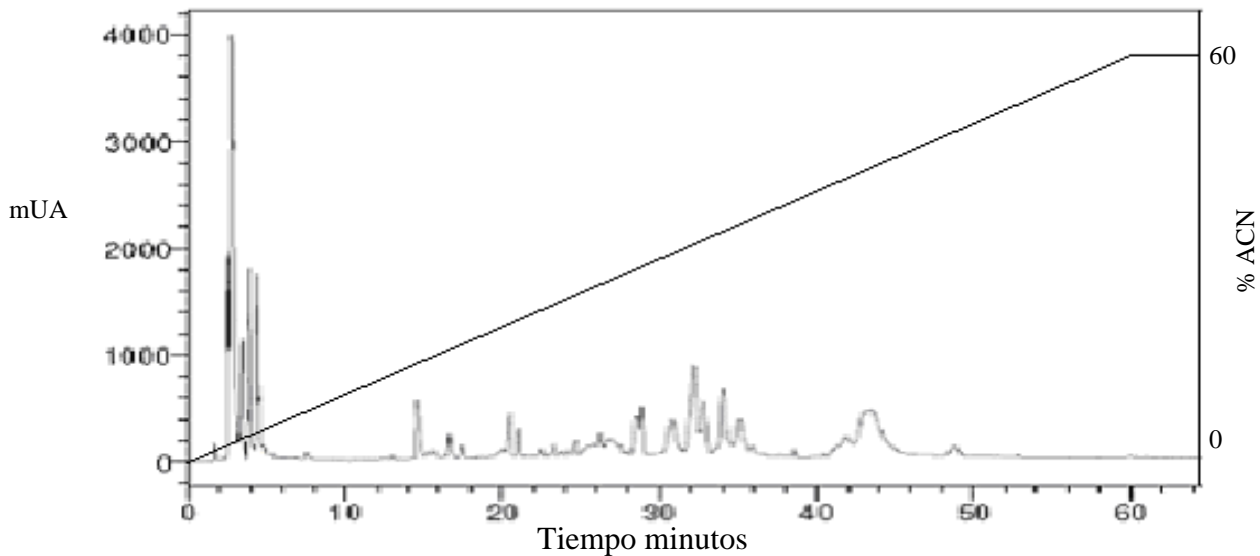


Figura 12. Cromatografía de fase reversa del veneno total de *Conus regularis* en un gradiente de 0 a 60 % de Acetonitrilo al 0.01% de TFA.

A partir de las fracciones resultantes más definidas, se realizó la construcción de un “mass fingerprint” del veneno de *C. regularis* (tabla 1), con las fracciones obtenidas en este análisis realizado por RP-HPLC. En la construcción de este “mass fingerprint” se tomaron en cuenta todos los iones presentes en las muestras y en la tabla se marcaron con negritas los iones más abundantes para cada una de las fracciones determinadas por MALDI-TOF.

Lo anterior nos dio un panorama de la diversidad de moléculas que están presentes en el veneno de este organismo (123 moléculas distintas) y el rango de pesos moleculares (desde 1.4 kDa hasta 16.7 kDa), lo cual concuerda con lo reportado en la literatura para individuos de este género [53, 54].

De igual forma, se obtuvieron cuatro secuencias adicionales de péptidos no reportados en la literatura. A estas secuencias se les dio el prefijo CR por el nombre de la especie (*Conus regularis*), seguido de un número que indicara el minuto en el que fue colectada su fracción en la separación del veneno total por RP-HPLC.

CR-1

La CR-1 es una fracción que se colectó en los primeros cinco minutos de nuestra separación por RP-HPLC del veneno total (Figura 3 y 10). Esta fracción presentó una conotoxina con una masa de 12190 Da y representa el 72.35 % del veneno total en nuestra separación. Debido a la pureza presentada por la fracción, determinada por la separación por RP-HPLC y su espectro de masas, se decidió secuenciarla. El resultado de la secuenciación fue una secuencia de 110 aminoácidos de longitud con 14 cisteínas distribuidas a lo largo de la secuencia. Es importante mencionar que no hay reportes de conotoxinas con este número y arreglo de cisteínas.

CR-1

 10 20 30 40 50 60
MLSTMADQTV NAILQLSRCI EDDRLAAATV NWEELCDCTS GYEYGVHDYE STMGNTPYAQ

 70 80 90 100 110
DMCCHDGVCF ANHAELCDCT NGPDACNYPD CENCIQCPRQ SDCPIRDCPN

Figura 13. Secuencia de aminoácidos de la CR1.

Esta secuencia fue analizada contra el banco de datos CONOSERVER, lo cual dio como resultado similitudes con varios péptidos aislados de varias especies del género Conus:

Nombre	% identidad	% similitud	Sobrelapamiento
<u>Vx15a</u>	45	62	29
<u>Lv15a</u>	41	59	29
<u>Cap15b</u>	41	59	29
<u>Lt15.6</u>	33	50	48
<u>Li1.28</u>	48	70	23
<u>Cn1.6</u>	48	67	21

Tabla 4. Comparación de la CR1 en el ConoServer

A estos péptidos obtenidos de varias especies de Conus no se les ha identificado alguna actividad farmacológica y el tamaño observado comparado con el péptido CR-1 que reportamos es menor, ya que nuestro péptido es de un 50 a 60% mayor que estos péptidos.

Se realizó un CLUSTAL-W de nuestra secuencia contra estos péptidos con el fin de identificar los motivos estructurales compartidos en la secuencia. Debido a que las secuencias de los péptidos que presentan mayor similitud son mucho más pequeños que

nuestra secuencia problema el resultado obtenido en el CLUSTAL-W no es representativo (dato no mostrado). De igual manera, se realizó un análisis por BLAST en la página del NCBI contra la base de datos SWISS PROT y el resultado fue similar dando la mayor similitud con MR30, una proteína rica en cisteínas (CRISP por sus siglas en inglés) de 289 aminoácidos de longitud obtenida de *Conus marmoreus* [55] así como con la Tex31 aislada de *Conus textile* [56].

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenPlot Graphics Distance tree of results Multiple alignment

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> cysteine-rich secretory protein Mr30-1 [Conus marmoreus]	48.5	48.5	56%	3e-04	51%	ABP48101.1
<input type="checkbox"/> RecName: Full=Cysteine-rich venom protein Mr30; Short=CRVP; AltName: Full=Cysteine-rich secretory protein Mr30; AltName: Full=GlaCrisp isoform 1/2/3; AltName: Full=Mr30-1/2; Flags: Precursor	47.4	47.4	56%	7e-04	50%	A1BQ05.1
<input type="checkbox"/> GlaCrisp isoform C [Conus marmoreus]	47.4	47.4	56%	8e-04	50%	ABG36845.1
<input type="checkbox"/> GlaCrisp isoform B [Conus marmoreus]	47.4	47.4	56%	8e-04	50%	ABG36844.1
<input type="checkbox"/> RecName: Full=Cysteine-rich venom protein; Short=CRVP; AltName: Full=Substrate-specific endoprotease Tex31; Flags: Precursor	36.6	36.6	56%	5.1	35%	Q7Y183.1
<input type="checkbox"/> hypothetical protein NECHADRAFT_80786 [Nectria haematococca mpVI 77-13-4]	36.2	36.2	47%	7.2	35%	XP_003050981.1

Tabla 5. Comparación de la CR1 en el NCBI.

Esta última fue reportada como una enzima responsable del procesamiento de maduración de las conotoxinas, aunque se argumenta que este efecto podría ser un efecto de algún contaminante como se observó en la purificación de la MR30 [55].

CR-12

Otro péptido con el que se trabajó fue el denominado como CR-12, un péptido de 49 aminoácidos de longitud y una masa de 5715.660 Da. La fracción parcialmente purificada presentó actividad sobre varios canales; sodio, calcio y receptores de acetil colina (Figura 12), en colaboración con el grupo del Dr. Richard Lewis de la Universidad de Queensland, Australia.

La técnica utilizada para probar la actividad presente en fracciones del veneno de *Conus regularis* fue la medición de colorantes fluorescentes sensibles a cambios en el calcio intracelular por medio del dispositivo FLIPR®. Esta técnica es usada principalmente en la búsqueda de nuevas drogas que afectan a receptores acoplados a proteínas G, aunque

tambien se le puede adaptar para estudiar receptores no acoplados a proteínas G. El colorante empleado con mayor frecuencia es el fluo-4, un quelante de calcio[57].

En esta técnica se usan células adherentes de mamífero. Para el caso de nuestros ensayos se utilizó la línea celular 5H-SY5Y, la cual es una línea celular proveniente de neuroblastoma donde se expresan de manera natural los siguientes canales iónicos:

Calcio: Cav 1.2, Cav 1.3 y Cav 2.2

Receptores de acetil colina (nAChR): $\alpha 7$, $\alpha 3\beta 2$ y $\alpha 3\beta 4$

Canales de sodio: Nav 1.2, Nav 1.3 y Nav 1.7

Se utilizaron 36 fracciones distintas de *Conus regularis* de las cuales solo se obtuvieron resultados de actividad en 4 de estas fracciones, como se puede observar en los espectros del FLIPR (Figura 14).

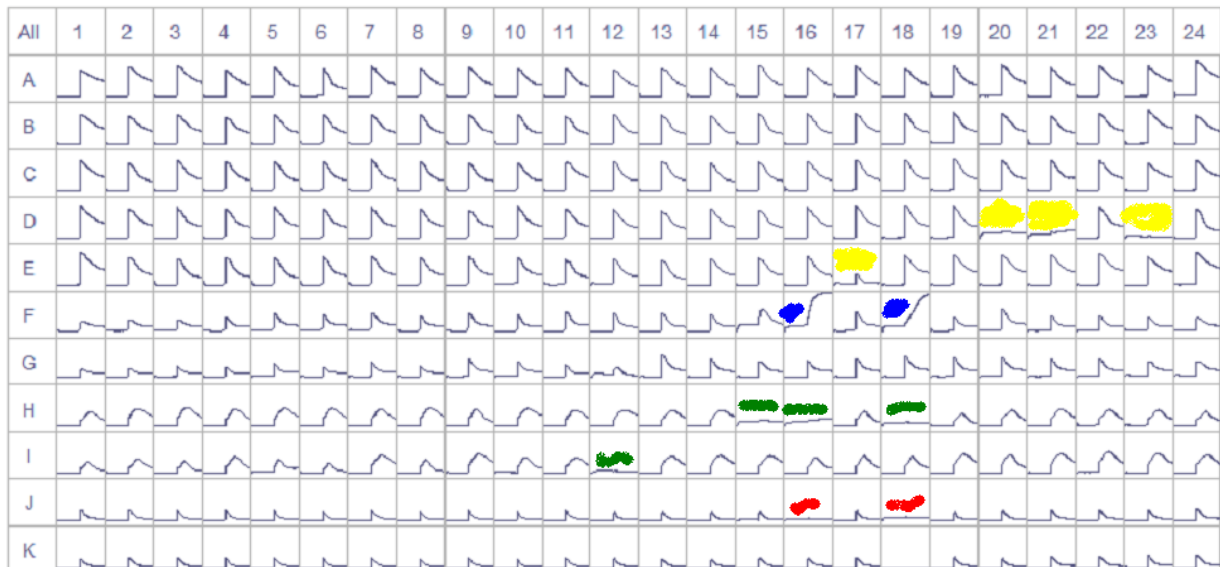


Figura 14. Ensayos de FLIPR sobre células de neuroblastoma de la línea SH-SY5Y.

En la Figura 14 podemos observar cada uno de los registros del FLIPR. Se marcaron con distintos colores los registros más representativos de acuerdo con los blancos fisiológicos sobre los cuales tiene actividad. En amarillo se ilustraron las fracciones que tuvieron actividad sobre los nAChRs α -7; en azul las que tuvieron actividad sobre canales de

calcio de tipo N; en verde sobre canales de sodio 1.3; y rojo sobre receptores de nAChRs tipo α -3.

Si bien se pueden observar actividades de manera notoria en 12 pozos, no podemos descartar que las haya sobre otros blancos, ya que solo fueron probados 4 de los canales antes mencionados.

Otra particularidad que se observó en este ensayo fue que una misma fracción tuvo actividad en 2 y hasta 3 blancos distintos. Este resultado fue debido a que la fracción no pura tenía más de un tipo de cono-péptido y no a una posible actividad promiscua de alguna conotoxina.

Posteriormente fue posible la purificación de esta fracción, dando como resultado la siguiente secuencia aminoacídica:

CR-12



Figura 15. Secuencia de aminoácidos de la CR12 y posible conectividad de cisteínas.

Esta secuencia fue comparada con la base de datos del CONO SERVER y un BLAST en el banco de datos del NCBI. Los resultados no mostraron similitudes significativas con secuencias de este u otro género, por lo que se presume la identificación de una secuencia nueva. De igual forma el CONO SERVER predijo que el arreglo de cisteínas dispuesto en esta secuencia es el IX, por lo cual las conectividades ya estarían definidas como I-IV, II-V, III-VI.

CR-17

El péptido CR-17 contiene 39 aminoácidos de longitud y una masa de 4281 Da. De igual forma el efecto de esta fracción en su forma no pura se puede observar en la figura 14 en los cuadrantes D-20, D-23 (actividad sobre nAChRs α -7) y F-18 (actividad sobre Cav 2.2). A este péptido se le secuenció, y el resultado fue la siguiente secuencia:

CR-17

10

20

30

MLRLTSVSCG TFCSYLLRYH ECCKHPCASV CGARGQIDA

Figura 16. Secuencia de aminoácidos de la CR17.

Esta secuencia fue analizada en el banco de datos del CONOSERVER y mediante un análisis de BLAST contra el banco de datos SWISS PROT en la página del NCBI. Dicho análisis mediante dos bancos de datos diferentes, solo mostró resultados en la página del CONOSERVER. Las secuencias que mostraron mayor similitud con nuestro péptido solamente fueron 2, de las cuales el péptido marcado como Dd1.2 es un péptido predicho a partir de una proteína precursora o pro-péptido de *Conus diadema*. Este péptido no tiene ninguna función farmacológica descrita y presenta el “Framework” I. En este mismo sentido, el péptido Ec3-GMAR01 es un péptido predicho por el CONOSERVER a partir de un pro-péptido del *Conus emaciatu*s. Este péptido tampoco tiene una actividad farmacológica descrita hasta el momento. A estas dos secuencias se les realizó un alineamiento por CLUSTAL-W (figura 17).

ANALISIS DE LA CR-17			
CR-17	MLRLTSVSCGTFCSYLLRYHECCKHP-CASVCGARGQIDA	39	
Dd1.2	-----YHECCKHPPCR---NTRPDLG	19	
Ec3-GMAR01	-----GCCRWP-CPSICGMARCCSS	19	
	** : * * . .		

Figura 17. Alineamiento de la CR17 contra secuencias teóricas por CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment.

Es importante notar que en ambas secuencias el alineamiento se da en la parte C-terminal, por lo que es evidente que nuestro péptido aún podría contener su péptido señal.

CR-20

Este péptido de 39 aminoácidos de longitud y una masa de 4181 Da fue purificado y la secuencia que se obtuvo de esta fracción fue:

CR-20

10 20 30

MKLTACVIVA VLTACTSYNC QLIESTTRCR ICCGRKAVG

Figura 18. Secuencia de aminoácidos de la CR20.

Este péptido, al ser analizado en el banco de datos CONOSERVER, predijo un péptido señal, una toxina madura, una secuencia post en su C-terminal y un posible “Framework” como se muestra en la tabla 6. La secuencia señal dio una identidad con las secuencias señal de todas las superfamilias reportadas, teniendo un mayor porcentaje de identidad con la superfamilia E de un 75% (tabla 7).

	Posición	Secuencia
SEÑAL	[1-17]	MKLTACVIVAVLTACTS
PRO	[0-0]	
MADURA	[1-16]	YNCQLIESTTRCRICC
POST	[17-22]	GRKAVG

Tabla 6. Analisis de la CR20

Framework XVI

Posible amidación del C-terminal

Superfamilia	Sobrelapamiento	% identidad
A	17	35.3
B	7	42.9
B1	7	42.9
B2	10	60.0
B3	8	25.0
C	17	23.5
D	9	22.2
E	4	75.0
F	6	66.7
G	6	50.0
H	10	40.0
I1	13	38.5
I2	9	55.6
I3	12	33.3
J	14	21.4
K	17	41.2
L	13	46.2
M	12	58.3
N	16	18.8
O1	17	82.4
O2	16	50.0
O3	14	35.7
P	13	46.2
Q	9	33.3
S	16	25.0
T	12	50.0
V	6	50.0
Y	12	25.0

Tabla 7. Análisis de la secuencia señal de CR20

Este análisis mostró, al igual que en el péptido CR-17 que posiblemente estemos trabajando con pro-péptidos. Lo cual no es extraño, ya que la manera en que se obtiene el veneno para su posterior estudio no asegura que todas las toxinas dentro del veneno se encuentren en estado maduro [6, 21, 58].

DISCUSIÓN

Como se aprecia en el “mass fingerprint” el veneno de *Conus regularis* es un complejo cóctel de componentes, que se puede apreciar en las figuras 3 y 8. Debido a la poca resolución que obtuvimos en la separación mostrada en el primer cromatograma del veneno total (figura 3), se repitió el experimento con una columna nueva. Esto nos dio como resultado una mejor separación de los componentes presentes en el veneno, con una diversidad de masas que oscila entre los 1.4 y 16 kDa. En la construcción de nuestro “mass fingerprint” del veneno de *C. regularis*, pudimos observar que cuenta con aproximadamente 120 compuestos diferentes (Tabla 2), lo cual concuerda con el número de moléculas presentes en el veneno de organismos pertenecientes al mismo género [12, 14, 21]. Es importante remarcar que en la figura 3 se realizó una separación del veneno total con una columna Vydac y que posteriormente se adquirió una nueva columna C18 (Merck), que nos dio como resultado fracciones con mayor resolución, lo cual puede deberse a que la segunda era nueva. El hecho de que la resolución fuese mayor en una columna nueva, permitió una mejor separación de los componentes y reducir el número de moléculas posibles en cada fracción, de esta manera pudimos discernir con mayor facilidad el número total de masas presentes en una fracción determinada.

La mayor parte de los péptidos reportados con acciones farmacológicas definidas o péptidos maduros, pero sin actividad comprobada en la literatura presentan masas entre 1 y 4 kDa. Para nosotros es notable el hecho de que tengamos péptidos con masas mayores de hasta 16 kDa. Esto es debido a que muy probablemente hayamos obtenido pre-pro-péptidos en la extracción del veneno.

CR-1

La CR-1 es una proteína que se aisló del veneno de *Conus regularis*. Esta proteína mostró similitud con la MR30, la cual a su vez fue comparada con la Tex31 (tabla 5). Esta última fue reportada con actividad proteolítica, aunque se demostró que esto fue resultado de una contaminación por otra proteasa [55]; no obstante, podría tratarse de un pre-pro-péptido.

CR12

El hecho de que este péptido no presentara alguna similitud con péptidos previamente reportados no fue de extrañar ya que como se ha discutido, la parte madura de las conotoxinas es la región hipervariable [6]. Con base en los resultados obtenidos con el grupo del Dr. Lewis nos dispusimos a probar esta fracción pura sobre los canales que mostraron actividad con la fracción no pura.

Aunque los resultados en las pruebas de FLIPR, fueron interesantes teniendo actividades importantes en las coordenadas F16, D21 y H16 (Figura 14), no pudieron ser publicados, ya que provienen de una fuente no pura de toxinas, por lo que se deben realizar más purificaciones para confirmar los resultados observados.

CR17 y CR20

Aunque las secuencias con las que presentó semejanza el péptido CR17 son 20 aminoácidos más pequeñas que nuestro péptido, es de llamar la atención que los alineamientos tuvieran similitudes muy grandes en la parte C-terminal (Figura 15). El hecho de que nuestra secuencia comience con una Metionina nos dice que probablemente estemos frente a un pro-péptido [6, 59]. Tras el análisis que se hizo en la página del ConoServer y aunque no identificó a un péptido señal, esto no se puede desestimar, ya que la comparación que esta base de datos realiza solo se hará contra los ya publicados provenientes de una “Superfamilia” ya reportada, lo cual nos indicaría la posibilidad de reportar un nuevo gen. Para confirmar esta aseveración, es necesario del diseño de oligos degenerados contra este “péptido señal”.

Por otra parte el péptido CR20 al que se analizó por medio del servidor ConoServer arrojó mejores resultados, prediciendo un péptido señal, un péptido maduro y una posible conectividad en sus cisteínas “Framework XVI”. Sin embargo todos estos resultados se tendrán que demostrar y esto no será posible hasta que se obtengan las conotoxinas modificando el método de extracción para la obtención de los péptidos nativos.

RsXXVIA

Es importante remarcar la presencia de la RsXXVIA, la cual presenta una masa mayor comparada con la reportada para las omega-conotoxinas antes de este trabajo.

Se aisló, purificó y secuenció un péptido de 40 aminoácidos de longitud. Este péptido mostró actividad sobre los canales de calcio de tipo N y a la cual nos hemos referido como una “omega-like”. Esta actividad, como ya se mencionó, es un orden de magnitud más baja con respecto a la actividad que presentan otras conotoxinas de tipo omega como la MVIIA. Como se discute en el anexo I, esta toxina presenta diferencias estructurales importantes con respecto a otras omega-conotoxinas. Una de las más importantes, como se puede observar en los alineamientos y en las estructuras 3D que se modelaron, es un loop entre los aminoácidos 10 y 20 de nuestra toxina, el cual no está presente en las omega-conotoxinas clásicas. Este loop podría ser parte de la explicación sobre la baja afinidad de la RsXXVIA por los canales de calcio de tipo N debido a un posible impedimento estérico.

Esto, aunado a los resultados que se obtuvieron por las pruebas de “hot-plate”, nos ha dado la pauta para pensar que estos canales no son el blanco principal de esta toxina, sino posiblemente los canales de tipo TRPV1 ya que por la vía de administración (intraperitoneal) y los efectos obtenidos en el modelo murino, no puede atribuirse el efecto a la acción sobre los canales de calcio 2.2 (consultar anexo II).

Este resultado es relevante en el estudio de fármacos no opiáceos, sin mencionar que la ruta de administración sería diferente a la del Ziconotide, la cual es muy invasiva.

Se ha propuesto que estos organismos pueden adaptar su comportamiento y veneno (elaborando distintos cócteles de toxinas) para capturar a sus presas dependiendo de una situación ambiental [60], aunque el mecanismo por el cual realizan dichos cambios no está descrito. Lo anterior podría comenzar a explicarse por la gran presión ambiental que estos organismos reciben de su hábitat. Incluso se ha observado que estos organismos presentan variaciones intraespecíficas dentro del veneno de organismos colectados en el mismo arrecife [61].

CONCLUSIÓN

En conclusión podemos decir que los componentes del veneno de *Conus regularis* presentan la variabilidad esperada para el veneno de un organismo de este género con 120 componentes distintos.

Es importante mencionar que entre las cinco secuencias reportadas en este trabajo no se encuentra ninguna similitud en lo que podría ser la secuencia madura o las posibles secuencias señal (las que comienzan con M).

Se determinó secuencia y actividad de la RsXXVIA, así como una estructura teórica, la cual explica la baja actividad que presenta contra los canales de Ca⁺ de tipo N.

Si bien CR20 presenta lo que podría ser una secuencia señal y esta tiene una similitud importante con las secuencias señal definidas para algunas “superfamilias”, esto no quiere decir que este péptido pertenezca a ninguna de estas “superfamilias” de genes. Por el contrario, si efectivamente esta es una secuencia señal, esto nos da la certeza de que podríamos estar frente a una nueva “superfamilia” dentro del género *Conus*. Esto es debido a que la secuencia señal es una región altamente conservada.

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos hasta el momento nos han arrojado una secuencia, lo cual, con base en los alineamientos hechos en la base de datos ConoServer, tiene una similitud muy alta con conotoxinas de tipo ω , en particular con la MVIIA.

Debido a lo antes mencionado se realizaron pruebas electrofisiológicas sobre canales de Ca²⁺ de tipo N, las cuales como ya se discutió fueron con una baja actividad. Esta toxina tendrá que ser probada sobre nuevos blancos fisiológicos para definir su especificidad. Se proponen los canales TRP como posible blanco, derivado de los resultados obtenidos por las pruebas de “hot-plate”.

Por otra parte, los resultados obtenidos con la RsXXVIA (anexo II), hacen a esta molécula un candidato muy atractivo para elaborar un producto sintético para su uso como analgésico.

Se hace necesario realizar nuevos experimentos sobre la RsXXVIA para determinar su blanco fisiológico utilizando otros modelos.

En complemento a las pruebas del cono-péptido CR12 (figura 12), este péptido ya ha sido probado sobre canales de sodio Nav 1.3 y sobre canales de Ca^{+} de tipo N, esto sin mostrar actividad. Por lo que se tendrá que replantear experimentos adicionales para poder dilucidar su blanco principal.

También nos hemos encontrado con más secuencias, las cuales parece que aun contienen a su péptido señal. Esto tendrá que ser verificado con experimentos de biología molecular en los cuales se harán oligos contra estas secuencias conservadas para rastrear nuevos genes.

Por otra parte, se propone que el estudio de estas conotoxinas se realice mediante el ordeñado de estos animales con el fin de obtener solo toxinas maduras como lo propone L. Nelson [27]. Esto requiere de una infraestructura especializada para mantener vivos a los organismos.

Esto nos dará una fuente constante de veneno para poder obtener una mayor cantidad de toxinas que se encuentren en menor concentración dentro del veneno. Recordemos que el veneno de estos organismos es una mezcla heterogénea de moléculas biológicamente activa, de las cuales obtenemos apenas unos cuantos microgramos de cada una de estas toxinas, en el caso de las más abundantes. Pero como podemos ver en los cromatogramas del veneno total, existen fracciones en mucha menor abundancia y de las cuales podemos obtener información de muchas toxinas que podrían estar involucradas en pasos cruciales del proceso de envenenamiento dirigido para un particular grupo de organismos dentro de su dieta, algún competidor dentro del mismo nicho o pertenecientes a un posible predador.

De igual forma, estas moléculas a lo largo de la investigación en toxicología, han ayudado a comprender el funcionamiento de los distintos blancos fisiológicos (canales iónicos, transportadores, receptores de membrana) a los cuales afectan, y a los blancos fisiológicos que afectan en grupos de organismos diferentes a los mamíferos. De este modo iremos desarrollando una comprensión mayor a un fenómeno tan estudiado y poco comprendido como lo es el envenenamiento.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] M.A.A.-S.M. Ali, Studies on Bee Venom and Its Medical Uses International Journal of Advancements in Research & Technology, 1 (2012) 69-83.
- [2] J.J. Calvete, Venomics: Digging into the evolution of venomous systems and learning to twist nature to fight pathology, Journal of Proteomics, 72 (2009) 121-126.
- [3] J.J. Calvete, L. Sanz, Y. Angulo, B. Lomonte, J.M. Gutierrez, Venoms, venomics, antivenomics, FEBS letters, 583 (2009) 1736-1743.
- [4] C. Warwick, C. Steedman, Injuries, envenomations and stings from exotic pets, J R Soc Med, 105 (2012) 296-299.
- [5] R.J. Lewis, S. Dutertre, I. Vetter, M.J. Christie, Conus venom peptide pharmacology, Pharmacological reviews, 64 (2012) 259-298.
- [6] C.Z. Wang, C.W. Chi, Conus peptides--a rich pharmaceutical treasure, Acta biochimica et biophysica Sinica, 36 (2004) 713-723.
- [7] P. Escoubas, L. Quinon, G.M. Nicholson, Venomics: unravelling the complexity of animal venoms with mass spectrometry, J Mass Spectrom, 43 (2008) 279-295.
- [8] F. Wang, Z. Yan, Z. Liu, S. Wang, Q. Wu, S. Yu, J. Ding, Q. Dai, Molecular basis of toxicity of N-type calcium channel inhibitor MVIIA, Neuropharmacology, 101 (2016) 137-145.
- [9] E. Prommer, Ziconotide: a new option for refractory pain, Drugs of today, 42 (2006) 369-378.
- [10] H.E. Hannon, W.D. Atchison, Omega-Conotoxins as Experimental Tools and Therapeutics in Pain Management, Marine drugs, 11 (2013) 680-699.
- [11] L.C. Hermitte, Venomous marine molluscs of the genus Conus, Trans R Soc Trop Med Hyg, 39 (1946) 485-512.
- [12] C. Romeo, L. Di Francesco, M. Oliverio, P. Palazzo, G.R. Massilia, P. Ascenzi, F. Polticelli, M.E. Schinina, Conus ventricosus venom peptides profiling by HPLC-MS: a new insight in the intraspecific variation, J Sep Sci, 31 (2008) 488-498.
- [13] B.M. Olivera, C. Walker, G.E. Cartier, D. Hooper, A.D. Santos, R. Schoenfeld, R. Shetty, M. Watkins, P. Bandyopadhyay, D.R. Hillyard, Speciation of cone snails and interspecific hyperdivergence of their venom peptides. Potential evolutionary significance of introns, Annals of the New York Academy of Sciences, 870 (1999) 223-237.
- [14] B.M. Olivera, J. Rivier, C. Clark, C.A. Ramilo, G.P. Corpuz, F.C. Abogadie, E.E. Mena, S.R. Woodward, D.R. Hillyard, L.J. Cruz, Diversity of Conus neuropeptides, Science, 249 (1990) 257-263.
- [15] B.M. Olivera, E.E. Just Lecture, 1996. Conus venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years of neuropharmacology, Molecular biology of the cell, 8 (1997) 2101-2109.
- [16] J.P. Bingham, E. Mitsunaga, Z.L. Bergeron, Drugs from slugs--past, present and future perspectives of omega-conotoxin research, Chemo-biological interactions, 183 (2010) 1-18.
- [17] O. Buczek, G. Bulaj, B.M. Olivera, Conotoxins and the posttranslational modification of secreted gene products, Cellular and molecular life sciences : CMLS, 62 (2005) 3067-3079.

- [18] R.S. Norton, B.M. Olivera, Conotoxins down under, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 48 (2006) 780-798.
- [19] A.D. Santos, J.M. McIntosh, D.R. Hillyard, L.J. Cruz, B.M. Olivera, The A-superfamily of conotoxins: structural and functional divergence, *The Journal of biological chemistry*, 279 (2004) 17596-17606.
- [20] G. Bulaj, B.M. Olivera, Folding of conotoxins: formation of the native disulfide bridges during chemical synthesis and biosynthesis of Conus peptides, *Antioxid Redox Signal*, 10 (2008) 141-155.
- [21] A.G. Craig, P. Bandyopadhyay, B.M. Olivera, Post-translationally modified neuropeptides from Conus venoms, *European journal of biochemistry / FEBS*, 264 (1999) 271-275.
- [22] Q. Kaas, J.C. Westermann, D.J. Craik, Conopeptide characterization and classifications: an analysis using ConoServer, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 55 (2010) 1491-1509.
- [23] K.Q.e.a.N.A. Res, ConoServer, (2016).
- [24] D.D. Yuan, L. Liu, X.X. Shao, C. Peng, C.W. Chi, Z.Y. Guo, Isolation and cloning of a conotoxin with a novel cysteine pattern from *Conus characteristicus*, *Peptides*, 29 (2008) 1521-1525.
- [25] F. Lazcano-Perez, S.A. Roman-Gonzalez, N. Sanchez-Puig, R. Arreguin-Espinosa, Bioactive peptides from marine organisms: a short overview, *Protein Pept Lett*, 19 (2012) 700-707.
- [26] R.W. Janes, alpha-Conotoxins as selective probes for nicotinic acetylcholine receptor subclasses, *Curr Opin Pharmacol*, 5 (2005) 280-292.
- [27] L. Nelson, Venomous snails: one slip, and you're dead, *Nature*, 429 (2004) 798-799.
- [28] B. Hille, *Ion channels of excitable membranes*, 3rd ed., Sinauer, Sunderland, Mass., 2001.
- [29] S. Hatta, J. Sakamoto, Y. Horio, Ion channels and diseases, *Med Electron Microsc*, 35 (2002) 117-126.
- [30] J. Bernaldez, S.A. Roman-Gonzalez, O. Martinez, S. Jimenez, O. Vivas, I. Arenas, G. Corzo, R. Arreguin, D.E. Garcia, L.D. Possani, A. Licea, A *Conus regularis* conotoxin with a novel eight-cysteine framework inhibits CaV2.2 channels and displays an anti-nociceptive activity, *Marine drugs*, 11 (2013) 1188-1202.
- [31] E.C. Cooper, L.Y. Jan, Ion channel genes and human neurological disease: recent progress, prospects, and challenges, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (1999) 4759-4766.
- [32] R. Raouf, K. Quick, J.N. Wood, Pain as a channelopathy, *J Clin Invest*, 120 (2010) 3745-3752.
- [33] D.L. Bennett, C.G. Woods, Painful and painless channelopathies, *Lancet Neurol*, 13 (2014) 587-599.
- [34] A. Beyder, G. Farrugia, Ion channelopathies in functional GI disorders, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 311 (2016) G581-G586.
- [35] A.S. Amin, A. Asghari-Roodsari, H.L. Tan, Cardiac sodium channelopathies, *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 460 (2010) 223-237.
- [36] O. Campuzano, P. Beltran-Alvarez, A. Iglesias, F. Scornik, G. Perez, R. Brugada, Genetics and cardiac channelopathies, *Genet Med*, 12 (2010) 260-267.

- [37] S. Dutertre, R.J. Lewis, Use of venom peptides to probe ion channel structure and function, *The Journal of biological chemistry*, 285 (2010) 13315-13320.
- [38] T.C. Hunter, N.L. Andon, A. Koller, J.R. Yates, P.A. Haynes, The functional proteomics toolbox: methods and applications, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 782 (2002) 165-181.
- [39] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis, *J Comput Chem*, 25 (2004) 1605-1612.
- [40] D.F. Hochstrasser, J.C. Sanchez, R.D. Appel, Proteomics and its trends facing nature's complexity, *Proteomics*, 2 (2002) 807-812.
- [41] R. Aebersold, M. Mann, Mass spectrometry-based proteomics, *Nature*, 422 (2003) 198-207.
- [42] A. Pandey, M. Mann, Proteomics to study genes and genomes, *Nature*, 405 (2000) 837-846.
- [43] H. Liu, D. Lin, J.R. Yates, 3rd, Multidimensional separations for protein/peptide analysis in the post-genomic era, *Biotechniques*, 32 (2002) 898, 900, 902 passim.
- [44] A. Menez, R. Stocklin, D. Mebs, 'Venomics' or : The venomous systems genome project, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 47 (2006) 255-259.
- [45] P. Escoubas, G.F. King, Venomics as a drug discovery platform, *Expert Rev Proteomic*, 6 (2009) 221-224.
- [46] I. Vetter, J.L. Davis, L.D. Rash, R. Anangi, M. Mobli, P.F. Alewood, R.J. Lewis, G.F. King, Venomics: a new paradigm for natural products-based drug discovery, *Amino acids*, 40 (2011) 15-28.
- [47] P. Edman, Phenylthiohydantoins in protein analysis, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 88 (1960) 602-610.
- [48] O.P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, F.J. Sigworth, Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches, *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 391 (1981) 85-100.
- [49] Y. Zhang, I-TASSER server for protein 3D structure prediction, *BMC Bioinformatics*, 9 (2008) 40.
- [50] A. Roy, A. Kucukural, Y. Zhang, I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction, *Nat Protoc*, 5 (2010) 725-738.
- [51] A. Roy, J. Yang, Y. Zhang, COFACTOR: an accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation, *Nucleic acids research*, 40 (2012) W471-477.
- [52] K.J. Nielsen, D. Adams, L. Thomas, T. Bond, P.F. Alewood, D.J. Craik, R.J. Lewis, Structure-activity relationships of omega-conotoxins MVIIA, MVIIC and 14 loop splice hybrids at N and P/Q-type calcium channels, *Journal of molecular biology*, 289 (1999) 1405-1421.
- [53] B.M. Olivera, R.W. Teichert, Diversity of the neurotoxic Conus peptides: a model for concerted pharmacological discovery, *Mol Interv*, 7 (2007) 251-260.
- [54] B.M. Olivera, Conus peptides: biodiversity-based discovery and exogenomics, *The Journal of biological chemistry*, 281 (2006) 31173-31177.
- [55] J. Qian, Z.Y. Guo, C.W. Chi, Cloning and isolation of a Conus cysteine-rich protein homologous to Tex31 but without proteolytic activity, *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 40 (2008) 174-181.

- [56] T.J. Milne, G. Abbenante, J.D. Tyndall, J. Halliday, R.J. Lewis, Isolation and characterization of a cone snail protease with homology to CRISP proteins of the pathogenesis-related protein superfamily, *The Journal of biological chemistry*, 278 (2003) 31105-31110.
- [57] K.B. Hansen, H. Brauner-Osborne, FLIPR assays of intracellular calcium in GPCR drug discovery, *Methods in molecular biology*, 552 (2009) 269-278.
- [58] S.R. Woodward, L.J. Cruz, B.M. Olivera, D.R. Hillyard, Constant and hypervariable regions in conotoxin propeptides, *The EMBO journal*, 9 (1990) 1015-1020.
- [59] G. Bulaj, O. Buczek, I. Goodsell, E.C. Jimenez, J. Kranski, J.S. Nielsen, J.E. Garrett, B.M. Olivera, Efficient oxidative folding of conotoxins and the radiation of venomous cone snails, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 Suppl 2 (2003) 14562-14568.
- [60] L.L. Tayo, B. Lu, L.J. Cruz, J.R. Yates, 3rd, Proteomic analysis provides insights on venom processing in *Conus textile*, *Journal of proteome research*, 9 (2010) 2292-2301.
- [61] J.A. Jakubowski, W.P. Kelley, J.V. Sweedler, W.F. Gilly, J.R. Schulz, Intraspecific variation of venom injected by fish-hunting *Conus* snails, *The Journal of experimental biology*, 208 (2005) 2873-2883.

ANEXO I

A 3D structural model of RsXXVIA, an ω -conotoxin

Sergio A. Román-González^{1,2,3} · Edson Edinho Robles-Gómez¹ · Jorge Reyes¹ ·
Johanna Bernáldez⁴ · Fernando Cortés-Guzmán¹ · Karina Martínez-Mayorga¹ ·
Fernando Lazcano-Pérez^{1,5} · Alexei Licea⁴ · Roberto Arreguín-Espinosa¹

Received: 20 September 2016 / Accepted: 7 November 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract The pharmacological relevance of peptides isolated from cone snails is gaining interest, particularly for pain management. Conotoxins are small well-structured peptides with specific functions over a number of specific physiological targets. Despite the large number and variety of toxins that these organisms can produce, only a handful of three-dimensional structures has been experimentally determined. Theoretical models of toxins, developed with bioinformatics method, contribute to the understanding of the structure and function of these peptides. RsXXVIA is a conotoxin previously isolated from the *Conus regularis* venom that has been shown to block N-type calcium channels. In this work, we modeled 12 theoretical cysteine frameworks (disulfide bonds)

to elucidate the 3D structure of RsXXVIA to explain its activity. We used, as a template, the ω -conotoxin MVIIA (ziconotide), a prototype conotoxin with high sequence similarity to RsXXVIA. Particularly, the spatial arrangement of two amino acid residues, Lys2 and Tyr13 (in ziconotide), responsible for the pharmacological activity was taken into account. Remarkably, 3D models rendered a particularly suitable spatial disposition of key amino acids responsible for the activity on the N-type calcium channel. Additionally, this work explains, through computational models, how the conotoxin might be acting on the channel, thus, paving the way to find the principal RsXXVIA's physiological target.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11224-016-0877-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Keywords Conotoxin · Ion channels · Cone snail · Peptide · Pharmacology

✉ Roberto Arreguín-Espinosa
arrespin@unam.mx

Introduction

The large variety of living organisms cohabitating the oceans share and compete among them in one of the most complex ecological systems of the planet. This complexity is manifested in peculiar feeding processes, harsh contest among organisms for the same ecological niche, and the way they repel predators. Many species use different strategies to interact with each other in their ecological system; an example of this strategy is used by poisonous animals. The cone snails employ a complex biochemical mixture of peptides, enzymes, amines, etc., to paralyze a prey to feed themselves. These remarkable animals have an advantage of over 60 million years of “pharmaceutical” experience in the adaptation of their venom to survive in one of the most hostile environments [1, 2], making the production of conotoxins a key self-defense mechanism for survival. Therefore, the study of venoms may be useful to understand and develop new and more effective drugs.

¹ Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 Ciudad de México, Mexico

² Posgrado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Ciudad Universitaria 3000, Coyoacán, 04510 Ciudad de México, Mexico

³ Unidad de Proteómica, Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), Periférico Sur 4809, Col. Arenal Tepepan, Tlalpan, 14610 Ciudad de México, Mexico

⁴ Molecular Immunology and Biotoxins Laboratory, Marine Biotechnology Department, Scientific Research and Higher Education Center from Ensenada (CICESE), Carretera Ensenada-Tijuana #3918, Zona Playitas, 22860 Ensenada, Mexico

⁵ Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Campus Iztapalapa, 09340 Ciudad de México, Mexico

This work is focused on one of the largest groups of marine invertebrates, snails from the genus *Conus*. The potential use of toxins isolated from these invertebrates to treat neurological disorders highlights their pharmacological importance. These peptides have attracted enormous interest from biomedical researchers as many of those already characterized display unprecedented potency and selectivity for their molecular target, which can include ion channels, G protein-coupled receptors (GPCRs), or neurotransmitter transporters. Conotoxins have thus proven to be valuable research tools, as well as lead and potential therapeutical compounds. In consequence, there has been a concerted and increasing drive for the identification and characterization of new conotoxins [3, 4]. Currently, these peptides are classified in one of three ways: gene superfamily, cysteine framework, or pharmacological family. Accordingly, pharmacological family and cysteine framework were the primary methods of conotoxins' classifications [5]. The pharmacological family classification was based on the receptor target and type of interaction of a conotoxin [1]. These peptides act on the nociceptive pain pathway, blocking the channels involved in pain transmission [3]. There are several superfamilies where the biological activity in the mammalian central nervous system has been demonstrated, but the molecular target has not yet been identified. These "neglected" superfamilies may yield conotoxins with novel function, some of which might in turn serve as valuable biomedical research tools. They are also valuable molecular tools to functionally and structurally understand the nature of the channels, providing information on how a toxin interacts with its target channel and use them as potential therapeutic agents [6, 7]. Notably, conotoxins have great specificity and are able to discriminate between channel subtypes [8]. Epilepsy is another example of a condition that the research in conotoxins is trying to face with the incursion into these particular molecules [9].

Cone snails are carnivorous animals, specialized in feeding from three groups of organisms, fish (*piscivorous*), mollusks (*molluscivorous*), and worms (*vermivorous*) [9]. The genus *Conus* includes around 500 to 700 different species [10], each of them capable of producing from 50 to 200 different compounds in their venomous apparatus [11]. Even though it has been estimated that the genus *Conus* contains at least 50,000–100,000 compounds [2, 12], with specific non-overlapping pharmacological activity [10], only 0.1% of these compounds has been structurally and pharmacologically characterized [13]. Most of the compounds in the *Conus* venom are cysteine-rich peptides produced by a number of genes named "Superfamilies" [1, 14] (27 have been reported in ConoServer) and are designated by capital letters (O, A, P, M, etc.). These genes produce toxins as pre-pro-peptides, which have a pre-region that is highly conserved, a pro-region relatively conserved, and the mature peptide region in the C-terminal that is highly divergent [9, 15]. In the mature peptide, only the cysteine arrangement and connectivity (S-S

bridge) between them is conserved among members of the same superfamily, known as the cysteine framework [9, 16]. A particular feature of conopeptides is their high occurrence of post-translational modifications, which in some cases are crucial for their toxin activity [9, 10, 17, 18]. In the conotoxins nomenclature, the pharmacological activity is distinguished by Greek letters, for example, κ (kappa), μ (mu), and ω (omega) representing voltage-gate blocking for potassium, sodium, and calcium channels, respectively [3, 17].

In particular, the O-superfamily has gained attention because of the production of ω -conotoxins, which affect the influx of calcium ions in the N-type calcium channels ($\text{Ca}_v 2.2$). This type of channel is involved in pain transmission; thus, their blockade has analgesia effect. The first ω -conotoxin used as painkiller is MVIIA [14], which blocks the N-type calcium channel. One advantage of MVIIA is that unlike opioids, the toxin do not interact with G proteins, which are involved in opioid tolerance [19], or other side effects as the opioids, cannabinoids and non-steroidal anti-inflammatory drugs does [20]. A disadvantage is that the MVIIA have to be administrated by intrathecal via, so the patient needs a catheter or an intrathecal drug delivery system [20]. This peptide was the first conotoxin approved by the Food and Drugs Administration (FDA) in 2004 to treat chronic pain in terminal cancer patients [2]; a few more peptides are in clinical trials [9]. In addition, these toxins are extremely selective to other channels isoforms, this characteristic make them valuable tools to treat chronic pain conditions [3].

Determination of three-dimensional structures of biomacromolecules is a central task in structural biology. However, the number of sequences currently known is more than eight times the amount of 3D structures deposited in the PDB (61,000 3D structures out of 512,994 reported sequences, UniProtKB/Swiss-Prot database). The growing demand of structural knowledge at the atomic level has driven the production of protein models using computational methodologies. In this work, we propose a 3D structural model of a new conotoxin previously isolated from *C. regularis* venom by Bernáldez et al. and originally named as RsXXIVA [21]. However, this number of framework was taken shortly before by Luo and coworkers [22], and the conotoxin was renamed RsXXVIA by the ConoServer webpage (www.conoserver.org). In order to propose a structure of RsXXVIA, we tested four possible disulfide bonds that could be formed with the eight available cysteine residues. Our model allowed rationalizing the interaction between K2 and Y24 and highlights the importance of the functional dyad formed by these residues in the RsXXVIA conotoxin.

Computational methods

Twelve combinations were tested comprising four disulfide bonds and considering that the first Cys is connected with

the fifth and that there is no disulfide bond between neighboring cysteine residues in conotoxins.

The disulfide bonds were formed using the “psfgen Plugin program” included in VMD (Visual Molecular Dynamics, 1.9.2). The I-Tasser server was used to obtain several 3D models of each combination, where 1HY9 protein was used as a template because of the length and sequence similarity. Each model was solvated with explicit TIP3P water molecules and neutralized with three chlorine atoms in VMD [23, 24]. Each combinatorial model was submitted to a homology modeling process within the I-Tasser website. I-Tasser uses as a template the 3D structure loaded from the PDB (PDBID: 1HY9) to build the three-dimensional models of each combinatorial sequence. The 12 models have the cysteine residues near to each other without the corresponding disulfide bond. To model the disulfide bonds and the hydrogen atoms, we used the VMD program; additionally, the peptide was solvated and neutralized to pH 7 [23, 24]. Each model was subjected to molecular dynamics simulations with NAMD 2.6 and CHARMM27 force field at 310 K; each simulation consisted of 100 steps of minimization and 2500 steps of production. From the neutral and solvated systems from each combination, we obtained the most frequent conformation with the Chimera program [25]; furthermore, the atoms of the peptides in each of the systems were isolated in order to calculate the energy and know which peptide was the most stable. Three peptides were selected and named as follows: C3, C6, and C12. Each peptide was submitted to the following molecular dynamic protocol using NAMD: first, 10,000 steps of minimization were performed for the system except the atoms of the peptide, followed by 15,000 steps of molecular dynamics for the whole system at 0 K. The system was then heated from 0 to 310 K with 50,000 steps of MD. To decrease the anomalous contacts, the system was submitted to a 10 ns of an NTP dynamics at 310 K. Finally, a 50-ns NTV dynamics at 310 K was run.

After the MD simulations, a principal component analysis was performed on the basis of peptide dihedrals with dPCA, obtaining the most populated clusters of the trajectory of the dynamics of C3, C6, and C12. In addition, a clustering analysis based on RMSD, performed in Chimera, rendered representative conformations (Fig. 1).

Results

The spatial disposition of the residues K2 and Y13 in MVIIA [3] has been used as structural restrain/reference on the development of models of conotoxins. The corresponding residues in the RsXXVIA conotoxin are K2 and Y24. Using this constraint, and MVIIA as a template, 12 cysteine frameworks were built using homology modeling.

RsXXVIA has a high sequence similarity with other ω -conotoxins sequences (Fig. 2); the largest identity (75%) and

similarity (80%) was observed with MVIIA (analysis performed within NCBI Blast: Protein Sequence and corroborated by the ConoServer). From the 25 amino acids of MVIIA, 17 are present in RsXXVIA and two mutations are conserved. Thus, this toxin was tested against the natural target of the ω -conotoxins [21], but RsXXVIA is 13 to 15 amino acids larger than other ω -conotoxins; this toxin has been tested in N-type calcium channels and shows a 3- μ M activity [21]. This is a low activity compared to ω -conotoxins such as MVIIA, which is in the nM range [26]. This difference could be an effect produced by the extra segment between the 10th and 20th amino acids (STKEFCLSKGS) (Fig. 2). Noteworthy, RsXXVIA contains the two amino acids involved in the recognition of the channel, K2 and Y24, (K2 and Y13 in the classic ω -conotoxin MVIIA sequence) [3]. In our model, K35 could be playing the same role as R21 in ziconotide, which is the amino acid responsible for the affinity for the calcium channel 2.2 [3].

The number of cysteine residues is another difference between our conotoxin and the ω -conotoxins. In RsXXVIA, there are eight cysteine residues in a new pattern and a new framework [21, 27]. The only information available for the cysteine connections is the one formed by Cys1-Cys5, but the connectivity of the other six cysteine residues is unclear. Another important key structural feature is that there are no reports on disulfide bonds between two neighboring cysteine residues in conotoxins (Cys5-Cys6 and Cys7-Cys8 in the RsXXVIA) (www.conoserver.org).

All possible combinations of the eight cysteine residues forming a disulfide bond, without taking into account the possible combinations between neighboring cysteine residues, are listed in Table 1. Energy values (kcal/mol) related to the most stable structure (C7) are shown in Table 2, obtained at the PM6 level of theory. As an additional criterion, we selected the combinations where Lys2, Tyr24, and Lys35 have the spatial disposition to engage in the binding recognition process of the toxin; these are key amino acids with known relevance for pharmacological activity. The selected models were model C3, C6, and C12.

Molecular dynamics Fifty-nanosecond MD simulations of the combinations C3, C6, and C12 were analyzed via RMSD, radius of gyration, sequence comparison, and structural alignments: C3 (Fig. 3), C6 (Fig. 4), and C12 (Fig. 5). In the next figures, we show the result of the trajectory analysis of molecular dynamics.

RMSD For C3, RMSD values fluctuated from 2 to 10 Å, reaching a stable structure after 10 ns. Similarly, model C6 reached the equilibrium at 10 ns. In turn, model C12 fluctuated within a range of 2 Å through the trajectory but seemed to continue to increase steadily (Fig. 1).

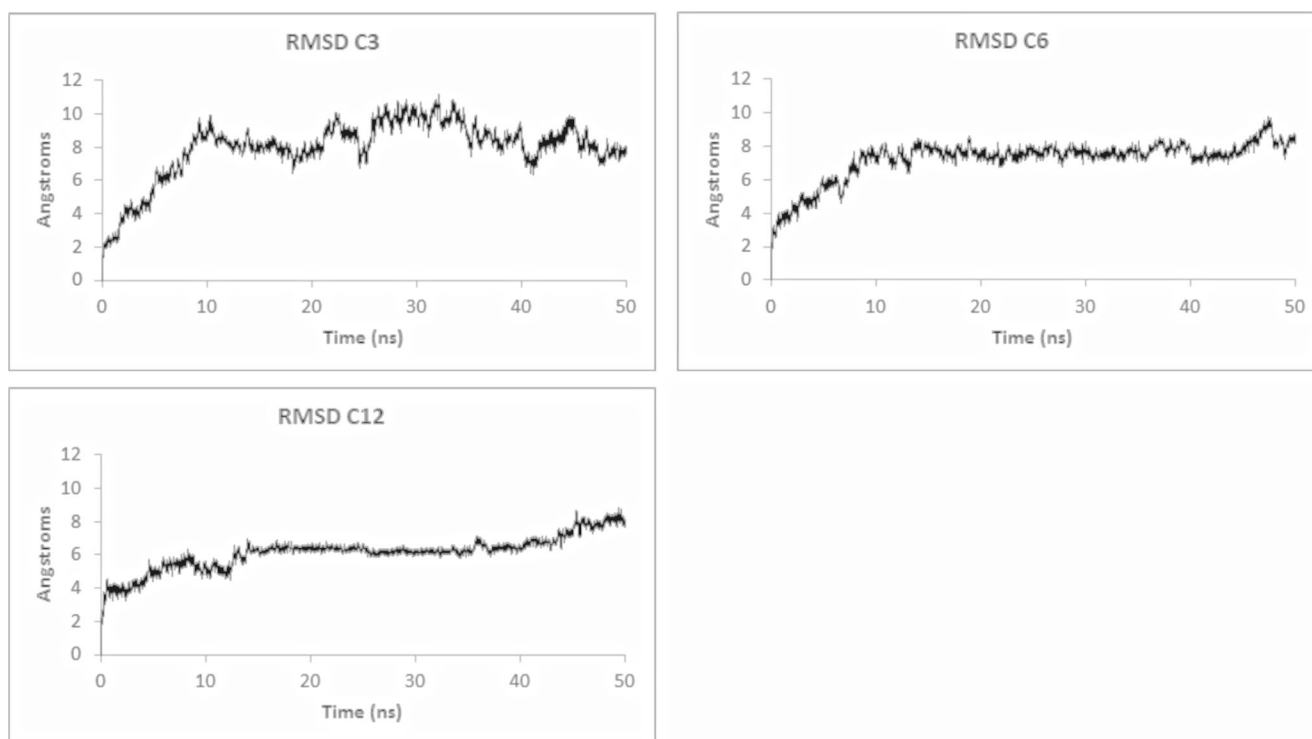


Fig. 1 RMSD C3, C6, and C12 models

Radius of gyration Model C3 expanded and contracted from approximately 25 to 45 ns. The radius of gyration of model C6 remained without change from ~12 ns to the end of the simulation time, indicating that the system does not present considerable volume changes after reaching a stable conformation. Among the three models, described here, model C12 showed the least changes in its dimensions, as evidenced by the stable radius of gyration throughout the simulation (Fig. 6).

Sequence comparison Despite the two important amino acids for the recognition process, the relevant amino acid for the affinity was Arg21 in the MVIIA and the Lys35 in RsXXVIA (Fig. 2) [3]. This could explain why RsXXVIA can inhibit the calcium influx through the Ca_v 2.2, but does not have the same affinity as MVIIA. This could be explained by the fact that if this amino acid could play this role, it is too

far from the functional dyad. This segment makes a loop not present in MVIIA that can act as a steric impediment for the relevant amino acids to exert the recognition/affinity interaction. It is not conclusive that this Lys35 in RsXXVIA acts in the same way; in fact, we can argue that this amino acid cannot interact with the channel as MVIIA does, because of the long distance to the functional dyad (Fig. 2).

In addition, C6 is the most favorable energetically (Fig. 4), but the distance between the two important amino acids (Arg21 and Tyr24) is closer than the VdW radius. This could be an impediment to have a good interaction with the target or in this case with the Ca_v 2.2, because these amino acids have different functions in the affinity/recognition interaction, as compared to the two homolog amino acids of MVIIA. However, this does not rule out this model, rather these structural characteristics could provide an explanation of the poor affinity for the channel.

Fig. 2 CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment of ω -conotoxins

Peptide sequence by MS/MS

		No.aa
MVIIC	CKGKGAP-CR-----KTMYDCCSGSCG---RRGKC	26
CVIC	CKGKGQS-CS-----KLMYDCCTGSCS---RRGKC	26
MVIIA	CKGKGAK-CS-----RLMYDCCTGSC---RSGKC	25
CVID	CKSKGAK-CS-----KLMYDCCSGSCSG--TVGRC	27
MVIIB	CKGKGAS-CH-----RTSYDCCTGSCN---RGKC	25
RsXXVIA	CKGQSCSSCSTKEFCLSKGSRLMYDCCTGSCCGVKTAGVT	40

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment of ω -conotoxins

Table 1 Possible cysteine combinations to form disulfide bonds

Label	Cysteine pairs
C1	1-26, 6-9, 15-31, 27-32
C2	1-26, 6-9, 15-32, 27-31
C3	1-26, 6-15, 9-31, 27-32
C4	1-26, 6-15, 9-32, 27-31
C5	1-26, 6-27, 9-31, 15-32
C6	1-26, 6-27, 9-32, 15-31
C7	1-26, 6-31, 9-15, 27-32
C8	1-26, 6-31, 9-27, 15-32
C9	1-26, 6-31, 9-32, 15-27
C10	1-26, 6-32, 9-15, 27-31
C11	1-26, 6-32, 9-27, 15-31
C12	1-26, 6-32, 9-31, 15-27

Among the structures developed in this work, the two models selected (C3 and C6) represent the most stable structural conformations, the energetically favorable (Fig. 4), and with structured molecules similar to those of the model (Fig. 3).

Fluctuations per amino acid for model C3 indicate that the N-terminus of the peptide is the most mobile of the amino acids of the structure, representing movements of no more than 4 Å. C6 showed considerable movements of the amino acid in position 35, whereas the movements in the rest of the molecules were not higher than 5 Å. The C12 showed a movement of ~4 Å in position 18 and a considerable movement in the C-terminal of the peptide (Fig. 7).

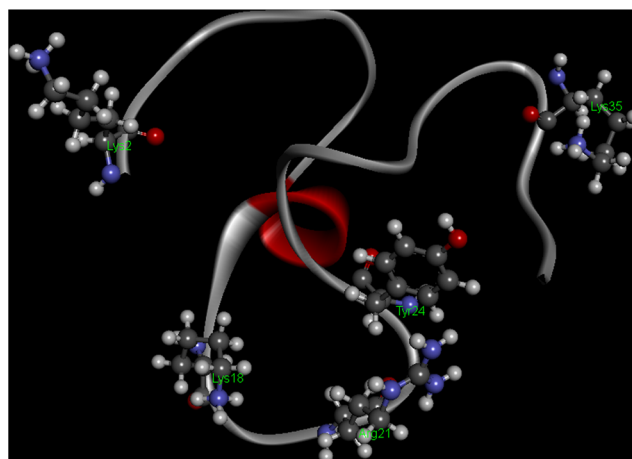
Structural alignment

We based our hypothesis of the pharmacological activity of RsXXVIA on MVIIA, because of the high similarity shared

Table 2 Electronic energies of the C1 to C12 models

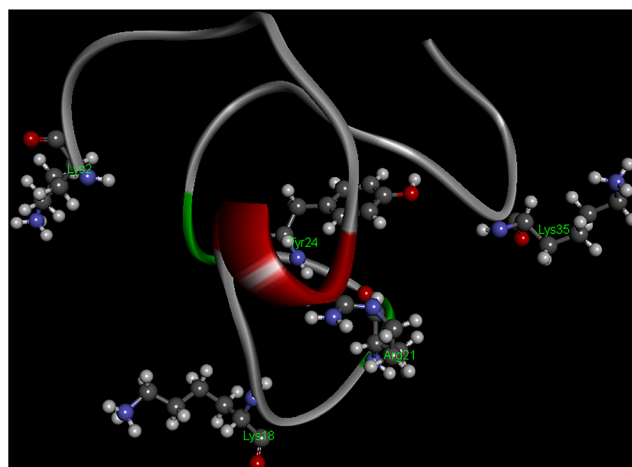
Peptide	Energy (kcal/mol)*
C7	0.0
C1	21.8
C12	65.9
C6	94.2
C3	104.5
C11	109.5
C9	116.2
C8	133.3
C10	151.8
C5	203.4
C4	240.1
C2	306.4

*Relative to the C7 model

**Fig. 3** Representation of model C3 showing the key amino acids as balls and sticks

by these two structures. Both conotoxins exert activity on the voltage gate calcium channels 2.2 but with different affinity. Model C12 depicts a stable structure and has two principal amino acids for the pharmacological activity, Lys2 and Tyr13 in MVIIA and Lys2 and Tyr24 in RsXXVIA in a good spatial disposition. Taking into account that the key amino acid for the affinity is Arg21 in MVIIA, and the equivalent one in RsXXVIA is Lys35, we could argue that this spatial position might not be the best for a strong interaction with the channel (Fig. 8). Thus, this could interfere with the activity against the channel.

On the other hand, in model C6, which is ~66 kcal/mol less stable than model C12, the amino acids responsible for the pharmacological activity (Lys2 and Tyr24) and the amino acid that could be responsible for the affinity are in an optimal position as we can find them in MVIIA. In this model, the exchange of Arg21 in MVIIA for a Lys35 in RsXXVIA in the C-terminal could be the reason of the low affinity shown by RsXXVIA for the N-type calcium channel (Fig. 9).

**Fig. 4** Representation of model C6 showing the key amino acids as balls and sticks

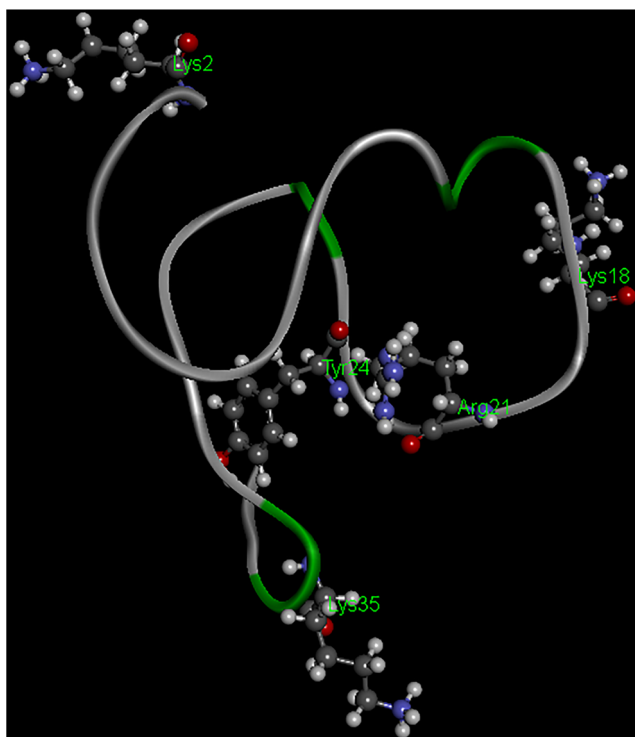


Fig. 5 Representation of C12 model showing the key amino acids as *balls and sticks*

With the aim of exploring how the side chain could be changed, we performed a further minimization of the four structures in Chimera, keeping the backbone rigid. Then, we performed an overlay with the two structures, minimized and non-minimized (Figs. 1S–4S in Supplementary Material), the relative energies for the selected models are listed in Table 3. We found that the C3 and C12 models show a big change in

the position of Tyr24 and Lys35, respectively. The change in C3 can be explained by the fact that Tyr24 is in a long loop and the change in C12 corresponded to Lys35 in the C-terminal with high conformational freedom.

Once again, the best structure was the C6 (Fig. 3S in Supplementary Material); this structure showed no drastic change in the position of the dyad or the amino acid responsible for channel affinity.

Discussion

For cone snails, toxin diversity is their biggest successful weapon against predators and competitors from the same ecological niche. This diversity has been developed through 60 million years of evolution, described by sequence differences, addition of post-translational modifications, etc. The structural framework of a conotoxin is a crucial feature of the 3D structure and, as a consequence, plays a key role to elucidate its mechanisms of activity against its target.

As of now, 26 different frameworks have been reported according to the ConoServer webpage, and each one of them is crucial to expose the perfect arrangement of amino acids to a specific physiological target [14].

There are numerous examples of conotoxins displaying different connectivity. For a toxin with two potential disulfide bonds, there are three possible Cys connectivities, named globular (1-3, 2-4), ribbon (1-4, 2-3) [28], and beads (1-2, 3-4) [29]; interestingly, no native examples of bead conotoxins have been reported. These different ways to connect the cysteines show different levels of structure, making the globular

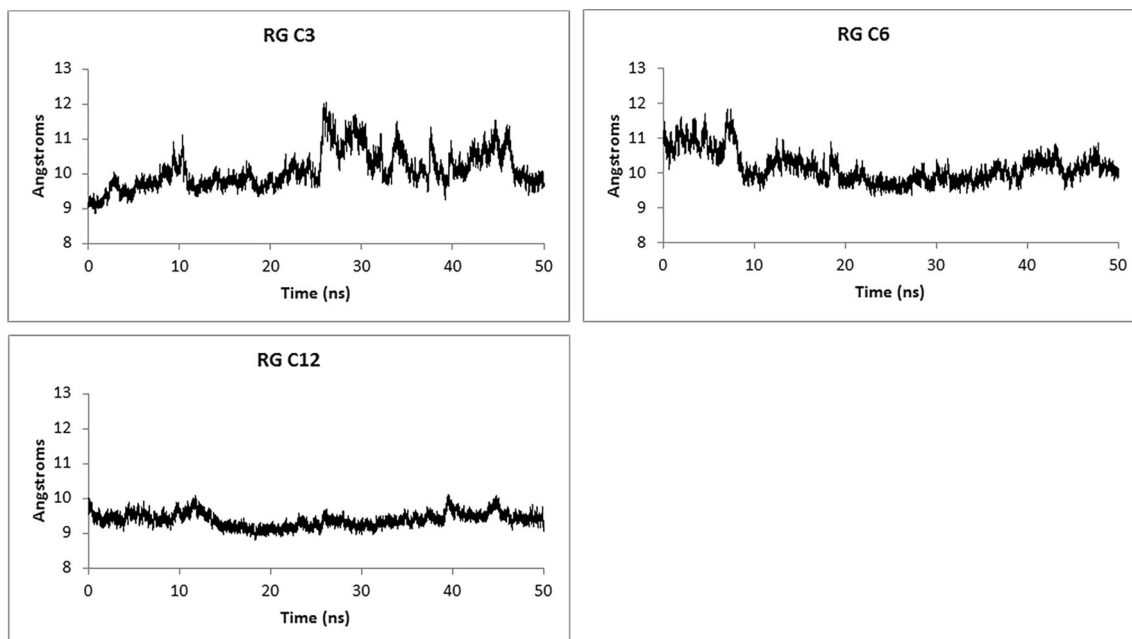


Fig. 6 Radius of gyration of models C3, C6, and C12

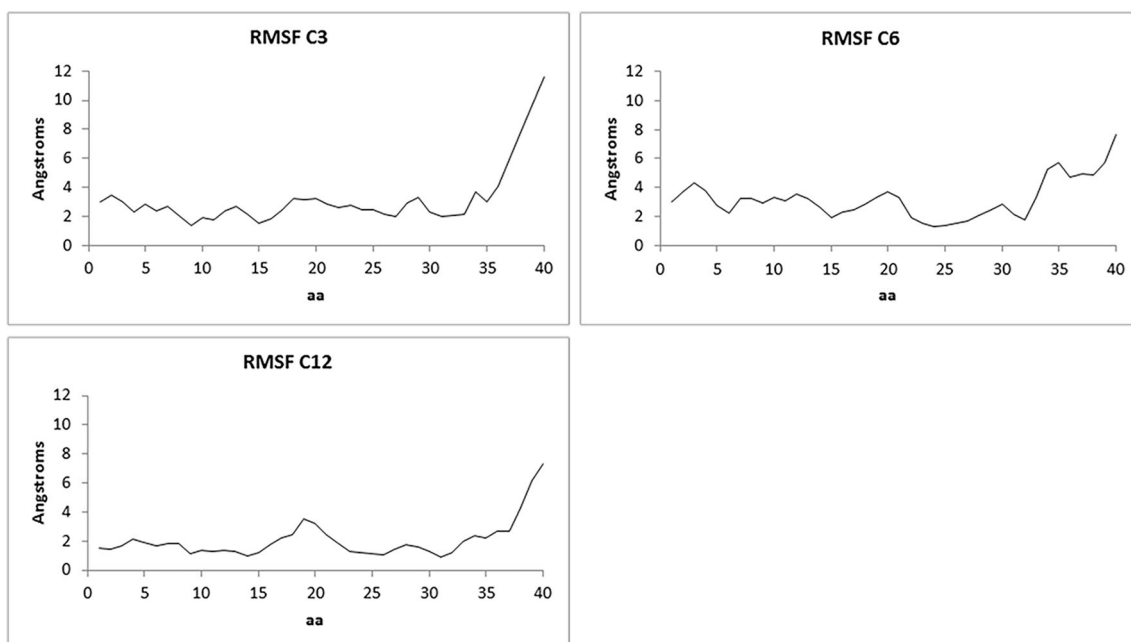


Fig. 7 RMSFs of models C3, C6, and C12

connectivity conformation more defined than the ribbon structure. There are also three-disulfide conopeptides with both sequence diversity and variations in the cysteine spacing and disulfide connectivity. In contrast, only a few conotoxins with four and five disulfide bonds are currently known [28] and only the framework XI with four disulfide bonds has the connectivity described previously (ConoServer website). In this work, we incorporated this valuable information to elucidate the possible disulfide bond connections.

The vast majority of 3D conotoxin structures deposited in the PDB have been obtained by NMR, this responds to

technical difficulties to obtain adequate crystals for X-ray diffraction experiments along with the small quantities of toxin obtained from marine cones. This emphasizes the need to predict possible 3D conotoxin structures aimed at further understanding the nature of these molecules [28].

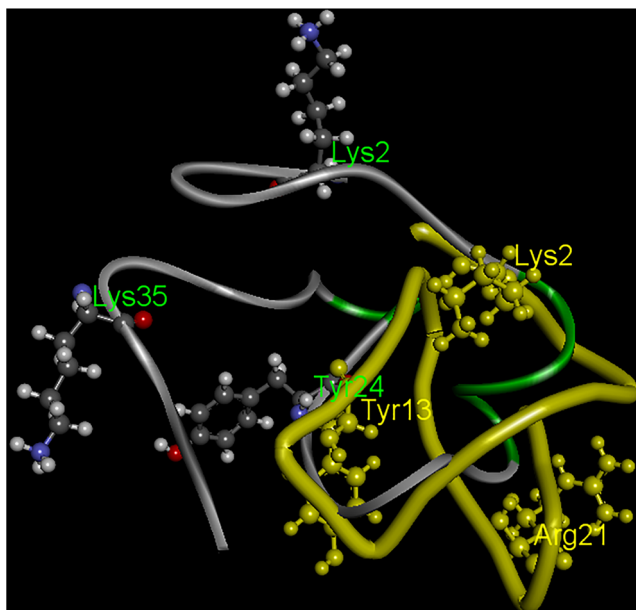


Fig. 8 Structural overlay of model C12 with MVIIA

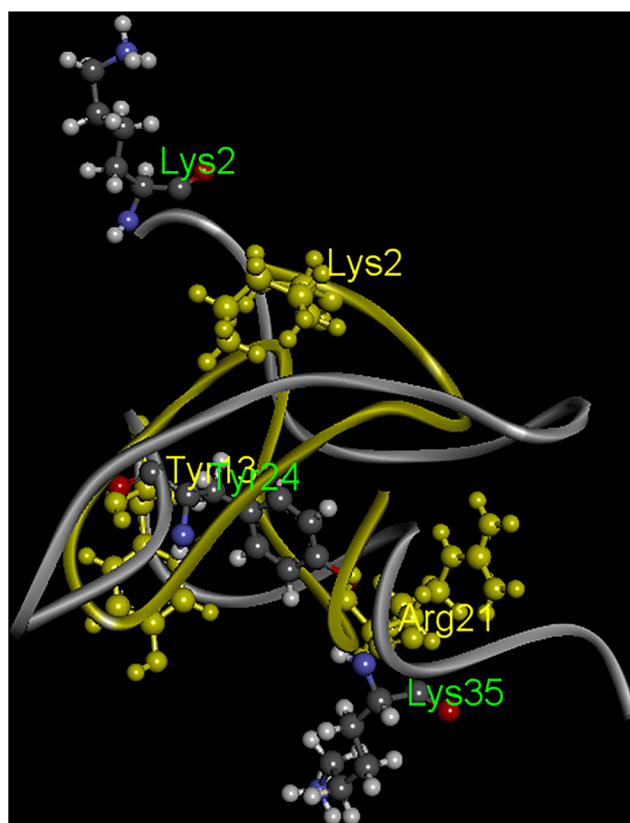


Fig. 9 Structural overlay of model C6 with MVIIA

Table 3 Energies (ΔE) and Relative energies ($\Delta\Delta E$) with reference to model 12 (1S-4S)

Model	ΔE (kcal/mol)	$\Delta\Delta E$ (kcal/mol)
Model 3	-1388.7	3.9
Model 6	-1325.9	66.7
Model 7	-1260.8	131.8
Model 12	-1392.6	0.0

Because of the abovementioned, the aim of the work presented here was to propose a 3D structural model of RsXXVIA [21]. For that purpose, taking into account that we already know one of the cysteine connectivities (by mass spectrometry, 1-5) and the fact that disulfide bonds between neighboring cysteines have not been found for conotoxins, there are a handful of possible structures. Further criteria considered were structural stability and spatial disposition of the functional dyad.

Most ω -conotoxins have two amino acids relevant for their activity on the $Ca_v2.2$, Lys2, and Tyr13 [3]. These two amino acids are conserved in our sequence, Lys in the same second position but Tyr in the 24th, making our toxin 10 amino acids longer between these two amino acids as compared to MVIIA. Another important amino acid in our sequence is Lys35, which is analogous to Arg21 in MVIIA. This amino acid is directly responsible for the affinity in most ω -conotoxins, so this change could be acting as an impediment for the adequate activity.

Based on structural overlay comparisons between RsXXVIA and MVIIA, we found structural spatial similarities and differences between the two structures, and this allowed us to rationalize and provide an explanation for the different activity shown by them.

Conclusion

RsXXVIA has a low affinity for the $Ca_v 2.2$, and this could lead us to argue the fact that this is not the target of this toxin [21]. We made multiple disulfide combinations, taking the most favorable energetically and the most similar structure to the model MVIIA, but less energetically favorable. Among the possible 3D structures here developed, one compares the best well-known ω -conotoxin MVIIA, which is the closest to our toxin. This showed us two different arrangements, where we have the following: (1) a good conventional disposition of the key amino acids for the channel recognition, and (2) the most energetically favorable structure that exhibits a long loop, which could be the reason for not having a good interaction with the channel and, likewise, could explain the low affinity. The theoretical and experimental analysis

discussed in this work point to the fact that RsXXVIA has another principal target. Previously, we discuss the need of a different target to elucidate the exact pharmacological activity. Experimental data with RsXXVIA [21] indicates that TRP's channels could be a good candidate to test this conotoxin, and if this is confirmed, RsXXVIA could be the first conotoxin with this kind of activity.

Acknowledgments This work was possible thanks to the support of the Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. This paper fulfills the requirement for the principal author to obtain the PhD degree in the Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM. This work was supported by a grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-Mexico) with the number 189808.

Compliance with ethical standards

Conflicts of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Olivera BM, Just Lecture EE (1996) Conus venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years of neuropharmacology. *Mol Biol Cell* 8(1997):2101–2109
2. Bingham JP, Mitsunaga E, Bergeron ZL (2010) Drugs from slugs—past, present and future perspectives of omega-conotoxin research. *Chem Biol Interact* 183:1–18
3. Lewis RJ, Dutertre S, Vetter I, Christie MJ (2012) Conus venom peptide pharmacology. *Pharmacol Rev* 64:259–298
4. Norton RS, Olivera BM (2006) Conotoxins down under. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 48:780–798
5. Puillandre N, Koua D, Favreau P, Olivera BM, Stocklin R (2012) Molecular phylogeny, classification and evolution of conopeptides. *J Mol Evol* 74:297–309
6. Dutertre S, Lewis RJ (2010) Use of venom peptides to probe ion channel structure and function. *J Biol Chem* 285:13315–13320
7. Mattei C, Legros C (2014) The voltage-gated sodium channel: a major target of marine neurotoxins. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 91:84–95
8. McIntosh JM, Azam L, Staheli S, Dowell C, Lindstrom JM, Kuryatov A, Garrett JE, Marks MJ, Whiteaker P (2004) Analogs of alpha-conotoxin MII are selective for alpha6-containing nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 65:944–952
9. Wang CZ, Chi CW (2004) Conus peptides—a rich pharmaceutical treasure. *Acta Biochim Biophys Sin* 36:713–723
10. Buczek O, Bulaj G, Olivera BM (2005) Conotoxins and the post-translational modification of secreted gene products. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 62:3067–3079
11. Garrett JE, Buczek O, Watkins M, Olivera BM, Bulaj G (2005) Biochemical and gene expression analyses of conotoxins in Conus textile venom ducts. *Biochem Biophys Res Commun* 328:362–367
12. Tayo LL, Lu B, Cruz LJ, Yates 3rd JR (2010) Proteomic analysis provides insights on venom processing in Conus textile. *J Proteome Res* 9:2292–2301

13. Lebbe EK, Peigneur S, Wijesekara I, Tytgat J (2014) Conotoxins targeting nicotinic acetylcholine receptors: an overview. *Marine drugs* 12:2970–3004
14. Olivera BM (2006) Conus peptides: biodiversity-based discovery and exogenomics. *J Biol Chem* 281:31173–31177
15. Woodward SR, Cruz LJ, Olivera BM, Hillyard DR (1990) Constant and hypervariable regions in conotoxin propeptides. *EMBO J* 9: 1015–1020
16. Buczek O, Olivera BM, Bulaj G (2004) Propeptide does not act as an intramolecular chaperone but facilitates protein disulfide isomerase-assisted folding of a conotoxin precursor. *Biochemistry* 43:1093–1101
17. Kaas Q, Westermann JC, Craik DJ (2010) Conopeptide characterization and classifications: an analysis using ConoServer. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 55:1491–1509
18. Craig AG, Bandyopadhyay P, Olivera BM (1999) Post-translationally modified neuropeptides from *Conus* venoms. *European journal of biochemistry/FEBS* 264:271–275
19. Prommer E (2006) Ziconotide: a new option for refractory pain. *Drugs of today* 42:369–378
20. Beal BR, Wallace MS (2016) An overview of pharmacologic management of chronic pain. *Med Clin North Am* 100:65–79
21. Bernaldez J, Roman-Gonzalez SA, Martinez O, Jimenez S, Vivas O, Arenas I, Corzo G, Arreguin R, Garcia DE, Possani LD, Licea A (2013) A *Conus regularis* conotoxin with a novel eight-cysteine framework inhibits CaV2.2 channels and displays an antinociceptive activity. *Marine drugs* 11:1188–1202
22. Luo S, Christensen S, Zhangsun D, Wu Y, Hu Y, Zhu X, Chhabra S, Norton RS, McIntosh JM (2013) A novel inhibitor of $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptors from *Conus vexillum* delineates a new conotoxin superfamily. *PLoS One* 8: e54648
23. Zhang Y, Chen HS, Liu BX, Zhang CR, Li XF, Wang YC (2010) Melting of (MgO)(n) (n=18, 21, and 24) clusters simulated by molecular dynamics. *J Chem Phys* 132:194304
24. Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14:33–38 **27-38**
25. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25: 1605–1612
26. Lee S (2013) Pharmacological inhibition of voltage-gated Ca(2+) channels for chronic pain relief. *Curr Neuropharmacol* 11:606–620
27. Kaas Q, Westermann JC, Halai R, Wang CKL, Craik DJ (2008) ConoServer, a database for conopeptide sequences and structures. *Bioinformatics* 24:445–446
28. Daly NL, Craik DJ (2009) Structural studies of conotoxins. *IUBMB life* 61:144–150
29. Dutton JL, Bansal PS, Hogg RC, Adams DJ, Alewood PF, Craik DJ (2002) A new level of conotoxin diversity, a non-native disulfide bond connectivity in α -conotoxin AuIB reduces structural definition but increases biological activity. *J Biol Chem* 277:48849–48857

ANEXO II

Article

A *Conus regularis* Conotoxin with a Novel Eight-Cysteine Framework Inhibits Ca_v2.2 Channels and Displays an Anti-Nociceptive Activity

Johanna Bernáldez¹, Sergio A. Román-González², Oscar Martínez¹, Samanta Jiménez¹, Oscar Vivas³, Isabel Arenas³, Gerardo Corzo⁴, Roberto Arreguín², David E. García³, Lourival D. Possani⁴ and Alexei Licea^{1,*}

¹ Molecular Immunology and Biotoxins Laboratory, Marine Biotechnology Department, Scientific Research and High Education Center from Ensenada (CICESE), Carretera Ensenada-Tijuana #3918, Zona Playitas, Ensenada 22860, Mexico; E-Mails: jbernal@cicese.edu.mx (J.B.); omgalvan13@yahoo.com.mx (O.M.); mjimenez@cicese.edu.mx (S.J.)

² Chemistry Biomacromolecules Department, Chemistry Institute, National Autonomous University of Mexico, Av. Universidad 3000, Ciudad Universitaria, PO BOX 70-213, D.F. 04510, Mexico; E-Mails: arg291178@yahoo.com (S.A.R.-G.); arrespin@unam.mx (R.A.)

³ Physiology Department, Medicine Faculty, National Autonomous University of Mexico, Av. Universidad 3000, Ciudad Universitaria, PO BOX 70-250, D.F. 04510, Mexico; E-Mails: oscarlvivasr@msn.com (O.V.); arenas_isabel17@hotmail.com (I.A.); erasmo@unam.mx (D.E.G.)

⁴ Department of Molecular Medicine and Bioprocesses, National Autonomous University of Mexico, Av. Universidad 2001, C.P. 510-3, Cuernavaca 61500, Mexico; E-Mails: corzo@ibt.unam.mx (G.C.); possani@ibt.unam.mx (L.D.P.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: alicea@cicese.mx; Tel./Fax: +52-646-1750-500 (ext. 27201).

Received: 7 February 2013; in revised form: 5 March 2013 / Accepted: 18 March 2013 /

Published: 8 April 2013

Abstract: A novel peptide, RsXXIVA, was isolated from the venom duct of *Conus regularis*, a worm-hunting species collected in the Sea of Cortez, México. Its primary structure was determined by mass spectrometry and confirmed by automated Edman degradation. This conotoxin contains 40 amino acids and exhibits a novel arrangement of eight cysteine residues (C-C-C-C-CC-CC). Surprisingly, two loops of the novel peptide are highly identical to the amino acids sequence of ω -MVIIA. The total length and disulfide pairing of both peptides are quite different, although the two most important residues for the

described function of ω -MVIIA (Lys2 and Tyr13) are also present in the peptide reported here. Electrophysiological analysis using superior cervical ganglion (SCG) neurons indicates that RsXXIVA inhibits $Ca_v2.2$ channel current in a dose-dependent manner with an EC_{50} of 2.8 μ M, whose effect is partially reversed after washing. Furthermore, RsXXIVA was tested in hot-plate assays to measure the potential anti-nociceptive effect to an acute thermal stimulus, showing an analgesic effect in acute thermal pain at 30 and 45 min post-injection. Also, the toxin shows an anti-nociceptive effect in a formalin chronic pain test. However, the low affinity for $Ca_v2.2$ suggests that the primary target of the peptide could be different from that of ω -MVIIA.

Keywords: *Conus regularis*; nociceptive; calcium channel; eight-cysteine toxin and conotoxins

1. Introduction

Conotoxins from cone snails are interesting molecules with a diverse human therapeutic potential, such as anti-nociceptive, antiepileptic, cardio- and neuro-protective activity [1]. They have also become useful tools for research into cancer, neuromuscular and psychiatric disorders [2]. These peptides are potent and highly selective blockers or modulators of ion channel function involved in such disorders. The assessment of the genus *Conus* is the largest single genus of venomous animals known, with around 700 species; considering the fact that each species could express between 100 and 200 venom peptides, it has been estimated that the number of different peptides that can be expressed is at least 70,000 [3]. This could be translated to a surprising amount of different molecules that have been or will be discovered for different molecular targets.

The structural diversity of such peptides is exhibited at different levels. In addition to highly diverse sequences, these peptides also have a large array of post-translational modifications and highly different cysteine frameworks and disulfide linkages [4]. Among many intriguing features of conotoxins, the cysteine patterns are of special interest, because they are conserved within the conotoxin families and most important, they define the three-dimensional structure of the native peptide. To date, 23 cysteine frameworks have been identified [5]. In this paper, we propose a new cysteine family framework, which should correspond to the number XXIV, according to the conotoxin family nomenclature [6–8].

The largest and most extensively characterized group of conotoxin peptides that block calcium channels are the ω -conotoxins. The family members of this group contain from 24 to 27 amino acid residues crosslinked by the same type of disulfide arrangements. Usually, they show three particular intramolecular disulfide bounds, which also are known as the four-loop Cys scaffold [9]. They are found in the venom of piscivorous (fish hunters), vermivorous (worm hunters) and molluscivorous (mollusk hunters) cone snails. The most extensively analyzed ω -conotoxin to date is ω -MVIIA, which blocks $Ca_v2.2$ ion channels. This conotoxin has been approved by the FDA as a non-opioid analgesic peptide against long-term neuropathic pain in human, under the commercial name of Prialt [10].

However, a non-classical ω -conotoxin has been demonstrated to have activity on calcium ion channels. This newly reported peptide toxin does not have any similarity on primary structure with

conventional ω -conotoxins [11]. Therefore, this opens the possibility that not only ω -conotoxins may interact with calcium ion channels.

In the present study, we report the biochemical and functional characterization of the first *Conus regularis* conotoxin (RsXXIVA) isolated from the venom duct. RsXXIVA shows novel eight-Cys patterns and in addition, a section of its primary structure is highly identical to the residues forming two loops of ω -MVIIA. RsXXIVA was tested on rat superior cervical ganglion (SCG) neurons, where it inhibited $Ca_v2.2$ calcium currents. Furthermore, it also showed an analgesic effect on mice by using the hot-plate and formalin tests.

2. Materials and Methods

2.1. Specimen Collection and Venom Extraction

The venom of *Conus regularis* was extracted from the venom duct of 20 specimens collected on the coastal region of the Sea of Cortez, México. It was homogenized in 1 mL of an aqueous solution of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA), defined here as solution A. The homogenate was centrifuged at $10,000\times g$ for 5 min at room temperature. After centrifugation, the supernatant was separated, lyophilized and stored at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ for further experiments.

2.2. Chemicals, Solvents and Materials

In the sample preparation, all solvents (HPLC grade), chemicals and proteins were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and used as supplied, unless otherwise stated. ZipTips with C_{18} resin were purchased from Millipore (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.3. Peptide Purification

The soluble venom was separated by means of reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) using an analytical C_{18} column (Vydac 218TP54; 4.6×250 mm, $5\text{ }\mu\text{m}$ particle size). Samples were loaded with solution A, and the venom components were eluted with a linear gradient from 0% to 60% of solution B (0.12% TFA in acetonitrile) at a flow rate of 1 mL min^{-1} . Major protein fractions were selected and further separated in a second HPLC step to obtain pure peptides. In particular, the peptide RsXXIVA was obtained at the elution time of 20 min using a micro bore C_{18} column (1.0×250 mm, $5\text{ }\mu\text{m}$) with a linear gradient from 10% to 30% of solution B, at a flow rate of $200\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$. In all cases, separation procedures were conducted at room temperature over 60 min, and the absorbance was monitored at 230 nm.

2.4. Amino Acid Sequencing

The primary structure of RsXXIVA was determined by mass spectrometry and confirmed by automated Edman degradation. All mass spectrometry-collision-induced dissociation-ion mobility-mass spectrometry (MS-CID-IM-MS) experiments were performed using a SYNAPT G2 high definition mass spectrometer (HDMS) equipped with a nanoelectrospray ion source and a MassLynx data processor (Waters Corp., Milford, MA, USA). The instrument acquisition parameters used were as

follows: an inlet capillary voltage of 1.85 kV, a sampling cone setting of 40 V and a source temperature of 100 °C. The argon pressure in the traveling wave ion guide trap (TWIG-trap) and the traveling wave ion guide transfer (TWIG-transfer) were 2.44×10^{-2} and 2.61×10^{-2} mbar, respectively. The wave height, the wave velocity and the nitrogen pressure in the traveling wave (TW) IM drift cell were 32.0 V, 850 m/s and 2.96 mbar, respectively. Samples were directly infused into the mass spectrometer at a rate of 0.5–0.8 $\mu\text{L}/\text{min}$. All IM-MS data were acquired in a period of 2 min. All fragmentation was carried out by collision of ions with argon. The collision energy for CID was optimized for each peptide and charge state. The trap collision voltage generally falls in a range from 23 to 50 V. Amino acid sequencing was performed with an automatic gas-phase protein sequencer (LF-3400D TriCart with high sensitivity chemistry; Beckman Coulter, Fullerton, USA).

2.5. Data Analysis

All data processing was conducted using the software, Waters MassLynx v4.1 and DriftScope v2.1. The ion spectra were manually interpreted. To expedite manual interpretation and sequence assignment of mass spectra, an arbitrary cutoff threshold of 10% relative abundance was used in peak assignment for MS-CID-MS experiments, as well as for extracted product ion spectra from MS-CID-IM-MS experiments. Internal fragment ions with a S/N > 3 and an isotope cluster were assigned based on theoretical peak lists generated from the Protein Prospector MS-Product software (UCSF, San Francisco, CA, USA). Internal calibration based on b- and y-type ion masses, as well as an external calibration of the instrument, was utilized to accurately assign all mass/charges.

2.6. Culture of SCG Neurons

SCG neurons were enzymatically dissociated from 5-week male rats (Wistar). Animals were used in accordance with the procedures approved by the Official Mexican Norm NOM 0062-ZOO-1999-entitled technical specifications for the production, care and use of laboratory animals. After dissection, ganglia were desheathed, cut into 8 to 10 small pieces and transferred to a modified Hanks solution containing 20 U/mL of papain. After 20 min at 37 °C, the solution containing papain was replaced with a new solution containing 1 mg/mL of collagenase type I and 10 mg/mL dispase. Ganglia were incubated for 40 min in this solution and mechanically dissociated every 20 min. Later, the preparation was centrifuged and resuspended twice in Leibovitz's L-15 medium and once in Dulbecco's modified Eagle's medium, both supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum and 1% penicillin–streptomycin. Cells were plated on polystyrene culture dishes coated with poly-L-lysine and stored in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in air at 37 °C. Neurons were studied between 15 and 24 h after plating. All recordings were obtained at room temperature (19 to 22 °C).

2.7. Electrophysiological Recording

Neurons were constantly perfused during recording (1–2 mL/min) with a solution designed to isolate ion currents flowing through Ca_v2.2 (N-type) calcium channels. Ca_v2.2 calcium channel current was defined as the component of the current sensitive to 100 μM Cd²⁺ in the presence of 5 μM nifedipine [12]. The bath solution contained (in mM) 160 NaCl, 2.5 KCl, 10 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane

sulfonic acid (HEPES), 8 Glucose, 5 CaCl₂, 1 MgCl₂ and 0.0002 tetrodotoxin (TTX). It was adjusted to pH 7.4 with NaOH. The internal solution contained (in mM) 140 CsCl, 20 tetraethylammonium chloride (TEA-Cl), 10 HEPES, 0.1 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (BAPTA4Cs), 5 MgCl₂, 4 Mg₂ATP, 0.3 Na₂GTP and 0.1 leupeptin. This solution was adjusted to pH 7.2 with CsOH. For toxin application, peptide RsXXIVA was stored in a stock solution in distilled water at 30 μM and diluted to 0.03, 0.3, 3 and 24 μM in the external recording solution immediately prior use. The toxin was locally superfused by pressure injection using an Eppendorf 5246 transjector and a 5171 micromanipulator (Eppendorf, Madison, WI, USA) from a large borosilicate pipette (3 to 5 μm tip diameter) located 20 to 50 μm from the cell membrane. Injection pressure was set to 250 hPa, compensation pressure to 10 hPa and injection duration to 20 s. All chemicals were obtained from Sigma.

2.8. Current Measurements and Analysis

Membrane currents were measured by the whole-cell configuration of the patch-clamp technique [13], using an EPC-9 amplifier (HEKA Instruments) and borosilicate glass pipettes with a resistance of 1–2 MΩ when filled with the internal solution. Once the whole-cell configuration was established, the cells were held at –80 mV, capacity transients were cancelled and series resistance was compensated to >70%. Voltage protocols were generated and data were digitized and recorded using PULSE software (HEKA Instruments). Currents were typically low-pass-filtered at 3 kHz (3-pole Bessel filter) and were sampled at 10 kHz. Linear components were subtracted by the P/4 protocol from a holding potential of –80 mV. Since the magnitude of the Ca_v2.2 current depended on cell size, current data are presented as a normalized current density. Only spherical cells of small diameter with no visible processes were selected for recordings. Where appropriate, data was recorded as the mean ± SEM. Statistical significance was determined using the unpaired Student's *t* test. Results were considered significant if *p* < 0.05.

2.9. Experimental Animals

Adult male imprinting control region (ICR) mice weighing 23 ± 2 g were maintained in cages with a 12/12-h light/dark cycle and constant room temperature (23 ± 2 °C), with standard laboratory food and water *ad libitum*. Animals were acclimatized at least 30 min before testing. Each animal was used only once. The protocols were approved by the ethics committee of the Instituto de Biotecnología of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), campus Morelos and were carried in accordance with the current guidelines for the care of laboratory animals and the ethical guidelines for investigation of experiments in conscious animals. The number of animals and intensity of noxious stimuli were the minimum necessary to demonstrate consistent effects of toxin and drug treatments.

2.10. Hot-Plate Test

A hot-plate test was used for measuring the potential anti-nociceptive effect of RsXXIVA to an acute thermal stimulus [14]. The animals were allowed to acclimate an hour before testing. Three animals per group were used; each group was intraperitoneally (IP) injected with either 0.85 mg/kg of RsXXIVA or a control solution (phosphate buffered saline (PBS) 1× or Nalbufin 4 mg/kg). Each

animal was tested twice, 30 and 45 min post-injection. A single animal was placed in a plexiglass cylinder (20 × 25 cm) on the hot plate (Harvard Apparatus, Panlab model LE7406) maintained at 55 °C. The time taken for the animals to lick its paws or jump was registered immediately after placing the animal into the cylinder. The cutoff time was 30 s to avoid tissue damage. Nalbufin is an opioid analgesic drug, and it was used as a positive control, because it has less respiratory depression effects than other opioid drugs.

2.11. Formalin Test

The formalin test generates a biphasic pain-like behavior; that is, a phase 1 (acute pain), characterized for a short, but immediate response lasting the first 5 min after the hind paw injection (liking and biting of the injected paw); and a phase 2 (chronic pain), characterized by a prolonged response starting approximately 11 min after injection. The Dubuisson and Dennis procedure was used [15], with some modifications. Briefly, adult male ICR mice (23 ± 2 g) were used and acclimatized one hour before the test; food and water were available *ad libitum*. Animals were placed one at a time in a plexiglass chamber (29 × 22 × 14 cm); each chamber had mirrors on the three sides. Either the toxin (0.85 mg/kg) or control (PBS 1× as a negative control and Ketorolac 10 mg/kg and Tramadol 5 mg/kg as positive controls) was IP injected in a volume of 200 µL. Fifteen min after injection, 20 µL of 2.5% formalin were subcutaneously (SC) injected into the plantar right hind paw, and mice were immediately placed in the plexiglass chamber. Time in seconds of hind paw licking occurring in the first minute was counted, and the same was done in five min intervals, up to 45 min post-formalin injection. Phase 1 was defined as the first 5 min following formalin injection (0–5 min), and phase 2 was defined as 11–45 min post-formalin injection.

2.12. Statistical Analysis

Hot-plate and formalin test data were reported as the mean ± SEM. The anti-nociceptive effect of RsXXIVA was statistically compared with the controls by one-way ANOVA, followed by an unpaired *t* test (two-tail), where *p* < 0.05 was considered as significant. Statistical analyses were performed by using the GraphPad Prism software (GPW5-050878-RAF-4725).

3. Results

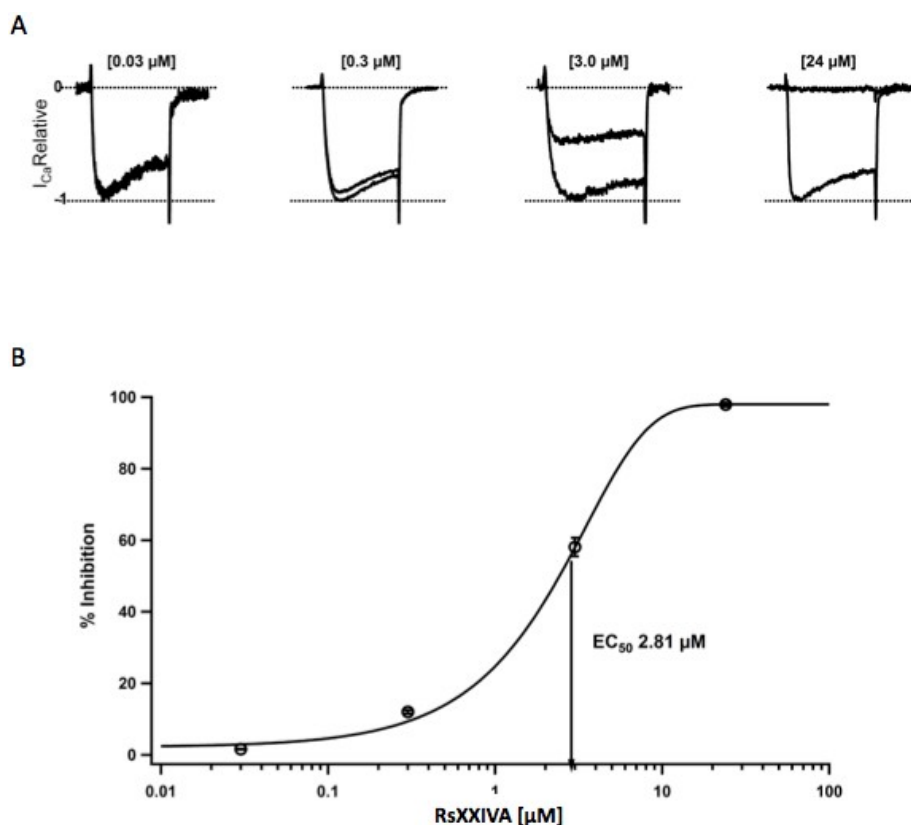
3.1. Isolation and Sequence of the Native Peptide

From the crude venom of *C. regularis*, a component of 4121.5 Da was identified and purified (Figure 1A,B). It represented 7% of the total venom components determined by its relative peak area compared to the total area of the HPLC fractions. After analysis by Edman degradation and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), its primary structure was determined (Figure 1C). This toxin has a new Cys framework, C-C-C-C-CC-CC, which has never been reported before. Based on the nomenclature of Olivera and Cruz [16], this conotoxin was named RsXXIVA, where “Rs” refers to the specie’s name, *C. regularis*, the number, “XXIV”, specifies the type of Cys framework (C-C-C-C-CC-CC) and “A” stands for the letter assigned to the first peptide isolated within this new cysteine framework.

3.2. Effects of Toxin RsXXIVA on $Ca_v2.2$ Calcium Channel Current

Since it is well known that MVIIA inhibits $Ca_v2.2$ channels [19], it was decided to observe the effect of peptide RsXXIVA on the same type of ion-channel. Thus, the effect of RsXXIVA was assessed on neurons from the superior cervical ganglion, since the $Ca_v2.2$ current represents >90% of the total calcium current in this preparation [20–22]. $Ca_v2.2$ currents were elicited by 30 ms depolarization at -10 mV under whole cell configuration. RsXXIVA inhibited $Ca_v2.2$ current accordingly with its similarity to MVIIA conotoxin. Figure 3A shows the superimposed relative calcium currents before and during application of different concentrations of RsXXIVA. As expected, $Ca_v2.2$ current inhibition was dependent on the concentration of RsXXIVA. That is, when 0.03, 0.3, 3 and 24 μM of RsXXIVA was applied to neurons, calcium currents were inhibited by 1.6 ± 0.1 , 12.0 ± 0.5 , 58.1 ± 2.6 and $97.9 \pm 0.5\%$ (Figure 3A, $n = 5$), respectively. The dose-response data was fit by a single sigmoid curve with a value of EC_{50} equal to 2.8 μM (Figure 3B) and a Hill coefficient of 0.94, which suggests a molar ratio 1:1 of ligand/receptor.

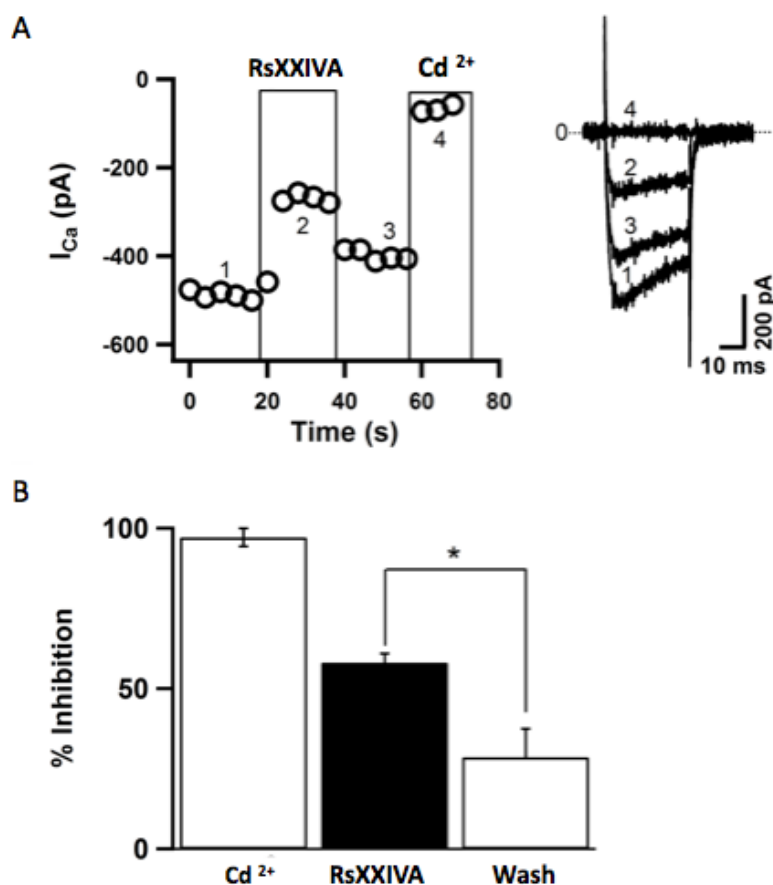
Figure 3. Dose-response relationship for calcium current inhibition by RsXXIVA from *C. regularis* venom. (A) Relative superimposed calcium current traces under control conditions and under RsXXIVA application at different concentrations are shown at the top of every current trace. Dotted lines correspond to the zero current and the maximum current. (B) Symbols represent the average percentage of current inhibition at each toxin concentration, plotted on a semi-logarithmic scale. Data were fitted to a sigmoid function (solid line), with the following equation: $y = [(A_1 - A_2) / \{1 + ([Tx]/[Tx]_0)^n\}] + A_2$. The midpoint value, $[Tx]_0$, was 2.8 μM , which corresponds to EC_{50} , and the Hill coefficient calculated from this set of data was $n = 0.94$.



This concentration is quite high, when compared to the values found for other conotoxins affecting ion-channels [23]. For this reason, we have decided to conduct experiments related to analgesia, as described below.

Figure 4 shows the time course of the effect of 3 μM toxin RsXXIVA on $\text{Ca}_v2.2$ currents. Here, toxin was applied for 20 s with a micro-perfusion system, as described in the Material and Methods section. $\text{Ca}_v2.2$ currents were measured as the average of inward current between 4 and 5 ms elicited by the test pulse every 4 s before, during and after toxin application. RsXXIVA inhibited $\text{Ca}_v2.2$ current in less than 4 s, and its effect was partially washed out, as can be seen in Figure 4A. After toxin washout, the current was restored quickly, from -442.9 ± 213.8 pA to -798.2 ± 313.4 pA ($n = 5$). Figure 4B summarizes the percentage of inhibition ($58.1\% \pm 2.6\%$) and recovery ($71.4\% \pm 8.8\%$) compared to the block with 100 μM Cd^{2+} . These results show that the toxin RsXXIVA inhibits $\text{Ca}_v2.2$ channels, despite its different cysteine framework, and it is partially reversible. Although the EC_{50} of RsXXIVA was high for inhibiting $\text{Ca}_v2.2$ when compared to the EC_{50} values of other conotoxins [11], it was decided to conduct experiments related to analgesia.

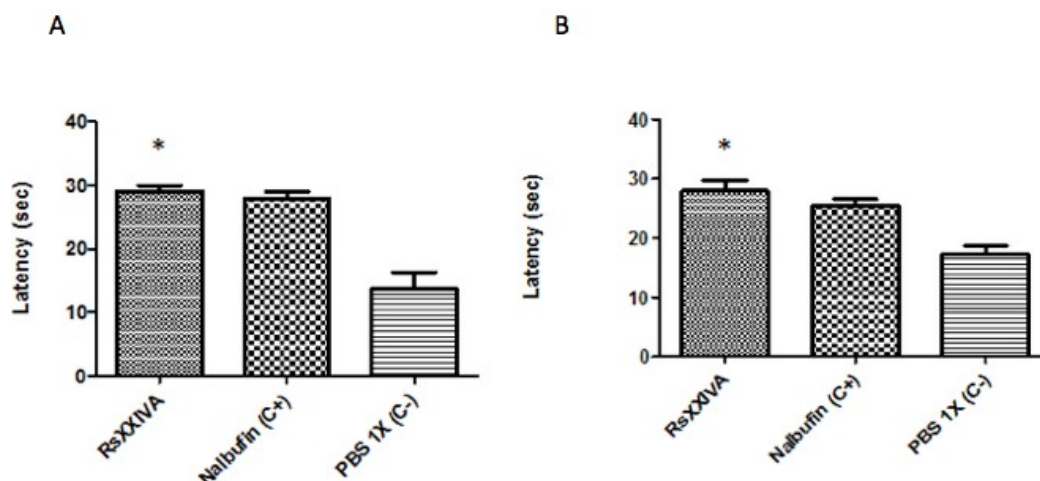
Figure 4. Time course of $\text{Ca}_v2.2$ current inhibition by application of 3 μM of RsXXIVA in rat superior cervical ganglion (SCG) neurons. (A) Symbols are mean calcium currents of the test pulse before (1), during (2) and after (3) toxin application. The test pulse was delivered every 4 s, and at the end of the experiment, 100 μM CdCl_2 was applied (4). The inset is representative of calcium currents for each condition. (B) The summary of inhibition and recovery (wash) of calcium current under toxin RsXXIVA application. * Represents $p < 0.05$.



3.3. Analgesic Activity of RsXXIVA

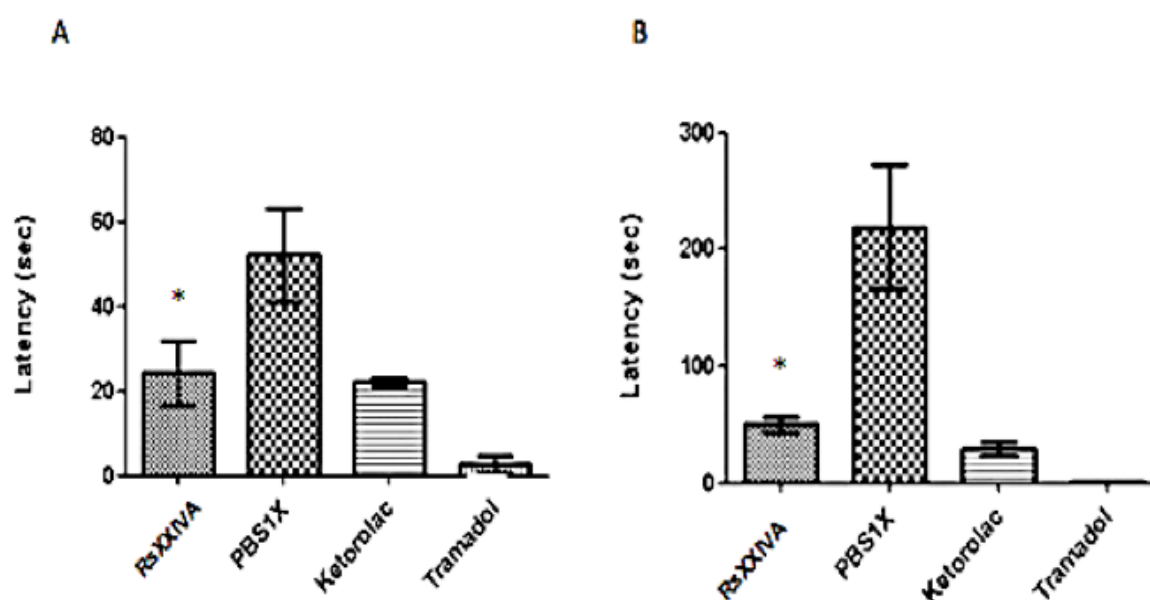
To test whether RsXXIVA has an effect on acute thermal pain, the hot-plate set-up system was used. Mice were placed on a hot plate at 55 °C until they started licking or lifting their hind paws as an indication of acute thermal pain. RsXXIVA, showed a similar effect as Nalbufin, which is a potent analgesic drug. The analgesic effect of RsXXIVA was detected after 30 (Figure 5A) and 45 (Figure 5B) min post injection, and in both cases, the analgesic effect was better than that of Nalbufin and significantly better than the control group ($p < 0.05$).

Figure 5. Effect of RsXXIVA (0.85 mg/kg intraperitoneal (IP)) in the hot-plate test. Adult male imprinting control region (ICR) mice where IP injected with 200 μ L of either toxin or Nalbufin (4 mg/kg) as the positive control and PBS 1 \times as the negative control. Data are expressed as the mean \pm SEM ($n = 3$). (A) The biological effect of RsXXIVA at 30 min post-injection. RsXXIVA shows (with 95% CI = 28.29 ± 3.35) an analgesic effect in acute thermal pain at 30 min post-injection in reference to the control group. (B) The biological effect of RsXXIVA 45 min post-injection. RsXXIVA shows an analgesic effect in acute thermal pain at 45 min post-injection (with 95% CI = 28.10 ± 3.71). Data were compare by one-way ANOVA, followed by Dunnett's multiple comparison test * represents $p < 0.05$, considered as significant.



Also, we assessed the analgesic effect of RsXXIVA in a model of persistent inflammatory pain in mice using the formalin test. RsXXIVA significantly reduced the hind paw licking during both phase 1 (Figure 6A) and phase 2 (Figure 6B), compared with the control group. In accordance with the pain model, the acute pain phase 1 pain is caused by a direct effect on nociceptors, whereas chronic pain phase 2 pain is caused by chronic inflammatory responses [24]. As it can be seen, RsXXIVA had a similar effect as Ketorolac, which is not a steroidal drug to treat acute and chronic pain related to inflammatory events.

Figure 6. Effect of RsXXIVA (0.85 mg/kg IP) in formalin test. Adult male ICR mice were subcutaneously (SC) injected with 2.5% formalin (20 μ L) 15 min before IP administration of 200 μ L of either toxin or control Ketorolac (10 mg/kg) and Tramadol (5 mg/kg) as the positive control and PBS 1 \times as the negative control. Data are expressed as the mean \pm SEM ($n = 3$). (A) The biological effect during phase 1 (0–5 min). RsXXIVA reduced the licking time compared with the control group (with 95% CI = 24.33 \pm 14.69), reflecting activity in response to acute pain. (B) The biological effect during phase 2 (11–45 min). RsXXIVA appeared to have an anti-nociceptive effect compared with the control group (with 95% CI = 50.05 \pm 13.33), which reflects chronic pain. Data were analyzed with one-way ANOVA, followed by Dunnett's multiple comparison test. * Represents $p < 0.05$, considered as significant.



4. Discussion

Conus regularis is a vermivorous cone snail species whose venom components have not been previously explored. This novel peptide, RsXXIVA, has a unique eight-cysteine pattern (C-C-C-C-CC-CC), which clearly diverges from other known conotoxins. Classical ω -conotoxins show highly conserved residues, such as Lys2 and Tyr13. Lys 2 is present amongst all ω -conotoxins, except MVIID and TVIA, and Tyr13 is unequivocally the single most important residue for binding *N*-type calcium ion channels [17]. Remarkably, RsXXIVA has equivalent residues to Lys2 and Tyr13 (Lys2 and Tyr24, Figure 2) [25]. The key residues (Lys and Tyr) appear in different position between ω -conotoxins and RsXXIVA, in loops 1 and 2 in ω -conotoxins and in loops 1 and 4 in RsXXIVA. On the other hand, these residues are flanked by the same amino acids in both toxins. Further modeling or structural analysis certainly will clarify if these Lys and Tyr residues share the same structural positions in both RsXXIVA and MVIIA.

Conotoxins containing four disulfide bonds have been relatively less explored. In fact, with the identification of RsXXIVA, only seven different peptides with four disulfide bonds have been reported [25–30]. The most extensively studied four disulfide bond conotoxin group is the I-superfamily

group [31]. In fact, only the disulfide bond connectivity of the conotoxins ι -RXIA, belonging to this I-conotoxin group, has been determined [26].

The studies of ω -conotoxin MVIIA and its effectiveness as an analgesic drug favored is commercial application (Prialt, under FDA approval). However, serious side effects have been observed in its use. As a result, warnings regarding the unsuitability of this drug for use in patients with a pre-existing history of psychosis have been implemented [32]. The on-going discovery of novel peptides with analgesic effects, acting on calcium channels, such as the ω -conotoxins, may provide the necessary insight for the development of new drugs targeting Ca^{2+} channels for pain treatment. This could increase drug potency and receptor targeting in humans, while minimizing their potentially adverse side effects.

At present, there are few available drugs that target calcium channel receptors for pain treatment (*i.e.*, Prialt, Gabapentin and Pregabalin). Conversely, while several drugs that affect Ca^{2+} channels might be in development, there are few new voltage gated calcium channel (VGCC) blockers in clinical trials. Therefore, there is an urgent need for the development of new drugs targeting Ca^{2+} channels for pain treatment. Hereby, our results show that $\text{Ca}_v2.2$ currents are inhibited by RsXXIVA toxin in a dose-response manner and a reversible manner. However, as already mentioned earlier, the affinity is not as high as expected, and it could well be that the exact target of RsXXIVA is not the $\text{Ca}_v2.2$ ion channel. For this reason, experiments showing analgesic effects were conducted. In fact, our results support the conclusion that RsXXIVA has an anti-nociceptive effect based on the hot-plate and formalin tests. This is in good agreement with the blockade of nociceptive neurotransmission by altering $\text{Ca}_v2.2$ channel function or any of the other channels described to be involved in analgesia. The high density of $\text{Ca}_v2.2$ channels at the ganglionic level and presynaptic terminals is well-documented [33], and for this reason, these channels could be used as a molecular target for pain *in vitro* experiments. In our model, SCG neurons are the most used native preparation to assess $\text{Ca}_v2.2$ (N-type) channel function, due to their richness of these receptors (>90%). The remaining Ca^{2+} channels (5%–10%) were readily eliminated by nifedipine. In our hands, toxin was applied to SCG cultured cells at a relatively high concentration (3 μM), a value near the EC_{50} , by means of a high-precision micro-perfusion system. In contrast, previous studies indicated that MVIIA was markedly more potent (IC_{50} 32 nM) when assayed in a similar model [34]. This different rank-order of activity could be supported with the net charge distribution in both conotoxins, which is an important factor that may affect the binding potencies. The net charge for MVIIA is +5 and for RsXXIVA is +2.6. It has been considered that there is a threshold net charge for the binding of a toxin to the target, for example, loss of any single charged residue in ω -conotoxin GVIA (net charge of +5) results in a drop in potency as the net charge is reduced to only +4 [35].

The fast installation of the inhibition of the $\text{Ca}_v2.2$ channel current induced by RsXXIVA indicates a direct action on the receptors. Unexpectedly, the inhibition of the $\text{Ca}_v2.2$ channel current occurred reversibly. This is also in favor of the rapid access of the toxin to the binding site on the channel molecule. Again, the channel pore is a feasible candidate for toxin action. Direct VGCC blockade or modulation will always have a place in the treatment of neuropathic pain.

Further investigation should be made, however, to clarify the mechanistic action of RsXXIVA toxin, which is beyond the scope of this communication. Whatever the mechanism turns out to be, the inhibition observed on the $\text{Ca}_v2.2$ channel current, along with the anti-nociceptive actions supported by the pain tests, justifies the use and possible relevance of RsXXIVA in future investigations related

to pain control. Most toxins that blocks $\text{Ca}_v2.2$ channels, do not have anti-nociceptive action when IP administration is used; this is not the situation for RsXXIVA. Even when RsXXIVA is able to block $\text{Ca}_v2.2$ channels, it seems unlikely that these $\text{Ca}_v2.2$ channels could be the targets for the anti-nociceptive effect of this toxin *in vivo*. Further assays should be done on peripheral nociceptive targets, such as the Transient Receptor Potential channel.

5. Conclusions

This manuscript describes the isolation and characterization of a new peptide (RsXXIVA) from the venomous duct of the vermivorous marine cone snail *Conus regularis*, collected along the Pacific coast of Mexico. The peptide shows a novel cysteine disulfide pairing and a segment composed of 14 amino acid residues identical to that of the analgesic peptide MVIIA (known as Prialt) from *C. magus*. RsXXIVA shows nociceptive properties suggesting that it might be implicated in Ca_v ion channels function. These results constitute an important piece of information for future design of analgesic peptides based on residue modifications in specific loops of proteins associated to nociception.

References

1. Han, T.S.; Teichert, R.W.; Olivera, B.M.; Bulaj, G. *Conus* Venoms—A rich source of peptide-based therapeutics. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14*, 2462–2479.
2. Twede, V.D.; Miljanich, G.; Olivera, B.M.; Bulaj, G. Neuroprotective and cardioprotective conopeptides: An emerging class of drug leads. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2009**, *12*, 231–239.
3. Craik, D.J.; Adams, D.J. Chemical modification of conotoxins to improve stability and activity. *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 457–468.
4. Olivera, B.M. *Conus* peptides: Biodiversity-based discovery and exogenomics. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 31173–31177.
5. Ye, M.; Khoo, K.K.; Xu, S.; Zhou, M.; Boonyalai, N.; Perugini, M.A.; Shao, X.; Chi, C.; Galea, C.A.; Wang, C.; *et al.* A helical conotoxin from *Conus imperialis* has a novel cysteine framework and defines a new superfamily. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 14973–14983.
6. Cruz, L.J.; Gray, W.R.; Yoshikami, D.; Olivera, B.M. *Conus* venoms: A rich source of neuroactive peptides. *J. Toxicol.* **1985**, *4*, 107–132.
7. Gray, W.R.; Olivera, B.M.; Cruz, L.J. Peptide toxins from venomous *Conus* snails. *Ann. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 665–700.
8. McIntosh, J.M.; Olivera, B.M.; Cruz, L.J. *Conus* peptides as probes for ion channels. *Methods Enzymol.* **1999**, *294*, 605–624.
9. Bingham, J.P.; Mitsunaga, E.; Bergeron, Z.L. Drugs from slugs—Past, present and future perspectives of ω -conotoxin research. *Chem. Biol. Interact.* **2010**, *183*, 83:1–83:18.
10. Kass, Q.; Westermann, J.C.; Halai, R.; Wang, C.K.; Craik, D.J. ConoServer, a database for conopeptide sequences and structures. *Bioinformatics* **2008**, *24*, 445–446.
11. Bernáldez, J.; López, O.; Licea, A.; Salceda, E.; Arellano, R.O.; Vega, R.; Soto, E. Electrophysiological characterization of a novel small peptide from the venom of *Conus californicus* that targets voltage-gated neuronal Ca^{2+} channels. *Toxicon* **2011**, *57*, 60–67.

12. Garcia, D.E.; Li, B.; García-Ferreiro, R.E.; Hernández-Ochoa, E.O.; Yan, K.; Gautam, N.; Catterall, W.A.; Mackie, K.; Hille, B. G-Protein β -subunit specificity in the fast membrane-delimited inhibition of Ca^{2+} channels. *J. Neurosci.* **1998**, *18*, 9163–9170.
13. Hamill, O.P.; Marty, A.; Neher, E.; Sakmann, B.; Sigworth, F.J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cell and cell-free membrane patches. *Pflug. Arch.* **1981**, *391*, 85–100.
14. Malmberg, A.B.; Bannon, A.W. *Current Protocols in Neuroscience*; Wiley: Bethesda, MD, USA, 1999; pp. 8.9.1–8.9.15, doi:10.1002/0471142301.
15. Dubuisson, D.; Dennis, S.G. The formalin test: A quantitative study of analgesic effects of morphine, miperidine, and brain stem stimulation in rat and cats. *Pain* **1977**, *4*, 161–174.
16. Olivera, B.M.; Cruz, L.J. Conotoxins, in retrospect. *Toxicon* **2001**, *39*, 7–14.
17. Nielsen, K.J.; Schroeder, T.; Lewis, R. Structure–Activity relationships of ω -conotoxins at N-type voltage-sensitive calcium channels. *J. Mol. Recognit.* **2000**, *13*, 55–70.
18. Kohno, T.; Kim, J.I.; Kobayashi, K.; Kodera, Y.; Maeda, T.; Sato, K. Three-dimensional structure in solution of the calcium channel blocker ω -conotoxin MVIIA. *Biochemistry* **1995**, *34*, 10256–10265.
19. Bowersox, S.S.; Luther, R. Pharmacotherapeutic potential of ω -conotoxin MVIIA (SNX-111), an N-type neuronal calcium channel blocker found in the venom of *Conus magus*. *Toxicon* **1998**, *36*, 1651–1658.
20. Mintz, I.M.; Bean, B.P. Block of calcium channels in rat neurons by synthetic ω -Aga-IVA. *Neuropharmacology* **1993**, *32*, 1161–1169.
21. Boland, L.M.; Morrill, J.A.; Bean, B.P. ω -Conotoxin block of N-type calcium channels in frog and rat sympathetic neurons. *J. Neurosci.* **1994**, *14*, 5011–5027.
22. García-Ferreiro, R.E.; Hernández-Ochoa, E.O.; García, D.E. Modulation of N-type Ca^{2+} channel current kinetics by PMA in rat sympathetic neurons. *Pflug. Arch.* **2001**, *442*, 848–858.
23. Feng, Z.-P.; Doering, C.J.; Winkfein, R.J.; Beedle, A.M.; Spafford, J.D.; Zamponi, G.W. Determinants of inhibition of transiently expressed voltage-gated calcium channels by ω -conotoxins GVIA and MVIIA. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 20171–20178.
24. Randolph, B.C.; Peters, M. Analgesic effectiveness of ketorolac compared to meperidine in the rat formalin test. *Anesth. Prog.* **1997**, *44*, 11–16.
25. Peng, C.; Liu, L.; Shao, X.; Chi, C.; Wang, C. Identification of a novel class of conotoxins defined as V-conotoxins with a unique cysteine pattern and signal peptide sequence. *Peptides* **2008**, *29*, 985–991.
26. Buczek, O.; Wei, D.; Babon, J.J.; Yang, X.; Fiedler, B.; Chen, P.; Yoshikami, D.; Olivera, B.M.; Bulaj, G.; Norton, R.S. Structure and sodium channel activity of an excitatory I_1 -superfamily conotoxin. *Biochemistry* **2007**, *46*, 9929–9940.
27. Brown, M.A.; Begley, G.S.; Czerwiec, E.; Stenberg, L.M.; Jacobs, M.; Kalume, D.E.; Roepstorff, P.; Stenflo, J.; Furie, B.C.; Furie, B. Precursors of novel Gla-containing conotoxins contain a carboxy-terminal recognition site that directs gamma-carboxylation. *Biochemistry* **2005**, *44*, 9150–9159.
28. Aguilar, M.B.; Lopez-Vera, E.; Ortiz, E.; Becerril, B.; Possani, L.D.; Olivera, B.M.; Heimer de la Cotera, E.P. A novel conotoxin from *Conus delessertii* with posttranslationally modified lysine residues. *Biochemistry* **2005**, *44*, 11130–11136.

29. Yuan, D.D.; Liu, L.; Shao, X.X.; Peng, C.; Chi, C.W.; Guo, Z.Y. Isolation and cloning of a conotoxin with a novel cysteine pattern from *Conus characteristicus*. *Peptides* **2008**, *29*, 1521–1525.
30. Elliger, C.A.; Richmond, T.A.; Lebaric, Z.N.; Pierce, N.T.; Sweedler, J.V.; Gilly, W.F. Diversity of conotoxin types from *Conus californicus* reflects a diversity of prey types and a novel evolutionary history. *Toxicon* **2011**, *57*, 311–322.
31. Kaufenstein, S.; Huys, I.; Kuch, U.; Melaun, C.; Tytgat, J.; Mebs, D. Novel conopeptides of the I-superfamily occur in several clades of cone snails. *Toxicon* **2004**, *44*, 539–548.
32. Maier, C.; Gockel, H.H.; Gruhn, K.; Krumova, E.K.; Edel, M.A. Increased risk of suicide under intrathecal ziconotide treatment?—A warning. *Pain* **2011**, *152*, 235–237.
33. Scroggs, R.S.; Fox, A.P. Calcium current variation between acutely isolated adult rat dorsal root ganglion neurons of different size. *J. Physiol.* **1992**, *445*, 639–658.
34. Sanger, G.J.; Ellis, E.S.; Harries, M.H.; Tilford, N.S.; Wardle, K.A.; Benham, C.D. Rank-Order inhibition by ω -conotoxins in human and animal autonomic nerve preparations. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *388*, 89–95.
35. Lew, M.J.; Flinn, J.P.; Pallaghy, P.K.; Murphy, R.; Whorlow, S.L.; Wright, C.E.; Norton, R.S.; Angus, J.A. Structure-function relationships of ω -conotoxin GVIA. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 12014–12023.

Samples Availability: Available from the authors.

© 2013 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).