

11281
2
2g.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

CARACTERIZACION QUIMICA Y FUNCIONAL DE
LA TOXINA HELOTERMINA DEL VENENO DE
Heloderma horridum horridum

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

P R E S E N T A

JAVIER MOCHCA MORALES

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO D.F.

1991

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

Indice

	Página
1. Generalidades	6
2. El veneno del <i>Heloderma horridum horridum</i>	6
I. Enzimas	
II. Péptidos	
III. Toxinas	
3. La Helotermina	10
4. Objetivos de esta tesis	11
5. Procedimientos en la caracterización estructural	12
Purificación de la Helotermina	
Procedimientos de química de proteínas	
Análisis de péptidos	
Secuenciación automática	
Procedimientos de Biología Molecular	
Construcción del banco de ADNc	
Clonación de la toxina HLTX	
Secuencia de ADNc de la HLTX	
Comparación de la secuencia con otras toxinas	
6. Resultados	16
Purificación de la Helotermina (anexo, trabajo publicado): "Isolation and characterization of helothermine, a novel toxin from <i>Heloderma horridum horridum</i> (Mexican beaded lizard) venom", Javier Mochca-Morales, Brian M. Martin and Lourival D. Possani. <i>TOXICON</i> <u>28</u> , 299-309 (1990).	
Purificación de péptidos	
Secuenciación de péptidos	
Análisis de secuencias similares	
7. Discusión	26
8. Resumen / Summary	29/30
9. Referencias Bibliograficas	31

Presidente: Dr. Alfonso Cárabez Trejo
Secretario: Dra. Rosario Muñoz Clares
Vocal: Dr. Baltazar Becerril Luján
Vocal: Dr. Guillermo Mendoza
Vocal: Dr. Lourival D. Possani
Suplente: Dr. Mario Calcagno Montans
Suplente: Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuente

Lugar donde se desarrolló el tema:

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA - UNAM. CUERNAVACA, MORELOS.

Sustentante:

Javier Mochca Morales

Asesor del tema:

Dr. Lourival D. Possani P.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Dr. Baltazar Becerril y al Dr. Francisco Bolívar por su apoyo y asesoría en la parte correspondiente a biología molecular.

Agradezco al Dr. Brian Martin del National Institute of Health, Bethesda, MD., USA por su colaboración en la determinación de las secuencias de la región aminoterminal de la toxina.

Finalmente agradezco de una manera especial al Dr. Lourival D. Possani por el apoyo y estímulo prestado para la realización de esta tesis.

Para la elaboración de esta tesis se contó con una beca otorgada por el CONACYT.

ABREVIACIONES UTILIZADAS EN EL TEXTO

ADNc = Acido Desoxirribonucleico Complementario

DTT = Ditioneitol

EDTA = Acido-Etilen-diamino-tetra-ácetico

HLPC = Cromatografía Líquida de alta presión

HLTX = Toxina Helotermina

PHI = Péptido Histidin Isoleucina

PCR = Reacción de la Polimerasa en Cadena

PITC = Fenilsotiocianato

PSF = Factor Secretorio Pancreático

RNAm = Acido Ribonucleico Mensajero

TFA = Acido Trifluoroácetico

TBS = Tris Amortiguado Salino

VIP = Péptido Intestinal Vasoactivo

1. Generalidades

En la actualidad la mayoría de los venenos de animales se conocen en casi todos sus aspectos biológicos más relevantes.

Los venenos de animales se han estudiado en forma multidisciplinaria debido a su importancia como problema de salud en algunas regiones del mundo.

Uno de los principales intereses en estudiar los venenos de animales es el de neutralizar medicamente sus efectos, sin embargo en su caracterización se ha encontrado que son una fuente de obtención de numerosos compuestos útiles, como herramientas en la investigación del funcionamiento de procesos biológicos, como por ejemplo la excitabilidad membranal.

Las propiedades de algunos de los venenos de reptiles y artrópodos hace que se les considere como productos de secreción de glándulas exócrinas especializadas, puesto que para algunas especies, los venenos han evolucionado como una forma de mecanismo de defensa, en respuesta biológica de adaptación.

Por otro lado el conocimiento de las estructuras de algunos de los componentes de los venenos como los inhibidores de la enzima angiotensina convertasa (ACE), han servido para el diseño de compuestos de utilidad farmacológica en el tratamiento de algunas formas de hipertensión arterial, como el captopril (Cushman y col. 1981). Esto ha iniciado el interés de encontrar componentes en los venenos cuyo estudio pudiera ser de utilidad en el diseño de fármacos de alta especificidad y con mínimo de efectos colaterales.

La información sobre la mayoría de los venenos conocidos hasta la fecha ocupa capítulos extensos en diferentes disciplinas, sin embargo existen algunas especies de animales ponzoñosos que son poco conocidos debido a su localización geográfica.

En la actualidad con el avance de las técnicas aplicadas a la caracterización estructural molecular y el impacto de la biología molecular del ADNc (ácido desoxirribonucleico complementario), se ha facilitado el estudio de componentes minoritarios en los venenos, que en algunos casos han resultado ser de una gran relevancia biológica.

2. El Veneno del Heloderma horridum horridum.

El estudio del veneno del Heloderma horridum horridum se remonta hasta 1864, con los reportes de Sumichrast, quien menciona algunos de los efectos fisiológicos del veneno (Tu, 1977). Asimismo se encuentran varias publicaciones que describen propiedades generales sobre el veneno de estos saurios, Tinkam (1956), Bogert y Martin del Campo (1956), Tu (1977).

En los últimos años el interés por estudiar el veneno de los helodermas ha aumentado, debido a que se les considera reptiles fósiles vivientes, cuyos venenos han mostrado componentes de tal singularidad que son útiles en estudios comparativos con componentes de otros venenos, desde el punto de vista evolutivo.

Alagón y col. (1982) han reportado sobre el veneno de los helodermas una caracterización general, en donde muestran por criterios electroforéticos una composición mínima de 18 componentes peptídicos en el veneno del Heloderma horridum horri-

dum. También describen algunas propiedades generales del veneno como el contenido de proteínas de 80 mg/ml, con pH de 6.9 - 7.0, y la cantidad de veneno obtenida por extracción de 0.5 ml por animal.

Los principales componentes del veneno del Heloderma horridum corresponden a enzimas, las cuales probablemente ayudan a la digestión del alimento del saurio.

Entre las actividades que se han reportado para este veneno se mencionan por ejemplo arginina esterasas, peptidasas (Tu y Murdock 1967) actividades proteolíticas diversas a pH de 8.5 (Mebs y Raudonat 1967, Mebs 1960) fosfolipasas del tipo A₂, actividades liberadoras de cininas y hialuronidasas (Alagón y col 1982).

Por otro lado debido a que algunas enzimas producen efectos tóxicos en animales de experimentación, por ejemplo: hemorragias en mesenterio, riñones y pulmones; además de afectar la tensión arterial por medio de factores vasoactivos liberados por kalikreínas, no se había enfocado la atención a la búsqueda de componentes neurotóxicos.

Del veneno del Heloderma se han purificado varias enzimas las cuales son muy similares entre las especies de Helodermas horridum y suspectum, como una hialuronidasa, dos arginina esterasas, varios tipos de fosfolipasas. Asimismo se han encontrado algunas toxinas como la gilatoxina, la letaltoxina, la horridotoxina, y la helotermina. Este nuevo grupo de toxinas de los helodermas tienen características diferentes a los grupos de toxinas conocidas de venenos de animales. De estas toxinas la helotermina será descrita ampliamente en este trabajo. Finalmente, también se mencionarán aspectos muy generales de los componentes peptídicos encontrados hasta el momento en este veneno.

Componentes del veneno del Heloderma.

I. Enzimas

a). La Hialuronidasa:

La hialuronidasa fue descrita inicialmente por Tu (1983). La actividad de esta enzima en el veneno del Heloderma fue propuesta como un facilitador en la difusión de los demás componentes tóxicos y enzimáticos. Este tipo de enzima parece ser de los componentes más constantes en la mayoría de los venenos de reptiles, sin embargo a excepción del trabajo de Tu (1983), no se encuentran reportes sobre su purificación.

b). Las fosfolipasas:

El primer reporte del aislamiento de una fosfolipasa tipo A₂ del veneno del Heloderma horridum (Sosa et al, 1986) describe una fosfolipasa A₂ cuya estructura primaria presenta varias diferencias comparada a los demás grupos de fosfolipasas conocidas.

Recientemente se han encontrado cinco variantes de fosfolipasas A2 (Gomez F. y col. 1990) en cuyo reporte se describe que las enzimas tienen de 17000 - 18000 de peso molecular, y su característica más sobresaliente es la de tener variaciones en su secuencias de aminoácidos después del sitio catalítico y en el extremo carboxilo terminal que sólo son comparables con las fosfolipasas del veneno de abejas.

c). La helodermatina

La Helodermatina es una enzima Kalikreina, (Alagón et al. 1986) de la familia de las serina-proteasas, de 63000 de peso molecular. La enzima es reconocida por los inhibidores de tripsina de soya del tipo Kunitz. El efecto de la helodermatina en conejos anestesiados es de disminuir su tensión arterial.

La importancia de la caracterización de estos componentes y su comparación con los demás de otros grupos es la del estudio de la evolución de estos sistemas enzimáticos.

II Los Componentes Peptídicos.

Uno de los efectos más evidentes del veneno de los helodermas en los animales intoxicados es la modificación de su motilidad intestinal. Estas observaciones ya habían sido reportadas por Patterson desde 1967, quien menciona la presencia de un factor relativamente termoestable no asociado a histamina, que producía estimulación de músculo liso. Posteriormente en trabajos más recientes, los cuales se han enfocado hacia la caracterización de tales componentes, han encontrado una serie de compuestos peptídicos que ocasionan efectos secretorios en preparaciones de acinis pancreáticos de cuyo y que además incrementan los niveles de AMPcíclico (Dehaye J.P. y col. 1984).

Los componentes peptídicos que se han reportado hasta el momento son:

a). La helodermina

De los péptidos mejor caracterizados del veneno del Heloderma, la helodermina presenta varias características muy singulares. Se ha demostrado inmunológicamente que existen factores similares en glándulas salivales, en cerebro y tracto digestivo de rata. La función de cada uno de estos componentes todavía no se explica claramente.

La helodermina es un péptido de 5.9 kD, cuya estructura primaria es muy similar a la secretina en su extremo N-terminal de los residuos 1 al 27. Otra característica interesante es la de tener tres prolinas en el extremo carboxilo-terminal (Alagón y col. 1986).

El mecanismo de acción de la helodermina parece ser común con los péptidos secretina, PHI (Péptido Histidin-Isoleucina) y VIP (Péptido Intestinal Vasoactivo), los cuales aumentan los niveles de AMP cíclico (Vandermeers y col., 1984, 1987).

Recientemente se han observado compuestos similares a la helodermina en las células parafoliculares de mamíferos y células equivalentes a parafoliculares de las glándulas ultimobraquiales de pollo. Estos hallazgos sugieren que los péptidos parecidos a la helodermina en las células C son semejantes a factores involucrados

en la regulación local de la secreción de la hormona tiroidea y por lo tanto esten involucrados en el mantenimiento de la homeostasis del calcio (Grunditz-T. 1989).

b). El PSF (Factor Secretorio Pancreático)

Inicialmente el PSF se describió como un secretagogo más del veneno de *Heloderma*, sin embargo actualmente se ha caracterizado de tal forma que se conoce completamente su estructura, la cual es similar a las de las fosfolipasas del tipo A2 (Gómez y col. 1989). Por otro lado se plantea la posibilidad de que el PSF o fosfolipasa sea similar a una fosfolipasa endógena la cual es importante en los pasos finales de los estímulos de secreción en el páncreas exócrino (Gómez y col. 1989).

c). Las Helospectinas I y II

Se ha reportado que el veneno del monstruo de Gila estimula la secreción enzimática de acinis pancreáticos de cobayo, de un modo similar a los péptidos VIP, secretina y PHI. El estudio de estos componentes ha mostrado un nuevo grupo de péptidos de la familia del glucagón, los cuales se les ha denominado como helospectinas (Grundemar L. y col. 1990).

Las helospectinas son muy similares entre sí y contienen 37 y 38 residuos de aminoácidos respectivamente. Su actividad reportada ha sido la de estimular la secreción de amilasa (Parker D.S. y col. 1984).

III Las toxinas

a) La Gilatoxina:

La gilatoxina fue descrita por el grupo de Tu (1981) como un componente de 35-37 kD y un punto isoeléctrico de 4.25. Entre las características más sobresalientes de esta toxina está la aparente asociación con un factor hemorrágico que produce exoftalmia en ratones intoxicados. Hasta el momento no se ha reportado mayor información relevante sobre esta toxina.

b) La Letaltoxina y la Horridotoxina.

Estas toxinas se describieron como componentes del veneno del *Heloderma horridum* de peso molecular de 28 y 31 kD respectivamente. La dosis letal 50 de la letaltoxina es de 0.135 µg i.v. y su efecto en preparaciones de músculo de diafragma fue la de inhibir directamente su estimulación eléctrica (Komory. y col 1988).

La horridotoxina es una toxina hemorrágica con actividad de arginina-ester-hidrolasa,

tiene un punto isoeléctrico de 3.9, su actividad enzimática es inhibida por diisopropil fluorofosfato, N-bromosuccinimida, y β -mercaptoetanol, lo cual sugiere que serina, triptofano y puentes disulfuro están involucrados en su actividad esterasa (Nikai T. y col. 1988).

3. LA HELOTERMINA

De las toxinas del veneno del Heloderma horridum, la helotermina es la toxina que se ha descrito más recientemente (esta tesis).

Con el objeto de estudiar las propiedades de la HLTX, en relación a sus efectos de disminución de la temperatura corporal, así como buscar datos en el conocimiento de su mecanismo de acción a nivel molecular se ha propuesto llevar a cabo su caracterización estructural y funcional.

En la actualidad, la determinación de la estructura primaria de una proteína, se puede abordar utilizando varias metodologías, como las técnicas de biología molecular del ADNc, las cuales permiten obtener información complementaria del procesamiento de la proteína, además de confirmar los datos obtenidos con las técnicas de química de proteínas. En los incisos siguientes se abordan varios de estos aspectos, referentes a la helotermina.

4. OBJETIVOS DE ESTA TESIS

El principal objetivo de este trabajo de tesis es la caracterización estructural de la toxina HLTX. En este contexto se utilizaron los siguientes medios:

a). Química de proteínas

- Optimización del método de purificación de la Helotermina
- Diseño de una estrategia para la deducción de la estructura primaria de la Helotermina.
- Secuenciación automática de los fragmentos peptídicos de la Helotermina.
- Búsqueda de similitudes de secuencias con proteínas conocidas.

b). Biología molecular

- Construcción de una genoteca a partir del RNA mensajero de las glándulas venenosas del Heloderma horridum horridum.
- Clonación del gene de la Helotermina.
- Secuenciación del ADN para Helotermina.

Además, se continuó con la caracterización de la actividad biológica de la toxina, especialmente en relación a la caracterización del efecto hipotérmico.

5. PROCEDIMIENTOS EN LA CARACTERIZACION ESTRUCTURAL DE LA HLTX.

I. Purificación de la Helotermina.

(Ver anexo, trabajo publicado en la sección resultados)

II. Metodos de química de proteínas.

Reducción y Carboximetilación

Se agregó 1 mg de toxina a 1.0 ml de solución buffer de Tris-HCl 0.2 M pH 8.6, cloruro de guanidina 6.0 M, EDTA 2 mM, y DTT 1 mM en un vial de centelleo de vidrio, en donde se aplicaron 2 gotas de octanol para disminuir la tensión superficial al burbujear nitrógeno dentro del vial. A seguir se cerró el vial herméticamente y se dejó incubando la solución a 37°C durante 2 hrs, después de las cuales se enfrió el vial y se agregó ácido iodoacético, en un exceso aproximado de mil veces sobre los grupos SH de la mezcla, se guardó el tubo en la obscuridad se ajustó el pH a 8.6 en caso necesario, y se dejó reaccionar durante 30 minutos después de los cuales se separaron los productos de la reacción por filtración en gel con Bio Gel P-30 equilibrado en 20 % de ácido acético. El volumen de elución se monitorizó a 280 nm para mezclar las fracciones correspondientes a la proteína reducida y alquilada. Posteriormente se liofilizó la muestra y se guardó a -20 °C hasta su posterior procesamiento.

Rupturas Químicas y Enzimáticas

a) Bromuro de cianógeno (CNBr).

Para la ruptura con bromuro de cianógeno de los enlaces peptídicos en las posiciones ocupadas por metioninas, se solubilizó la toxina reducida y carboximetilada (1 mg) en 1 ml de solución de ácido fórmico al 70% y se le agregó CNBr sólido en un exceso de 100 veces sobre el contenido de metioninas. Se dejó la reacción durante 24 hrs. a temperatura ambiente para después secar el contenido por evaporación con nitrógeno, (bajo campana). El producto obtenido se guardó a -20 °C hasta su posterior procesamiento.

b) Tripsina.

La HLTX reducida y carboximetilada fue sometida a hidrólisis triptica. Los enlaces peptídicos flanqueados por aminoácidos básicos (lisina y arginina) fueron hidrolizados por tratamiento con tripsina. Una muestra conteniendo 1 mg de HLTX fue disuelta en amortiguador de bicarbonato de amonio 0.1 M pH 8.0 y se le agregó 10 µl de solución de tripsina (1.0 mg/ml) en una proporción de 1:100 sobre el conteni-

do de proteína. La digestión se dejó durante 24 hrs., después de la cuales se congeló la muestra con hielo seco y acetona para ser guardada en estas condiciones hasta su aplicación en un sistema de HPLC (lo cual fue aproximadamente 4 hrs después)

Purificación de los Fragmentos de HLTX.

Los productos de rupturas con CNBr y tripsina se separaron en un sistema de HPLC, de la siguiente manera:

El producto de la reacción con CNBr se solubilizó en buffer A (0.1 % de ácido trifluoroacético, TFA, en H₂O) y se aplicó en tres muestras independientes a un sistema de HPLC (BECKMAN con una columna de fase reversa C8, y equilibrada en el buffer A). Los productos se eluyeron con un gradiente de 0 a 60 % de B, (buffer B contenía 0.12% de TFA en acetonitrilo). La columna fue corrida con un flujo de 1 ml/min y las fracciones obtenidas monitoreadas a 230 nm. Los picos de la cromatografía fueron colectados inmediatamente después de su elución y procesados en un sistema SAVANT, donde se secaron y se guardaron a -20 °C hasta su caracterización.

Los productos de la digestión con tripsina se trataron de la misma manera como se mencionó arriba, para los péptidos obtenidos con CNBr.

Análisis de Aminoácidos de los Péptidos

La hidrólisis ácida de los fragmentos peptídicos fue realizada según el procedimiento descrito por Moore y Stein (1968) en donde una muestra de péptido se hidroliza con 6 N de HCl en alto vacío y en presencia de nitrógeno. La hidrólisis se lleva a cabo a 110 °C durante 24, 48 y 72 hrs, para después analizar los productos. Se derivatizaron los aminoácidos con fenilisotiocianato (PITC) y se aplicaron a un sistema de HPLC (WATTERS), para separar los aminoácidos derivatizados. El análisis de las fracciones se llevó a cabo al integrar el área bajo la curva de las fracciones conocidas del estándar de aminoácidos y compararlas con las fracciones de las muestras problema.

Secuenciación

La secuenciación de aminoácidos de la HLTX reducida y carboximetilada, así como de los péptidos provenientes de las rupturas con CNBr y tripsina, se llevó a cabo como fue descrito en la purificación (ver trabajo publicado en la sección de resultados).

III. Metodos de biología molecular.

Construcción del banco de ADNc de las glándulas venenosas de Heloderma horridum horridum.

Inicialmente se preparó una biblioteca de ADNc a partir de los RNAs mensajeros que codifican para las proteínas de las glándulas de veneno del Heloderma horridum horridum. El RNA total de las glándulas del Heloderma horridum horridum fue purificado de acuerdo al procedimiento de extracción de Chirwin et al (1979). El RNAm fue purificado posteriormente de acuerdo al procedimiento de Amersham en donde se utilizó una membrana de papel derivatizado con poli U, para la purificación de aproximadamente 1 µg de RNAm, a partir de 200 µg de RNA total de donde se construyó un banco de ADNc, utilizando los reactivos y procedimientos proporcionados por la compañía Amersham.

Búsqueda inmunológica del banco de cDNA de Heloderma horridum horridum de las clonas para la toxina HLTX.

Inicialmente se inmunizaron dos conejos con HLTX altamente purificada (cuatro inmunizaciones subcutáneas en intervalos semanales: la primera con adjuvante completo de Freund, conteniendo 200 µg de HLTX, y las siguientes con adjuvante incompleto mas 100 µg de HLTX). Los anticuerpos de conejo fueron purificados pasando el suero de los conejos por una columna de afinidad, preparada en el laboratorio. Para esto se acopló covalentemente 0.5 mg de HLTX a Sepharose 4B activada por bromuro de cianógeno. Los anticuerpos purificados se diluyeron en TBS para dar una relación de 5µg/ml. Esta solución se incubó con filtros previamente adheridos a cajas de agar con placas de E.coli infectadas con fagos lambda gt11 recombinantes, para después incubar con un segundo anticuerpo (cabra anti-conejo) acoplado con peroxidasa de rábano. Para llevar a cabo la reacción de detección se agregó el sustrato de la peroxidasa. Los precipitados de color rojo oscuro indican las placas positivas, esto es, las placas que están expresando la proteína reconocida por los anticuerpos (HLTX).

Identificación de los fagos recombinantes que codifican para la HLTX.

Cerca de 10^5 unidades formadoras de placa fueron incubadas por 3 a 4 horas en cajas de agar 37 °C para después ser sobrepuestas con papeles de nitrocelulosa impregnados con isopropiltio- galactosido, induciendo la expresión de las proteínas recombinantes, con lo que se realizó la inmunobúsqueda de la manera descrita anteriormente. Las placas positivas fueron caracterizadas al ser sembradas nuevamente en una segunda y tercera búsqueda de la misma forma descrita previamente.

Amplificación del fragmento cDNA de ADN para la toxina HLTX por la reacción de la polimerasa en cadena PCR.

Cerca de 10 ng de DNA purificado del fago de la placas positiva para la HLTX se usó en 100 μ l de volumen de reacción y se amplificó 30 ciclos en la reacción de PCR, a una temperatura de hibridización a 55 °C. El producto obtenido fue el de la amplificación de un fragmento de 900 pares de bases el cual se pudo observar en un gel de agarosa al 1 %

Purificación y secuencia de los fragmentos obtenidos por PCR para la HLTX.

Los fragmentos amplificados fueron purificados usando columnas de Amersham para fraccionamiento de cDNAs y posteriormente secuenciados de acuerdo a los protocolos de secuencia para doble cadena de ADN del paquete de Taquenasa (U.S.B.).

6. RESULTADOS

PUBLICACION. Se anexa copia de la publicación como primer autor del artículo: "Isolation and characterization of helothermine, a novel toxin from Heloderma horridum horridum (Mexican beaded lizard) venom", por Javier Mochca-Morales, Brian M. Martin y Lourival D. Possani, publicado en la revista internacional **Toxicon**, vol. 28, No.3, 229-309 (1990).

Purificación

En una nueva preparación del veneno del Heloderma horridum horridum se obtuvieron 2 mg de HLTX los cuales fueron analizados por geles de SDS, en donde se encontró un solo componente, el cual fue probado en ratones de la cepa CD-1 en la búsqueda del efecto hipotérmico (Fig. 1)

Caracterización

La HLTX reducida y alquilada con ácido iodoacético, se separó de los productos de reacción con Bio Gel P-30 (de acuerdo al procedimiento descrito previamente). En la ruptura de la HLTX con CNBr, los productos separados por HPLC mostraron por lo menos 16 picos principales (Fig 2).

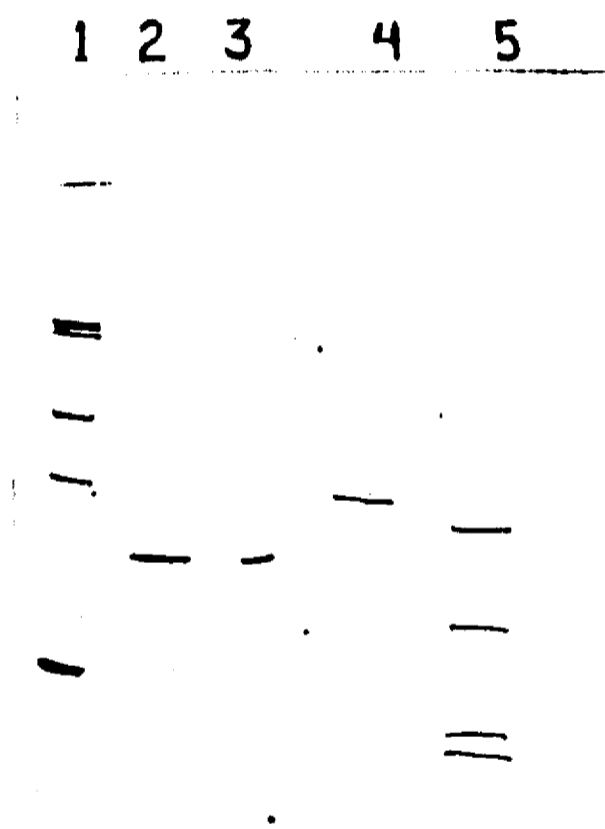


Figura 1 Análisis Electroforético de HLTX; HLTX alquilada, HLTX alquilada y tratada con CNBr.

Electroforesis en geles de SDS al 12.5% de acrilamida, en el carril 1 se aplicaron marcadores de peso molecular en el carril 2 y 3 se aplicaron 3 y 1 ug de HLTX, en el carril 4 una muestra de HLTX alquilada con vinilpiridilo y en el carril 5 HLTX alquilada con VP y tratada con CNBr.

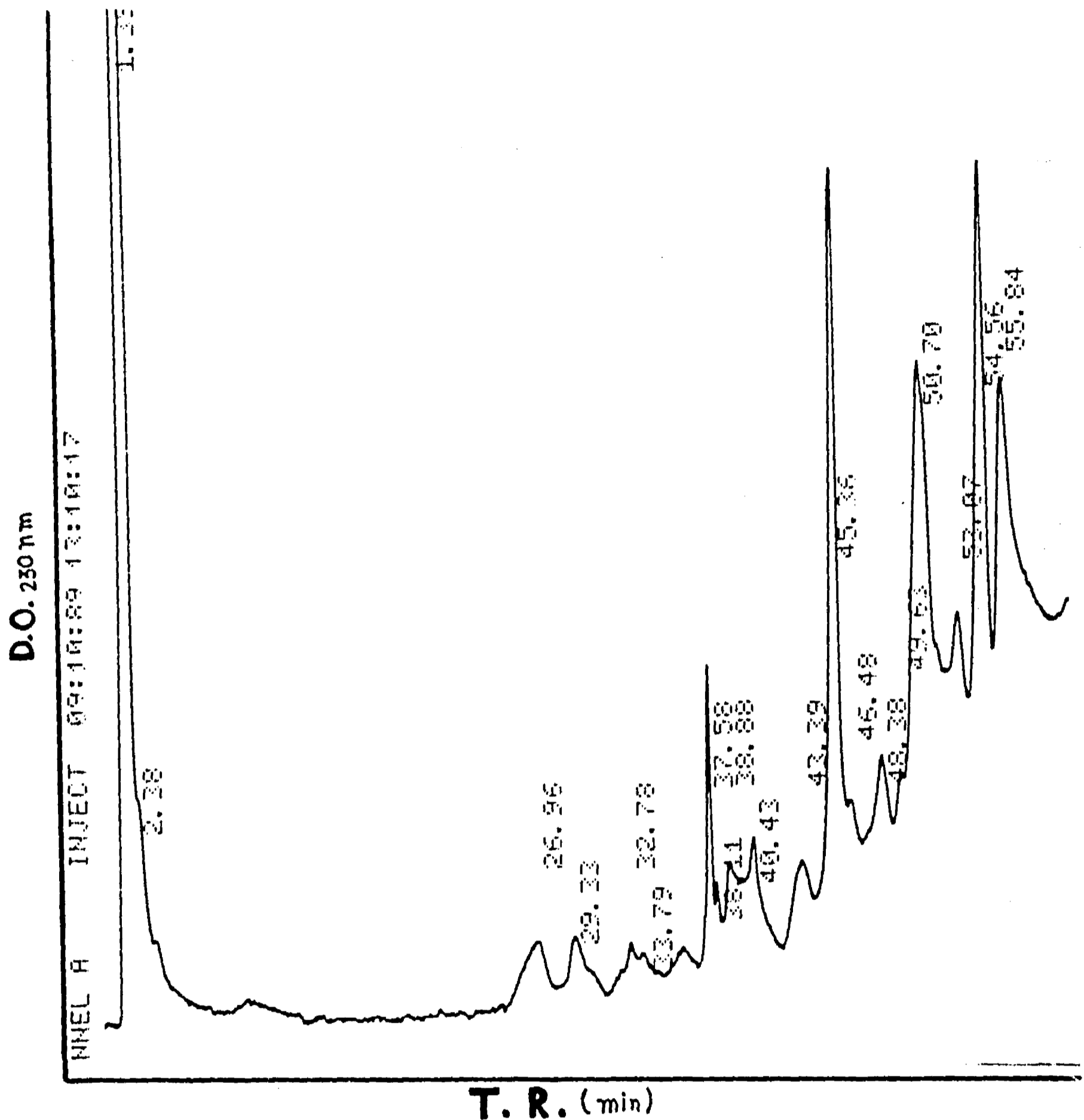


Figura 2 Perfil de HPLC de elución de péptidos de HLTX tratada con CNBr.

Una muestra de 40 nmoles de HLTX tratada con CNBr fué disuelta en 500 μ l de solvente A, (0.12 % de TFA en H₂O), se centrifugó y los productos solubles se aplicaron al sistema de HPLC (Beckman). La elución se llevó a cabo con un gradiente de 0 a 60% en 60 min con un flujo de 1.0 ml/min, (solvente de B, 0.1 % de TFA en acetonitrilo) a temperatura ambiente. Las fracciones se monitorearon a 230 nm y se colectaron inmediatamente despues de su elución.

Los productos de ruptura por tripsina de la HLTX mostraron 23 componentes al ser separados por HPLC (Fig. 3), los cuales fueron analizados por secuencia de aminoácidos. Los resultados se muestran en la tabla I.

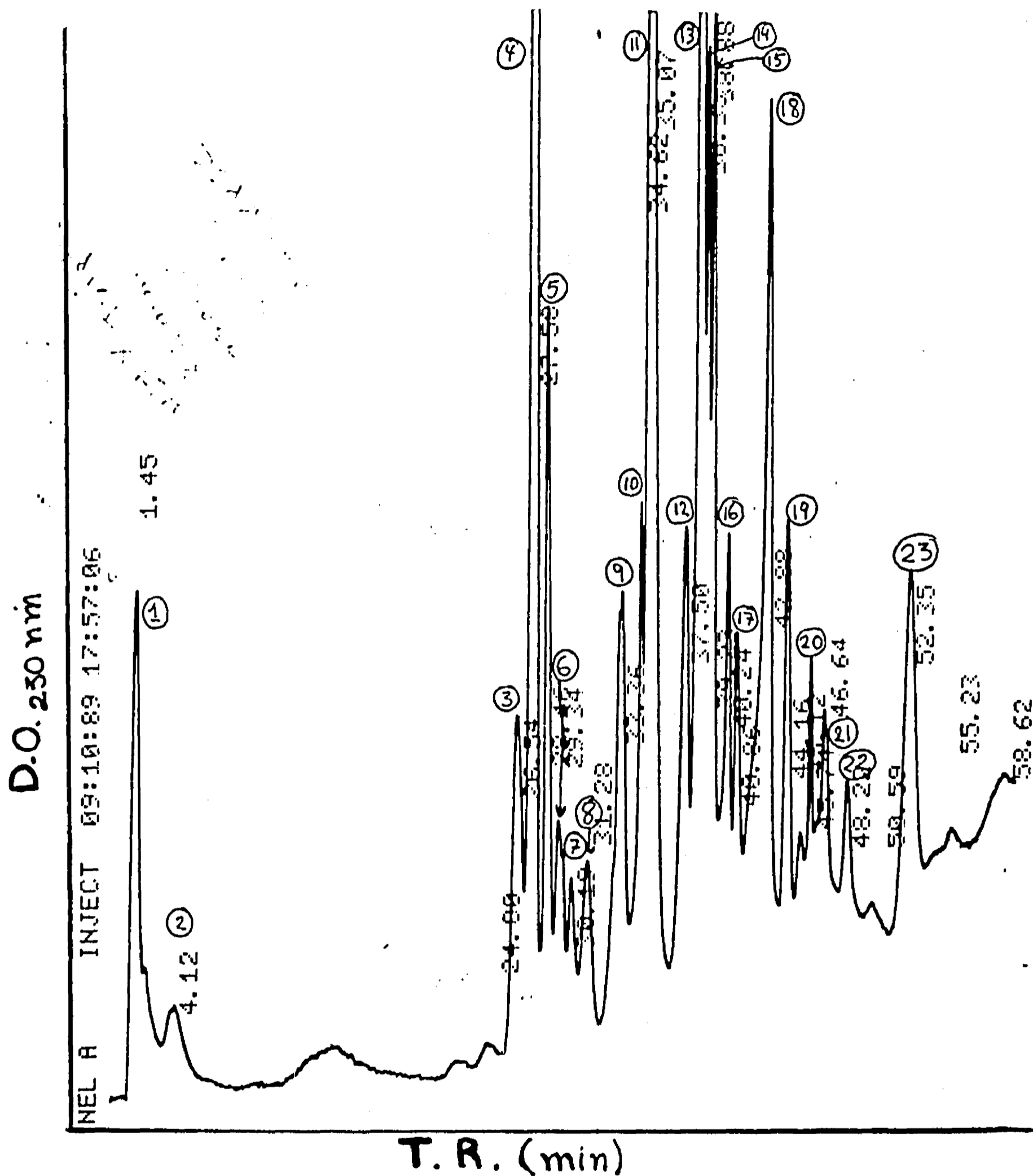


Figura 3 Separación por HPLC de los péptidos de HLTX digeridos con tripsina.

Una muestra de aproximadamente 13 nanomoles de HLTX tratada con tripsina fue separada utilizando las mismas condiciones descritas en la figura anterior. Los fragmentos se monitorearon a 230 nm y los picos después de ser recuperados fueron secados en un sistema SAVANT para su posterior caracterización.

TABLA I

DEGRADACION DE EDMAN AUTOMATICA DE HLTX Y SUS FRAGMENTOS
TRIPTICOS Y DE BROMURO DE CIANOGENO

HLTX N-ter.	1 15	5 20	10
	Glu-Ala-Ser-Pro-Lis-Leu-Pro-Gli-Leu-Met-Tre-Ser-Asn- Pro-Asp-Gln-Gln-Tre-Glu-Ile-...		
HLTX CNBr5	1 15	5 20	10 25
	Tre-Ser-Asn-Pro-Asp-Gln-Gln-Tre-Glu-Ile-Tre-Asp-Lis- His-Asn-Asn-Leu-Arg-Asn-Ile-Val-Glu-Pro-Tre-Ala...		
HLTX.t-4.1	1	5	
	Ser-Leu-Asn-Pro-Xxx-Gln-...		
HLTX.t-4.2	1	5	10
	Lis-Tir-Fen-Xxx-Gly-Asp-Xxx-Asn-Tre-Asp...		
HLTX.t-11	1	5	10
	Tir-Tir-Gln-Val-Met-Tre-Tir-Gln-Pro-Gli-Gli-Asn-Ile- Arg-...		
HLTX.t-13.1	1 15	5 20	10 25
	Ser-Ile-Gli-Pro-Pro-Cis-Gli-Asp-Cys-Pro-Asp-Ala-Cis- Asp-Asn-Gli-Leu-Cis-Tre-Asn-Pro-Cis-Lis-Cis-Asn...		
HLTX.t-13.2	1 15	5	10
	Ser-Tir-Glu-Leu-Gli-Cis-Ala-Ile-Ala-Tir-Cis-Pro-Asp- Gln-Pro-Tre-Tir-Lis...		
HLTX.t-17	1	5	10
	Tre-Ile-Asp-Gli-Val-Glu-Cis-Gli-Glu-Asn-Leu-Fen-Fen..		
HLTX.t-22	1	5	
	Asp-Trp-Xxx-Ile-Xxx-Xxx-Arg-...		

TABLA II

SOBREPOSICION DE PEPTIDOS DE HLTX, LA REGION AMINOTERMINAL CON UN FRAGMENTO DE RUPTURA CON BROMURO DE CIANOGENO

	1	10	20	30
HLTX NH2	EASPKLPGLMTSNPDQQTEI...			
HLTX CNBr.5	TSNPDQQTEITDKHNNLRNIVEPTA...			

Biología Molecular de la HLTX.

Obtención del banco de cDNA de las glándulas venenosas de Heloderma horridum horridum.

A partir de aproximadamente 1 μg de RNA mensajero (Figura 4), se construyó un banco de cDNA en el vector fago lambda gt11, donde se obtuvieron aproximadamente 4×10^6 unidades formadoras de placa recombinantes, de acuerdo a los procedimientos descritos por la compañía Amersham.

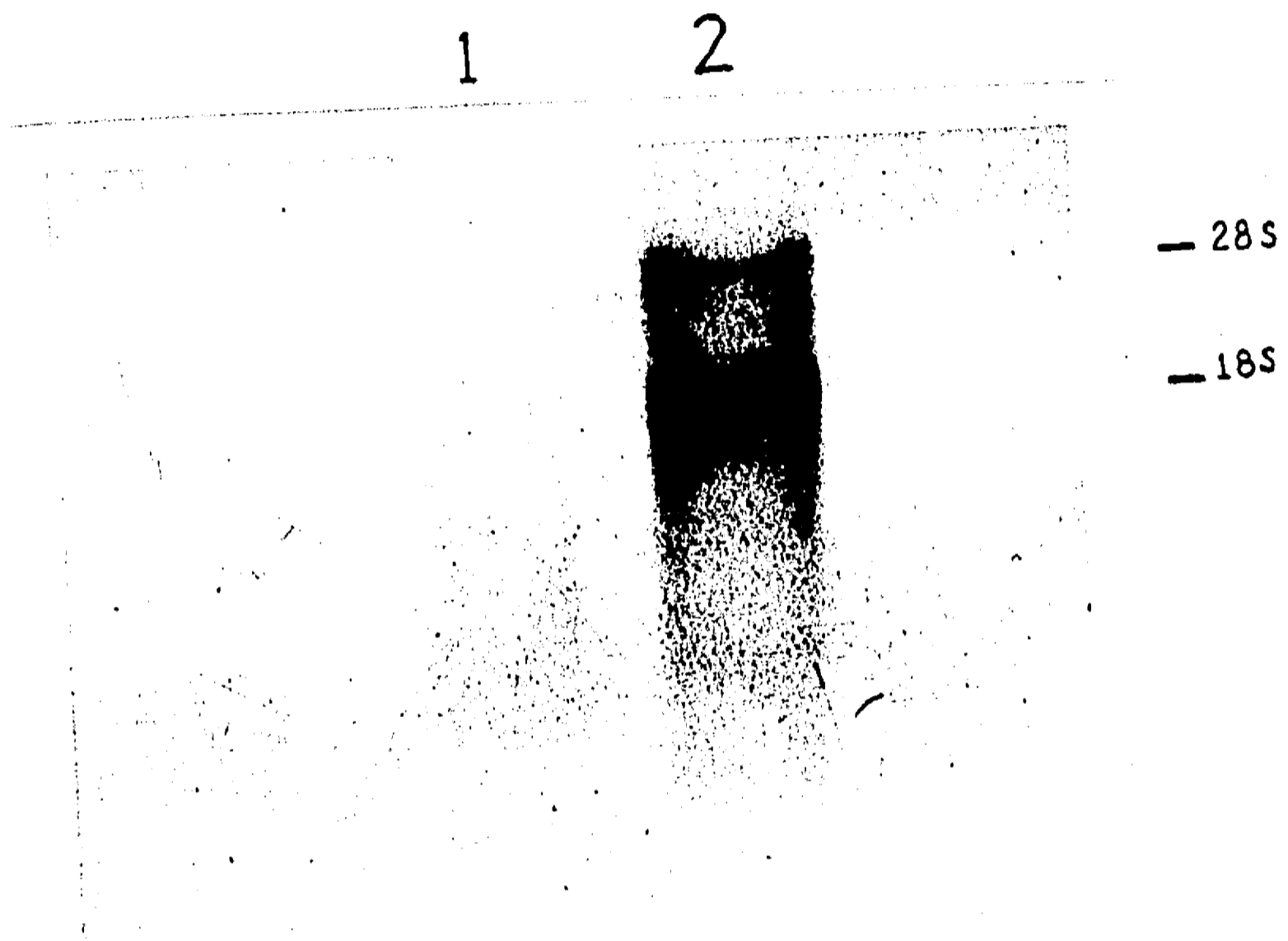


Figura 4. Obtención del RNA mensajero de las glándulas de Heloderma horridum horridum.

Una muestra de un décimo (aproximadamente 100 ng) de RNA mensajero se aplicó en un gel de agarosa al 1% y se reveló con bromuro de etidio, el resultado se encuentra en el carril 1, por otro lado se aplicó una alícuota de RNA total de glándulas de Heloderma el cual se muestra en el carril 2.

Clonación de la HLTX.

En la detección de la placa positiva para HLTX se sembraron aproximadamente 10^5 unidades formadoras de placa recombinantes del banco de cDNA, de acuerdo al procedimiento anteriormente descrito. Se encontraron 3 placas positivas a la inmunodetección, las cuales fueron recuperadas y sembradas nuevamente en las mismas condiciones, con el objeto de obtener placas absolutamente puras. En la figura 5 se muestra el resultado de la última siembra de una placa pura de HLTX.

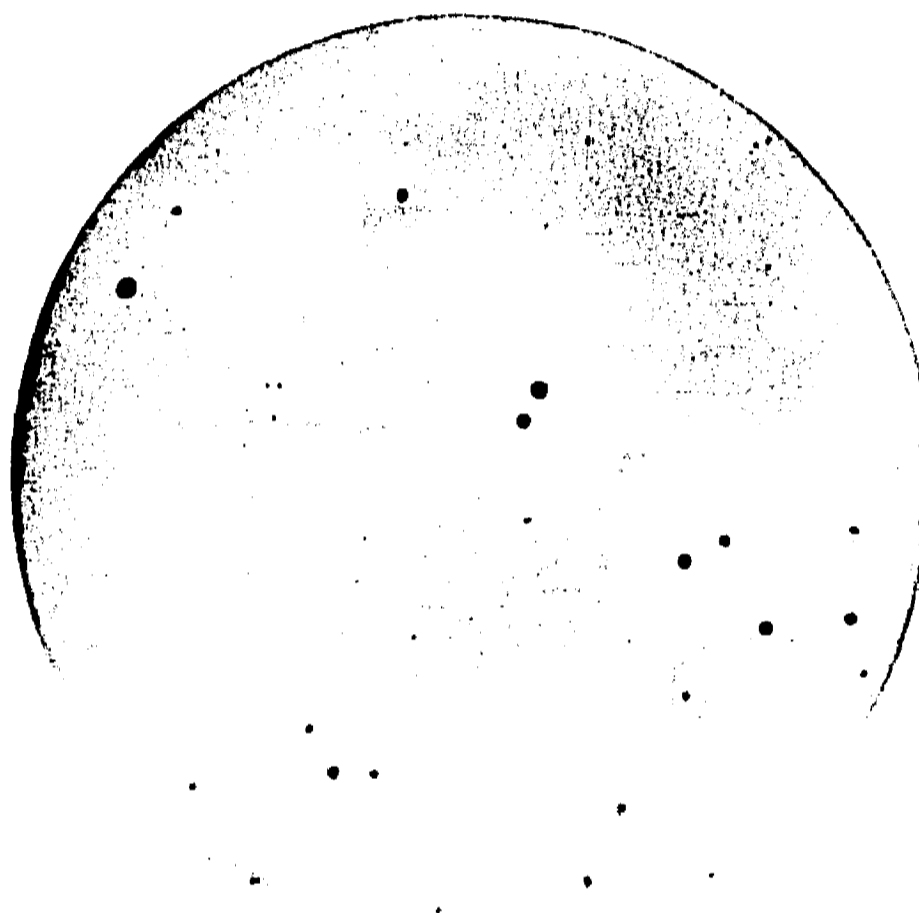


Figura. 5 Inmunodetección

Una alícuota de la elución de una placa pura de HLTX fue sembrada en una caja de agar y cubierta con un filtro de nitrocelulosa como se describe en la sección anterior. Se muestra el resultado, donde todas las placas obtenidas son positivas a la reacción de peroxidasa.

Obtención del fragmento clonado de HLTX.

Las placas puras de HLTX se crecieron en los medios de cultivo correspondientes con el objeto de crecer los fagos recombinantes, posteriormente se purificaron los fagos y se trataron para la extracción de su DNA, el material obtenido se digirió con Eco RI ó Bam HI, con el proposito de recuperar el fragmento clonado de HLTX. Los resultados se muestran en la figura 6. En donde se muestra un fragmento 800 pares de bases en los carriles 4 y 5 del producto de digestión con Bam HI,

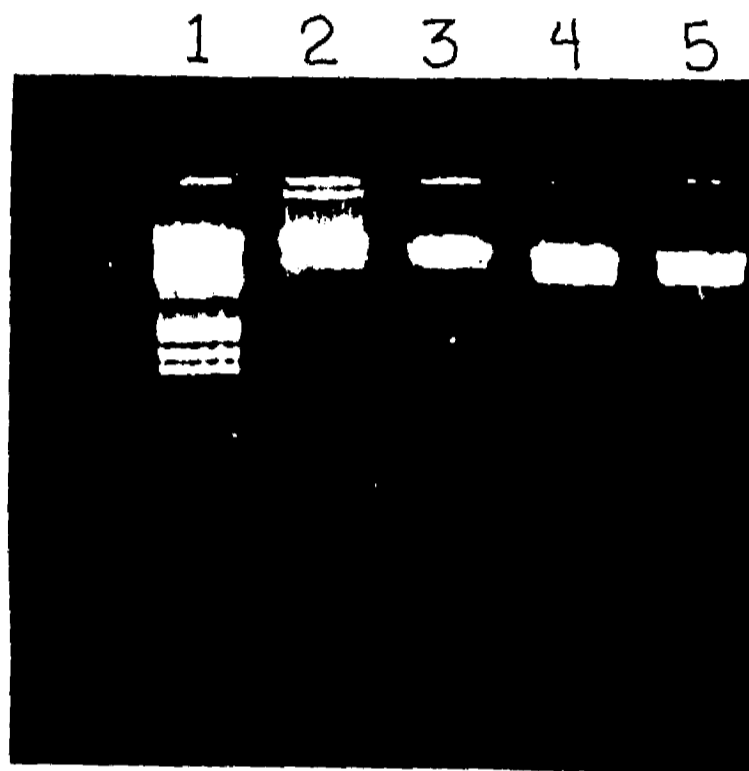


Fig. 6 Obtención del inserto para HLTX.

Se muestra el análisis del DNA del fago recombinante para HLTX, y digerido con Eco RI y Bam HI en los carriles 2,3 y 4,5 respectivamente, en el carril 1 se encuentran los marcadores de DNA.

Amplificación del fragmento clonado por PCR.

Del DNA extraído de las placas positivas, se utilizó una muestra para la amplificación del gen para HLTX, esto se llevó a cabo por medio de la técnica de PCR, en donde se utilizaron oligonucleótidos sintéticos universales para los fagos lambda gt 11 y la reacción de amplificación se llevó a cabo automáticamente en un termoblock HYBID. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 7.

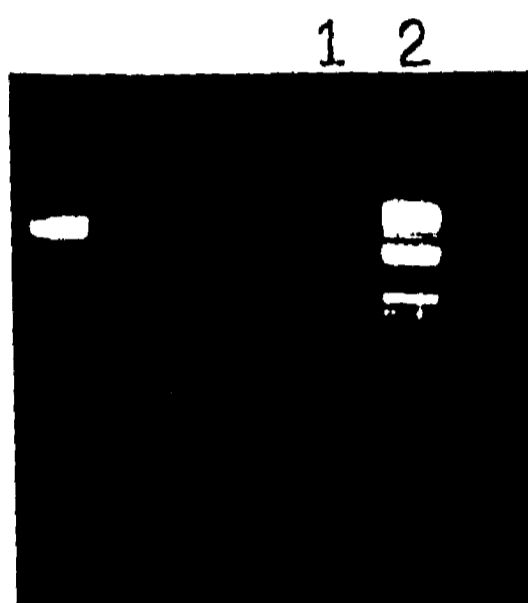


Fig. 7 Amplificación del fragmento para HLTX por PCR

Se muestra el análisis del fragmento amplificado por PCR en geles de agar al 1% y teñido con bromuro de etidio en el carril 1; en el carril 2 se encuentran los marcadores de DNA.

El producto amplificado por la reacción de la polimerización en cadena mostró un producto de aproximadamente 900 pares de bases, lo cual se encuentra dentro de lo esperado si se toma en cuenta la suma de los oligonucleótidos sintéticos con el fragmento clonado en el fago.

7. DISCUSION

Los resultados iniciales sobre la purificación de la HLTX y su caracterización química y funcional fueron discutidos ampliamente en el artículo publicado (ver sección de Resultados).

A continuación se discutirán los datos obtenidos con relación a la obtención de la secuencia de aminoácidos completa de la HLTX, que no se incluyeron en el artículo mencionado.

La primera observación importante se refiere a la reducción y alquilación de la toxina. Se utilizaron dos agentes alquilantes (2-vinilpiridilo y ácido iodo-acético) en preparaciones independientes. El segundo tratamiento dió origen a HLTX reducida y carboximetilada que permitió la obtención de varios péptidos correspondientes a secuencias de la porción interna de la HLTX.

Asimismo, una muestra de este material, sometida directamente a secuenciación, permitió la confirmación de la secuencia amino-terminal de la HLTX hasta el residuo número 20, incluida en la publicación referida en Resultados, (vease también Tabla I). De los fragmentos generados por el tratamiento con bromuro de cianógeno se consiguió obtener uno con calidad de pureza suficiente para determinar su secuencia. Este péptido (CNBr.5) corresponde al material eluido en el cromatograma de Fig.2 en el tiempo 37.58 minutos. Su secuencia empieza con la treonina número 11 (vease tabla II) y termina con la alanina de posición 35, permitiendo confirmar la secuencia de aminoácidos de los residuos de posición 11 a 20, en donde existe sobreposición completa. De esta forma se pudo determinar de manera inequívoca la estructura primaria de la HLTX en su porción N-terminal, que corresponde a aproximadamente el 16% de la secuencia (total de 221 residuos, véase composición de aminoácidos en la publicación, sección de Resultados). Los demás péptidos producidos por ruptura con bromuro de cianógeno no pudieron ser secuenciados por presentar más de un componente en la misma fracción del HLPC.

Los péptidos generados por hidrólisis triptica y purificados por HLPC (Fig.3) permitieron obtener información complementaria importante sobre las secuencias internas de la HLTX, conforme se indica en la tabla I. La secuenciación automática del péptido triptico número 4 (HLTX.t-4) permitió identificar ocho aminoácidos de un total de 10. El péptido HLTX.t-11 corresponde a un tetradecapéptido, cuya secuencia se pudo obtener por degradación automática de Edman. De misma forma el péptido número 13 (HLTX.t-13.1) corresponde a una secuencia de 25 aminoácidos y el HLTX.t-13.2 a 18 aminoácidos. Obsérvese que el péptido 13 dió origen a dos sub-péptidos, separados por recromatografía líquida de alta presión, cuyas secuencias se pudieron obtener (Tabla I). El péptido número 17 (HLTX.t-17) permitió resolver la secuencia de otros 13 aminoácidos y el péptido 22 de más cuatro residuos. De esta forma por medio de secuenciación directa se pudo obtener la posición de cerca de 120 aminoácidos de la HLTX.

Con la información obtenida hasta este paso, se pudo iniciar los trabajos en colaboración en las técnicas de biología molecular. De tal forma que la secuencia total completa se logró mediante el uso de técnicas de Ingeniería Genética, con clonación y secuenciación del gen que codifica para la Helotermina. A continuación se discutirá la estrategia y los resultados experimentales más importantes que llevaron a la determinación de la secuencia completa de la HLTX. (Aquí conviene mencionar que los datos completos generados por tecnología de ADN recombinante sobre la estructura primaria de la HLTX están, en este momento, en proceso de ser protegidos por una patente de invención. Debido a que existe un convenio firmado entre la Universidad Nacional Autónoma de México y la compañía interesada en esta patente, los datos obtenidos no se pueden presentar en forma escrita, todavía.).

La estrategia y el trabajo experimental desarrollado en la segunda parte de esta tesis consistió básicamente en cuatro pasos:

1. Obtención del RNA mensajero de glándulas venenosas de Heloderma horridum horridum;
2. Preparación de un banco de ADN complementario a partir del RNA mensajero;
3. Expresión del gene de la HLTX clonado en el vector (fago lambda gt11) e identificado mediante el uso de anticuerpos generados en contra de la Helotermina pura;
4. Secuenciación del ADN, después de usar la reacción de la polimerasa en cadena (PCR).

Los diversos pasos seguidos en la estrategia de secuenciación por ADN recombinante se encuentran descritos en la sección de Procedimientos Experimentales (Métodos de biología molecular). Los hallazgos más importantes a observar son: la obtención de cerca de cuatro millones de recombinantes, entre los cuales está por lo menos una clona (no se analizó todo el banco), que es capaz de expresar la helotermina, clonada en el fago lambda gt11a HLTX. Esto se verificó mediante el uso de anticuerpos anti-HLTX purificados por cromatografía de afinidad. Las placas positivas (Fig.5) fueron resemebradas (amplificadas) para posteriormente tratar con la enzima de restricción Bam HI y obtener un inserto con el tamaño esperado (Fig.6), esto es: que correspondía a una región con el tamaño necesario para codificar a el gen de la HLTX, de acuerdo al peso molecular de la toxina, anteriormente determinado por análisis electroforético y de composición de aminoácidos (ver publicación en Resultados). Se utilizaron oligonucleótidos comerciales para amplificar el inserto correspondiente a la HLTX, mediante la reacción de la polimerasa en cadena (Fig.7). Finalmente, este material se utilizó para la determinación de la secuencia nucleotídica del ADN por la técnica de dideoxi, para secuenciación de ADN de doble cadena. También es importante resaltar que los hallazgos de secuencia por ADN recombinante del gen clonado de la HLTX han confirmado enteramente las secuencias de aminoácidos de los fragmentos de péptidos obtenidos por ruptura química e enzimática reportados en las tablas I y II.

Conviene mencionar que la secuencia obtenida es completamente diferente a las demás toxinas purificadas del veneno de Heloderma horridum horridum, como se puede apreciar en la Tabla III.

La HLTX es la primera toxina del veneno del Heloderma horridum horridum, para la cual se ha determinado la estructura primaria completa.

TABLA III: COMPARACION DE SECUENCIAS DE AMINOACIDOS DE LAS TOXINAS DEL VENENO DE LOS HELODERMAS

	1	10	20	30
HLTX	EASPKLPGLMTSNDPQQTEITDKHNNLRIVEPTA (esta tesis)			
Letaltoxina	AYTTEQXRALXGTXRFYARF		(Komori et al. 1988)	
Horridotoxina	IIGGQEXDETGHPWLALLHR		(Nikai et al. 1988)	

Finalmente es importante mencionar que la única función encontrada hasta ahora para la HLTX es la capacidad de causar hipotermia en animales experimentales (ratones). No se ha podido verificar otras actividades secundarias como: actividades proteolíticas o actividades bloqueadoras de canales iónicos. Sus propiedades fisicoquímicas, su composición de aminoácidos y estructura primaria son diferentes a todas las demás toxinas reportadas a la fecha. En trabajos previos al respecto de toxinas de los venenos de Helodermas sólo se mencionan algunos efectos generales y parte de sus secuencias de aminoácidos en la región amino-terminal, como se puede ver en la Tabla III, (Komori *et al.*, 1988, Nikai *et al.*, 1988). La horridotoxina ocasiona un efecto de contracción en preparaciones de músculo liso (Komori *et al.*, 1988), a diferencia de la HLTX que ocasiona relajación en preparaciones fisiológicas de músculo liso de aorta de rata (Mochca-Morales, 1990). Sin embargo es necesario probar las toxinas en las mismas condiciones para hacer comparaciones más precisas. La importancia de estas diferencias permanece como tema de interés biológico.

8. Resumen

En este trabajo de tesis se reporta una estrategia que ha permitido purificar una nueva toxina, denominada Helotermina, a partir del veneno del saurio Mexicano Heloderma horridum horridum. Esta toxina fue caracterizada química y funcionalmente. Entre los hallazgos más relevantes están: es una proteína de peso molecular 25,500, conteniendo 221 aminoácidos. Su punto isoeléctrico es de 6.8. La estructura primaria fue determinada por medio de secuenciación automática de Edman a partir de una muestra de toxina reducida y carboximetilada y de fragmentos obtenidos por ruptura química (bromuro de cianógeno) e hidrólisis trípica. Así mismo, la secuencia de aminoácidos directamente obtenida de los fragmentos peptídicos fue confirmada y completada por técnicas de clonación del gene de la helotermina. Se obtuvo RNA mensajero de las glándulas venenosas de un ejemplar de Heloderma horridum horridum con lo cual se preparó un banco de ADN complementario. El vector utilizado para la clonación y expresión del gene de la helotermina fue el fago lambda gt11.

La identificación de las placas productoras de helotermina se hizo mediante la utilización de anticuerpos de conejos, producidos con toxina homogénea y purificados por columnas de afinidad. El inserto correspondiente al gene se amplificó por PCR (reacción de polimerización en cadena) y se secuenció. La helotermina es una toxina única, completamente diferente de todas las demás toxinas de venenos de animales ponzoñosos descrita hasta la fecha.

La única función fisiológica que se ha descrito para la helotermina es la propiedad de causar hipotermia en animales experimentales (ratones).

Es una proteína de gran potencial para estudios de fenómenos de disminución de temperatura, razón por la cual se está tramitando en este momento un registro de patente de invención.

SUMMARY

CHEMICAL AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF HELOTHERMINE, A TOXIN FROM THE VENOM OF Heloderma horridum horridum.

PH. D. THESIS: Javier Mochca-Morales

This thesis reports the strategy used for purification of a new toxin denominated Helothermine, from the venom of the mexican beaded lizard Heloderma horridum horridum. This toxin was characterized chemically and functionally. Among the most important findings are: it is a protein with a molecular weight of 25,000, composed by 221 amino acid residues and an isoelectric point of 6.8. Its primary structure was determined by a combination of direct automatic Edman degradation of reduced and carboxymethylated toxin, as well as, automatic sequencing of peptides generated and purified after chemical treatment with cyanogen bromide and enzymatic cleavage with trypsin. The amino acid sequences of the cleaved peptides were confirmed and completed by DNA sequencing of helothermine gene. For this work mRNA was purified from the venomous gland of Heloderma and a cDNA library was prepared. Cloning and expression of Helothermine gene was performed in E. coli by means of phage lambda gt11.

The identification of plaques producing Helothermine was carried out by rabbit antibodies generated against pure toxin and purified by affinity chromatography. The insert fragment of the Helothermine gene was amplified by PCR (polimerase chain reaction) and sequenced.

Helothermine is a unique toxin, completely different from all toxins known so far in animal venoms. The only physiological function described for Helothermine is the hypothermic effect in experimental animals (mice).

This protein has a great potential use in studies related to body temperature control, and for this reason, relevant information on Helothermine is being protected by a patent.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Alagón A.C., Maldonado M.A., Julia J.Z., Sánchez C.R., Possani L.D., (1982). Venom from two sub-species of *Heloderma horridum horridum*. (Mexican beaded lizard): General characterization and purification of N-Benzoil-Arginine-ethyl-ester hidrolase. *Toxicon* 20:2,464-475.

Alagón A.C., Possani L.D., Sumart J., Schuleuning W.D., (1986) Helodermatine, a Kallikrein-like, Hipotensive enzyme from the venom of *Heloderma horridum horridum* (Mexican beaded lizard). *J.Exp.Med.* 164:6,1835-45.

Amirano F.F., Vaudin-Jaques N., Boise N., Rouer-Fessard, (1983) Interaction of Gila Monster Venom with VIP receptors in intestinal epithelium of human. A comparison with rat. *FEBS Lett.* 164:2,299-30

Aviv H., and Leder P. (1972) Purification of biologically active globin mesenger RNA by chromatography on oligothymidilic cellulose. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 1408 - 1412.

Banks E.C., Pearce F.L. Springer C.J., Vernon C.A., (1985) On the immunology of nerve growth factor. *Neurosci. Lett.*61:1-2,127-30.

Chirgwin J.M.,Przybila A.E.,Macdonald R.J.,Rutter W.J., (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18, 52-94-5299.

Cushman D.H., Son Cheung H., Sabo F.E., Ondetty A.M., in Angiotensin converting enzymes inhibitors: evolution of a new class of antihypertensive drugs from the Proceedings of the A.N. Richards Symposium sponsored by the physiological society of Philadelphia May 8-9 (1980) and edited by Urban and Schwarzenberg Baltimore-Munich 1981.

Darbre, A. : *Practical Protein Chemistry: A Handbook* (Chapters 1-3 and 10) New York: John Wiley & Sons Ltd. (1986).

Dehaye J.P., Winand J., Michel P., Roberecht P., Walbroek M., Vandermeers A., Vandermeers P., Christophe J., (1984). Pancreatic secretory factor (PSF), protein from gila monster venom stimulating enzyme scretion from rat pancreatic acini. *FEBS Lett.* 166: 283-7.

Dehaye J.P., Winand J., Damien C., Poloczeck P., Scroboda M., Cristophe J., (1984) Stimulatory effects of Gila monster venom on rat pancreatic acini peptides (Fayentteville, N.Y.). 5:2 333-7.

Eakin E Ann, Bouvier Jacques, Sakanini A. Judy, Craik S. Charlers., and McKerrow H. James. (1990) Amplification and sequencing of genomic DNA fragments encoding cysteine proteases from protozoan parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 39 1-8.

Edman P. Begg G. (1967) A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.* 1:80-91

Gillet L., Roberecht P., Waelbroeck M., Camus J.C., Deneef P., Koenig W., Christophe J., (1984) Interaction of Gila monster venom with secretin receptors in rat pancreatic membranes. *Peptides (Fayetteville, N.Y.)* 5:2 407-9.

Gomez F., Vardeemeers A., Vandermeers P. MC., Herzog R., Rathe J., Stievenart M., Winand J., Christophe J., (1989). Purification and characterization of five variants of phospholipase A₂ and complete primary structure of the main phospholipase A₂ variant in Heloderma suspectum (Gila monster) venom. *Eur. J. Biochem.* 186 (1-2): 23-33.

Grundemart L., Hogestatt E.D., (1990). Vascular effects of helodermin, helospectin I, helospectin II: a comparison with vasoactive intestinal peptide (VIP). *Br.J.Pharmacol.* 99(3): 526-8

Hoshino M., Yandihavd Ch., Hong Y.M., Kishida S., Katsumdrv Y., Vaundermeers A., Yandihard N. (1984) Primary structure of helodermin, a VIP secretin-like peptide isolated from Gila monster venom. *FEBS Lett.*178:2 233-9.

Jaques R. (1956) The hyaluronidase content of animal venoms. In:Venoms, Amer. Ass. Adv. Sci: 291.

Jensen R.T. Charlton C.G., Adach H., Jones S.W., Odonohue T.L., Garner J.P., (1983) Use of 125 I-Secretin to identify and characterize high-affinity secretin receptors on pancreatic acini. *Am.J.Physiol.*245:2 G-186-195.

Komori Y., Nikai T., Sugihara H. (1988) Purification and characterization of lethal toxin from the venom of Heloderma horridum horridum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154,613-619.

Laemli U.K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685

Matsudaira P. (1987) Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes *J.Biol.Chem.* 262, 10035-10038

Mochca-Morales J., Martin B.M.,and Possani L.D. (1990) Isolation and Characterization of helothermine a novel toxin from Heloderma horridum horridum (Mexican beaded lizard) *Venom Toxicon*, 28:3 299 - 309.

Mebis D. and Raudonat H.W. (1966) Biochemical investigations of Heloderma venom. Membs. Inst. Butantantan 33, 907.

Nikai Toshiak., Imai Kumiko., Sugihara Hisayoshi, Tu A.T. (1988) Isolation and characterization of Heloderma horridum horridum (beaded lizard) venom. Archives of Biochemistry and Biophysics 264:1 270-280.

Parker D.S., Raufman J.P., O'Donohue T.L., Bledsoe M., Yoshida H., Pissano J.J. (1984) Aminoacid sequences of helospectins, new members of the glucagon superfamily, found in Gila monster venom. J.Biol.Chem.259:19 1175-5.

Raufman J.P., Jensen R.T., Sutliff V.E., Pissano J.J., Gardner J.D., (1982). Actions of Gila monster venom of dispersed acini from guinea pig pancreas. Am. J. Physiol. 242:5 6470 - 6473

Robberecht P., Waelbroeck M., Dehaye J.P., Winand J., Vandermeers A., Vandermeers-Piret M.C., Christophe J. (1984). Evidence that helodermin, a newly extracted peptide from Gila monster venom is a member of the secretin/VIP/PHI family of peptides with an original pattern of biological properties FEBS Lett.166:2 277-82.

Russell F.E., Bogert C.M., (1981) Gila monster: Its biology, venom and bite - a review, Toxicon 19 (3) 341-59.

Si Yun Fang., Vitale Maria., Fehlner Paul., and King T.P. (1988) cDNA cloning and primary structure of a white face hornet venom allergen, antigen 5. PNAS 88 895-899.

Sosa B.P. Alagón A.C., Martin B.M., Possani L.D. (1986) Biochemical characterization of the phospholipase A2 purified from the venom of the Mexican beaded lizard (Heloderma horridum horridum Wiegmann) Biochemistry 25:10 2927-33.

Streiffer R.H. (1986) Bite of venomous lizard, the Gila monster. Postgrad Med.79 (2) 279-9.

Styblova Z. and Kornalik F. (1967) Enzymatic properties of Heloderma suspectum venom. Toxicon 5, 139.

Tolksdorf S., Mc Ready M. H., McGullach D.R. and Schewenck E. (1949). The turbidimetric assay of hyaluronidase. J. Lab. Clin. Med.34, 74.

Tu, A.T. (1977) Gila monster venoms. In: Venoms: Chemistry and Molecular Biology, 531-534 (Tu.A.T. Ed.) New York: John Wiley

Tu A.T. and Murdock D.S. (1967). Protein nature and some enzymatic properties of the lizard. Heloderma suspectum suspectum (Gila monster) venom. Comp. Biochem. Physiol. 22, 389.

Tu A.T., Hendon R.R. (1983). Characterization of Lizard Venom Hyaluronidase and evidence for its action as a spreading factor, Com. Biochem. Physiol. 7:2,377-388.

Tu A.T., Hendon A.R. (1981). Biochemical characterization of the lizard Gilatoxin, Biochemistry 20, 3517-3522.

Vandermeers A., Gourlet P., Vandermeers-Piret M.C., Cauvin A., De Neef P., Rathe J., Suoboda M., Roberecht P., Christophe J., (1987). Chemical immunological and biological properties of peptides vasoactive-like in intestinal vasoactive-intestinal-peptide and Peptide-Histidine-Isoleucinamide extracted from the venom of the two lizards (Heloderma horridum and Heloderma suspectum). Eur. J. Biochem. 164:2, 321-7.

Vandermeers A., Vandermeers-Piret Mavie C., Roberecht P., Waelbroeck M., Dehave J.P., Winand J., Christophe J. (1984). Purification of a novel pancreatic secretory factor (PSF) and a novel peptide with VIP-and secretin-like properties (helodermin) from Gila monster venom. FEBS Letts. 166:2,273-6.

Vesley D.L. (1982). Gila monster and Mexican beaded lizard venoms enhance guanylate cyclase activity. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 36:1,119-27.

Wellner David, Pannerselvam C., Horecker B.L. (1990) Sequencing of peptides and proteins with blocked N-terminal aminoacids: N-acetyserine or acetylthreanine. (1949) PNAS 87, 1947 - 1949

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF HELOTHERMINE, A NOVEL TOXIN FROM *HELODERMA HORRIDUM HORRIDUM* (MEXICAN BEADED LIZARD) VENOM*

JAVIER MOCHCA-MORALES,¹ BRIAN M. MARTIN² and LOURIVAL D. POSSANI^{1†}

¹Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, UNAM, Apartado Postal 510-3 Cuernavaca, Morelos 62270, Mexico; ²National Institute of Mental Health, Molecular Neurogenetics Unit, Clinical Neuroscience Branch, ADAMHA, Building 10 3D16, Bethesda, Maryland, 20892, U.S.A.

(Accepted for publication 8 August 1989)

J. MOCHCA-MORALES, B. M. MARTIN and L. D. POSSANI. Isolation and characterization of Helothermine, a novel toxin from *Heloderma horridum horridum* (Mexican beaded lizard) venom. *Toxicon* 28, 299-309, 1990.—A protein toxic to mice was isolated from the venom of the Mexican beaded lizard *Heloderma horridum horridum* by a combination of gel filtration (Sephadex G-75) and ion exchange chromatography (both diethylaminoethyl-cellulose [DE-cellulose] and carboxymethyl-cellulose [CM-cellulose]). The purified polypeptide component has an apparent mol. wt of 25,500 and is composed of approximately 220 amino acid residues. It has an isoelectric point (pI) of 6.8 and its *N*-terminal amino acid sequence was shown to be: Glu-Ala-Ser-Pro-Lys-Leu-Pro-Gly-Leu-Met-Thr-Ser-Asn-Pro-Asp-Gln-Gln-Thr-Glu-Ile. This sequence has no significant similarity with any other protein previously reported in the literature. Enzymatic activities such as phospholipase, hyaluronidase and proteinase, commonly present in venoms, could not be demonstrated in this protein. Patch-clamp experiments conducted with excitable membranes show no effects on Na⁺, K⁺ or Ca²⁺ ion channels. Among the constant physiological effects observed in mice injected with this toxin are lethargy, partial paralysis of rear limbs and lowering of body temperature, suggesting that it might be a hypothermic toxin. We propose calling this toxin Helothermine.

INTRODUCTION

THE MEXICAN beaded lizard (*Heloderma horridum horridum*) is one of the few existing subspecies of venomous lizards in the world. There are only two species (*H. suspectum* and *H. horridum*) with five subspecies, one of which is the Mexican beaded lizard. Its geographical distribution is limited mainly to the Pacific Coast of Mexico, and the Arizona desert in the United States (BOGERT and MARTIN DEL CAMPO, 1956). This rare animal is in danger of extinction. Its venom was studied, as early as 1864 (See reviews by

*Part of this paper was presented as a thesis dissertation for obtaining the Master of Sciences Degree by J. Mochca-Morales, National University of Mexico, 11 August 1988.

†To whom correspondence should be addressed.

LOEB, 1913; TU, 1977). In recent years more detailed chemical and physiological studies have been performed with this venom. The venom of both species have very similar components (ALAGON *et al.*, 1982; HENDON and TU, 1981). Among the well characterized components of the venom are enzymes, such as hyaluronidase (TU and HENDON, 1983), arginine hydrolase (ALAGON *et al.*, 1982), kallikrein-like enzymes (MEBS, 1969; ALAGON *et al.*, 1986), phospholipase A2 (SOSA *et al.*, 1986), and a pancreatic secretory protein with phospholipase activity (DEHAVE *et al.*, 1984*a,b*). Several peptides related to the vasoactive intestinal peptide-secretin family (PARKER *et al.*, 1984; HOSHINO *et al.*, 1984; GILLET *et al.*, 1984; ROBBERECHT *et al.*, 1984; VANDERMEERS *et al.*, 1984, 1987), and a neurotoxin (HENDON and TU, 1981) have also been isolated from this venom. The latter called gilatoxin, is an acidic protein with an isoelectric point of 4.25 and a mol. wt of 35,000–37,500. Recently, KOMORI *et al.* (1988) reported the isolation of a second toxin from *H. horridum horridum*, which has a mol. wt of 28,000 and causes inhibition of contractile response to direct stimulation of the isolated mouse hemi-diaphragm. More recently, a third toxin has been described in this venom (NIKAI *et al.*, 1988). In the present communication we report the isolation and characterization of a fourth novel toxin, from the venom of the Mexican beaded lizard. Amino terminal sequence analysis of the protein showed a unique amino acid sequence. One of the major clinical symptoms of mice injected with this toxin was a depressed body temperature, and therefore it was named Helothermine (toxin from *Heloderma* with a hypothermic effect).

MATERIALS AND METHODS

Source of venom

Heloderma h. horridum were captured in the area of Chamela (State of Jalisco, Mexico) in 1979, kept alive in the laboratory, and their venom was regularly extracted by the technique described by LOEB (1913). The venom (mouth secretion) was centrifuged for 10 min at 10,000 × *g*, in a refrigerated Sorvall centrifuge with a SS-34 rotor, and the supernatant was immediately freeze-dried and kept at –20°C, until used.

Separation procedures

The purification of Helothermine involved several chromatographic steps. Lyophilized venom was dissolved in 50 mM ammonium acetate buffer, pH 7.0, and clarified by centrifugation for 15 min at 10,000 × *g*. Soluble venom was applied to the first column (Sephadex G-75, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden), and run in the presence of the solubilization buffer. Tubes containing the toxic fractions were pooled and immediately applied to DEAE-cellulose (Whatman Inc., Clifton, NJ, U.S.A.) equilibrated with 50 mM ammonium acetate buffer, pH 7.0. Material not adsorbed to the column was dialysed against 20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.7 and chromatographed on a CM-cellulose from Whatman Inc.) column. The toxin was eluted with a NaCl gradient from 0 to 0.3 M. Fractions containing the toxin were pooled, dialysed against 20 mM phosphate buffer, pH 6.0 and applied to a second CM-cellulose column. The latter column was eluted with a NaCl gradient from 0 to 0.3 M in 20 mM phosphate buffer, pH 6.0. The main component was Helothermine. Detailed information concerning chromatographic procedures are given in the legends to the figures. Recovery was calculated based on absorbancy at 280 nm. The first column was run in the cold room (4°C), while the ion exchange columns were run at room temperature (20–25°C). All chemicals and solvents were analytical grade reagents.

Lethality tests

Three designations were used to define lethality of the various protein components of the venom. 'Nontoxic' means that the mouse injected did not show any symptoms of intoxication (similar to injection of saline or buffer alone). 'Toxic' means that the animal injected showed any of the following symptoms: lethargy; partial paralysis of rear limbs; diarrhoea; and lowering of body temperature, but recovered within 20 hr after injection. 'Lethal' means the animal died after showing some of the above symptoms. If intoxicated animals are touched in the dorsal part of the body sporadic tonic/clonic convulsions are manifested, and the tail sometimes is erected, similar to opisthotonus seen with tetanus intoxication. Upon necropsy intestinal distension is observed. This effect is independent of the route of toxin administration (i.p. or i.v.). Body temperature was measured intrarectally. Male mice of the strain CD1 were used for lethality tests. Usually 0.1–0.3 ml of buffer containing toxic fractions were injected i.p. Ethical standards for the experimental use of live animals were followed. Animals

injected with 25 μg of toxin per 20 g body weight survived, while 80% of the mice injected with 50 μg /20 g weight died, and injection of 75 μg /20 g body weight was lethal to all animals.

Electrophoresis and immunodiffusion

Electrophoresis was performed by the method of REISFELD *et al.* (1962). Polyacrylamide gel electrophoresis in presence of sodium dodecyl sulfate (SDS) was performed by the technique of LAEMMLI (1970). The isoelectric focusing experiment was conducted with pH 3 to 10 ampholytes (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, U.S.A.). Cylindrical gels of polyacrylamide were used for isoelectric focusing, at a constant current of 2 mA increasing voltage up to 350 V, over 3 hr at 20°C. Equine myoglobin with an isoelectric point of 7.0 was used as standard. Immunodiffusion experiments were conducted with sheep anti-serum raised and assayed according to our previous publication (ALAGON *et al.*, 1982).

Enzymatic assays

N-benzoyl-L-arginine ethyl ester (Bz-Arg-OEt) and *N*-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (Bz-Tyr-OEt) hydrolase activities were measured spectrophotometrically as described (ALAGON *et al.*, 1982). Hyaluronidase was measured by the method of TOLKSDORF *et al.* (1949) and phospholipase A activity was determined by the technique described (SHILOAH *et al.*, 1973).

Amino acid composition and sequence determination

Amino acid composition was obtained using a Durrum D-500 analyzer after hydrolysis in 6 M HCl, at 110°C, for 20 and 48 hr, of samples in sealed and evacuated tubes (MOORE and STEIN, 1963). Half-cystine content was determined as cysteic acid after performic acid oxidation. Prior to automatic sequence determination (EDMAN and BEGG, 1967) the toxin was reduced and pyridylethylated, as described (MARTIN *et al.*, 1988). Amino acid sequence was determined using an Applied Biosystem (Foster City, CA, U.S.A.) 470A equipped with a 120A on-line PTH-analyzer as described previously (MARTIN *et al.*, 1988).

RESULTS

Application of soluble venom from *H. h. horridum* to the Sephadex G-75 column separates at least five groups of material with different mol. wts (Fig. 1). Fraction II contains lethal components and corresponds to 39% of the material recovered. This fraction when applied to a DE-cellulose column (Fig. 2a) removes several proteins by adsorption to the resin. Fraction II.1 (Fig. 2a), which is not bound to the column, contains toxic components. It corresponds to 21% of the material recovered. Fraction II-2 also contains toxic material and can be separated into several components (at least four) by a salt gradient from 0 to 0.5 M (data not shown) Figure 2b shows further separation of fraction II.1 in a CM-cellulose column at pH 4.7. From several sub-fractions obtained, only fraction II.1.4 is a lethal component, amounting to 36% of the material applied to the column. The final purification step, shown in Fig. 2c, consists of a second CM-cellulose column, eluted with NaCl gradient in phosphate buffer, pH 6.0. The main component (approximately 80% of the material applied to the column and 90% of the material recovered) corresponds to Helothermine, which is homogeneous by polyacrylamide gel electrophoresis (Fig. 3). The relative concentration of this toxin in the soluble venom is therefore approximately 2.6%, based on absorption units at 280 nm. This purification procedure was repeated over ten times, providing essentially the same results. Table I gives an example of lethality and recovery values found during the chromatographic procedures. Chromatographic verification of the purity of the material was performed in two additional systems. The first was column chromatography in Sephadex G-75 in the presence of 1 M NaCl buffered with 0.1 M Tris-HCl, pH 8.2, and the second consisted of sample application through an I-125 (Waters Associates, CA, U.S.A.) column using a Hewlett-Packard 1084 high performance liquid chromatograph. In both systems a single symmetric component was obtained (data not shown). Samples of the purified toxin

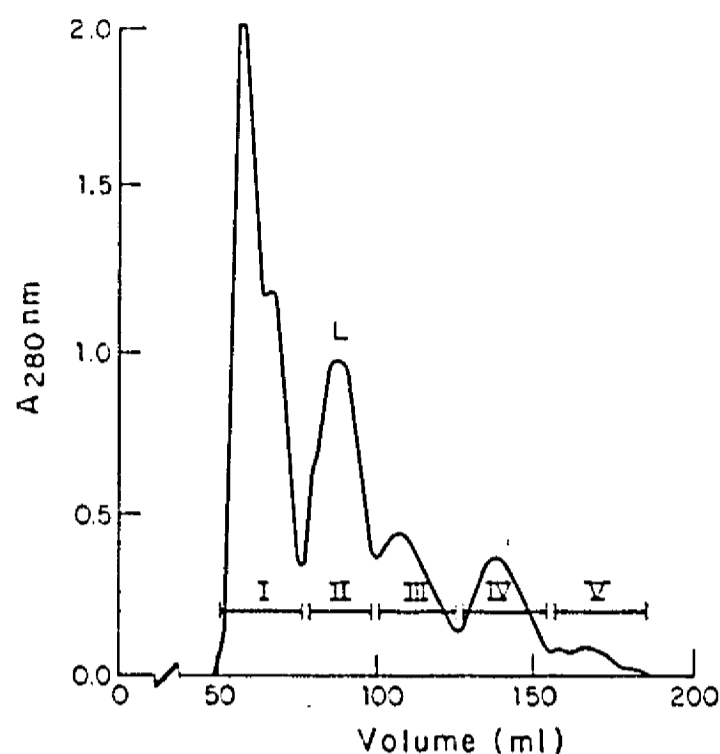


FIG. 1. SEPHADEN G-75 SEPARATION OF *Heloderma* VENOM.

Soluble venom (200 mg in 4 ml) of *Heloderma horridum horridum* was fractionated in a Sephadex G-75 column (1.6 × 200 cm) equilibrated and run in 50 mM ammonium acetate buffer, pH 7.0, at flow rate of 36 ml/hr. Tubes containing 6.0 ml were collected and pooled based on absorbance at 280 nm, as indicated by the horizontal bars (Fractions I-V). Overall column recovery was 98%, from which approximately 41% corresponds to fraction I, 39% to fraction II, and 18% to the minor fractions III to V, respectively. Most of the venom lethal activity was situated in fraction II, used for further purification.

were used for amino acid composition (Table 2). A total of 221 amino acid residues plus tryptophan(s) (not determined) were found in Helothermine, which gives a minimum mol. wt of 25,500, consistent with the apparent mol. wt determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Since the toxin migrates as a single band in SDS-gels, under reducing conditions (presence of beta-mercaptoethanol), it appears to be a single polypeptide chain. The isoelectric point of the toxin was 6.8 and migrates as a single band, very close to the myoglobin (pI 7.0), used as control. Immunodiffusion shows only one precipitating band (data not shown). Amino acid sequence determination of Helothermine revealed only one amino acid residue per cycle, with an initial yield indicative of a single polypeptide chain. These results verify the homogeneity of this toxin. The *N*-terminal amino acid sequence is: Glu-Ala-Ser-Pro-Lys-Leu-Pro-Gly-Leu-Met-Thr-Ser-Asn-Pro-Asp-Gln-Gln-Thr-Glu-Ile...

Mice were killed by injection of Helothermine with the following symptoms: lethargy; partial paralysis of rear limbs, intestinal distension; and a considerable lowering of body temperature. Figure 4 shows a graphic representation of the decrease of body temperature of mice injected with 30 µg of toxin. Electrophysiological assays using three different types of excitable membranes show no detectable effect on Na⁺, K⁺ or Ca²⁺ permeabilities (unpublished results).

Finally, the presence of enzymatic activity associated with this protein was examined with substrates for the following: Hyaluronidase; Bz-Arg-OEt and Bz-Tyr-OEt hydrolases; and phospholipases. The protein gave negative results with samples containing up to 20 µg of Helothermine per assay. In our experimental conditions, 0.5–1.0 µg of bovine pancreatic trypsin can be easily detected using the synthetic substrate *N*-benzoyl-L-

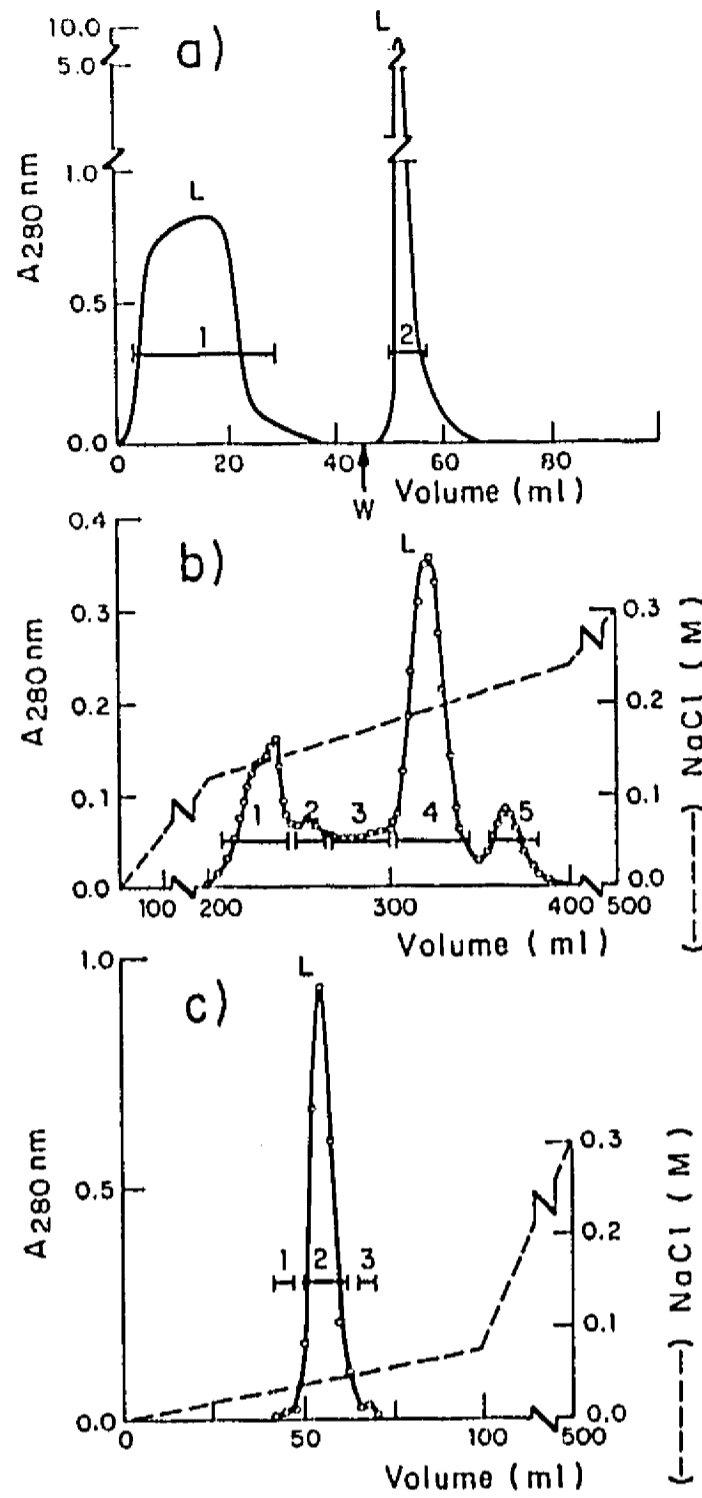


FIG. 2. ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY OF TOXIC FRACTIONS.

(a) Fraction II from Fig. 1 was applied to a DE-cellulose column (0.9×30 cm) in 50 mM ammonium acetate buffer, pH 7.0, at flow rate of 40 ml/hr. Approximately 78 absorbance units in 18 ml solution was loaded to the column from which 94% was recovered. Lethal (L) fraction II.1 corresponding to the unbound material, amounted to 21% of the material recovered, and contained the toxin. Fraction II.2 eluted with 0.5 M ammonium acetate buffer, pH 7.0 (vertical arrow labeled W), corresponded to 73% of the material recovered. This fraction was also lethal to mice and contains a Bz-Arg-OEt hydrolase activity. (b) Fraction II.1 from Fig. 2a (30 ml containing 16.4 units of absorbance at 280 nm) was dialyzed against 20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.7, and applied to a CM-cellulose column (0.9×30 cm). The column was eluted with a linear gradient of NaCl, from 0 to 0.3 M in ammonium acetate buffer, pH 4.7 (200 ml each side of the gradient), at flow rate of 40 ml/hr. Fractions of 2 ml were collected and pooled according to the absorbance at 280 nm, as indicated by the horizontal bars. Fraction II.1.4 (labeled 4) was lethal to mice and corresponded to approximately 36% of the material recovered. Overall recovery from this column was approximately 83%. (c) Part of fraction II.1.4 from Fig. 2b (6.8 absorbance units at 280 nm), was dialyzed with 20 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0 and applied to a CM-cellulose column (0.9×15 cm). The column was previously equilibrated with the same phosphate buffer, and protein elution was obtained with a linear gradient of NaCl from 0 to 0.3 M (200 ml each), collecting 2 ml fractions at a flow rate of 40 ml/hr. Overall recovery was 84%, and Helothermine (Fraction II.1.4.2, labeled L) corresponded to approximately 80% of the material applied to the column (5.4 absorbance units).

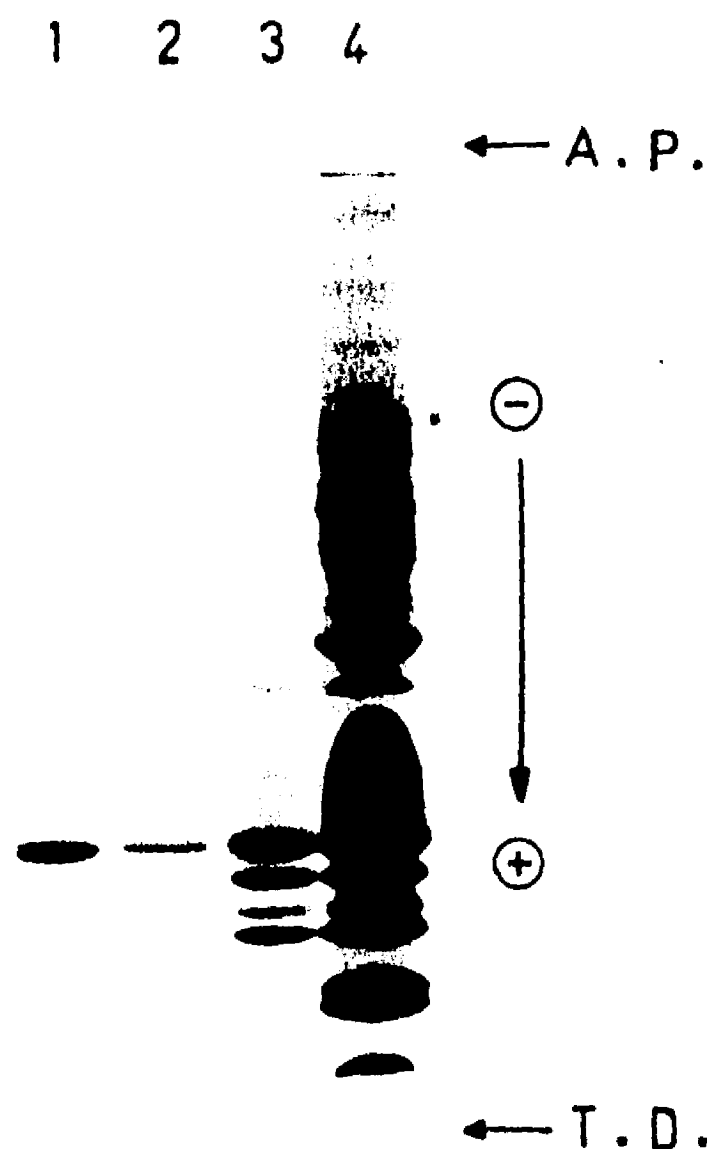


FIG. 3. ELECTROPHORETIC ANALYSIS OF CHROMATOGRAPHIC FRACTIONS. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) at 15% concentration of acrylamide, according to the procedure of LAEMMLI (1970), was used to analyze various fractions obtained from the chromatographic columns. Lane 1 is 10 μ g of purified Helothermine (fraction II.1.4.2); lane 2 is 20 μ g of fraction II.1 from Fig. 2a; lane 3 is 20 μ g of protein from fraction II of Sephadex G-75 of Fig. 1 and lane 4 is soluble venom (50 μ g). The gel was stained with Coomassie Blue R-250. A.P. means application point, and T.D. is tracking dye.

arginine ethyl ester. The same occurs with bovine chymotrypsin using the substrate *N*-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester. Phospholipase activity can be followed by the titrimetric method described by SHILOAH *et al.* (1973) using amounts of 1.0 μ g of purified phospholipase of *H. horridum horridum* per 3 ml of a 10% (w/v) solution of egg yolk. Hyaluronidase activity can be verified (TOLKSDORF *et al.*, 1949) using approximately 5 μ g of purified hyaluronidase from *Centruroides limpidus limpidus* venom.

DISCUSSION

Purification of Helothermine by the procedure described is simple and reproducible, enabling us to obtain in pure form a protein toxic to mice. Chemical characterization of Helothermine shows that it is different from the other three toxins found (HENDON and TU, 1981; KOMORI *et al.*, 1988; NIKAI *et al.*, 1988) thus far in this venom. For comparative purposes we have included in Table 2 the amino acid composition of several toxins purified from *Heloderma* venoms and in Fig. 5 we compare the *N*-terminal amino acid

TABLE 1. RECOVERY AND LETHALITY OF CHROMATOGRAPHIC COMPONENTS

Column used (Fig.)	Protein component	Absorbance units (at 280 nm)	Recovery (%)	Lethality
Sephadex G-75 (Fig. 1)	Soluble Venom	200	100	Lethal
	Fraction I	82.0	41.0	Toxic
	Fraction II	78.0	39.0	Lethal
	Fraction III	19.6	9.8	Nontoxic
	Fraction IV + V	16.4	8.2	Nontoxic
	Protein recovered	196.0	98.0	
DE-cellulose (Fig. 2a)	Loaded fraction II	78.0	100	Lethal
	Sub-fraction II.1	16.38	21.0	Lethal
	Sub-fraction II.2	56.94	73.0	Lethal
	Protein recovered	73.32	94.0	
DE-cellulose (Fig. 2b)	Loaded II.1	16.4	100	Lethal
	Sub-fraction II.1.1	3.42	20.8	Nontoxic
	Sub-fraction II.1.2	1.20	7.3	Nontoxic
	Sub-fraction II.1.3	1.75	10.6	Nontoxic
	Sub-fraction II.1.4	5.90	36.0	Lethal
	Sub-fraction II.1.5	1.30	7.9	Nontoxic
	Protein recovered	13.57	82.7	
CM-cellulose (Fig. 2c)	Loaded II.1.4	6.8	100	Lethal
	Sub-fraction II.1.4.1	0.10	1.4	Toxic
	Sub-fraction II.1.4.2	5.40	79.4	Lethal
	Sub-fraction II.1.4.3	0.24	3.6	Nontoxic
	Protein recovered	5.74	84.4	

TABLE 2. AMINO ACID COMPOSITION OF TOXINS FROM *Heloderma*

Amino acid	Toxin-1*	Toxin-2*	Toxin-3†	Toxin-4‡	This work
Asp	29	27	24	29	30
Thr	15	14	19	16	20
Ser	26	29	47	29	12
Glu	23	29	16	27	27
Pro	16	17	8	14	25
Gly	38	42	48	33	13
Ala	17	17	23	18	11
Val	22	20	9	23	7
Met	8	7	1	4	5
Ile	17	14	9	15	8
Leu	22	20	9	22	4
Tyr	9	7	8	9	7
Phe	7	7	7	8	2
His	10	14	10	8	4
Lys	13	14	15	11	16
Arg	7	7	11	7	10
1/2 Cys	17	16	8	15	20
Trp	4	1	3	4	—§
Total	311	301	275	292	221

*Toxin-1 and toxin-2 refers to Gilatoxin from *H. h. suspectum* and *H. h. horridum* respectively, from HENDON and TU, 1981.

†Toxin-3 refers to lethal toxin from *H. h. horridum* from KOMORI *et al.*, 1988.

‡Toxin-4 refers to horridum toxin from *H. horridum* from NIKAI *et al.*, 1988.

§Means not determined.

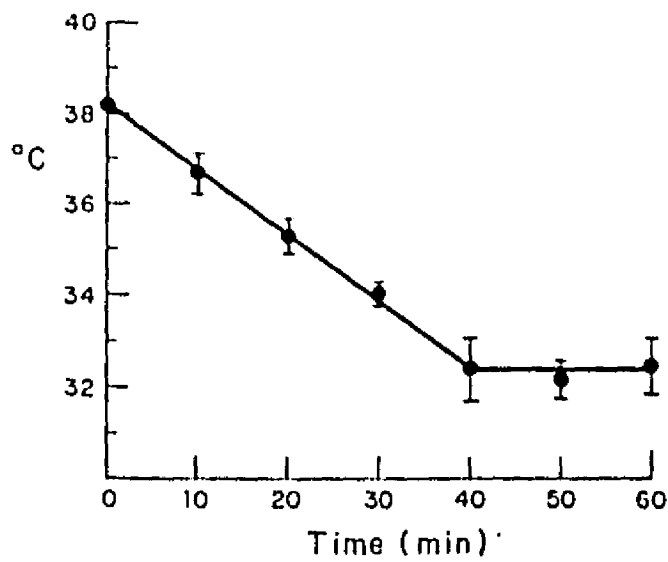


FIG. 4. EFFECT OF HELOOTHERMINE ON BODY TEMPERATURE OF MICE.

Helothermine at concentration of $30 \mu\text{g}$ ($\cong \text{LD}_{50}$) was injected i.p. in 8 mice of the strain CD1. Intra-rectal temperature of mice were taken at 10 min intervals, using a quick response thermometer (trade mark: Schultheis). Within the first 40 min after injection a constant body temperature lowering was observed in all mice (vertical bars indicate standard deviations), reaching a plateau at 32 to 33°C. The body temperature remained at these values for at least another 30 min. Four mice survived the experiment. Control animals were injected with *Naja nigricollis* snake venom and with a purified toxin from the scorpion *Centruroides noxius*. Four mice injected with $8 \mu\text{g}$ of snake venom survived with no appreciable temperature changes; while two mice injected with $30 \mu\text{g}$ of this venom had a temperature drop to 36°C and one mouse injected with $80 \mu\text{g}$ also reached 36°C, but died 16 min after injection. Scorpion toxin H.9.2 at $4 \mu\text{g}$ per 20 g mouse body weight caused very little variation of body temperature: two mice injected with this toxin had body temperatures of 37°C after 1 hr. None of the control animals ever had low temperatures, such as 32°C, found with Helothermine.

Amino acid	1	5	10	15	20	25
Helothermine	E A S P K L P G L M T S N P D Q Q T E I	—	—	—	—	—
Lethal toxin	A Y T T E Q X R A L X G T X R F Y A R F P K N V V					
Horridum toxin	I I G G Q E X D E T G H P W L A L L H R S E G S D					
Helodermatine	I V G G Q E C P Q V I H P W L G L X L X Y	—	—	—	—	—
Phospholipase	G A F I M P G T L W C G A G N A A S D Y S Q L G T					
Amino acid	26	30	35	40	Reference	
Helothermine	—	—	—	—	This work	
Lethal toxin	I G K R D W L G	—	—	—	KOMORI <i>et al.</i> , 1988	
Horridum toxin	D X G V L L N R X D I L	—	—	—	NIKAI <i>et al.</i> , 1988	
Helodermatine	—	—	—	—	ALAGON <i>et al.</i> , 1986	
Phospholipase	E K D T D M C C R D H D H C	—	—	—	SOSA <i>et al.</i> , 1986	

FIG. 5. COMPARISON OF THE N-TERMINAL AMINO ACID SEQUENCES OF TOXINS AND OTHER COMPONENTS ISOLATED FROM *H. h. horridum* VENOM.

sequence of several components purified from the same venoms. It is clear that the Helothermine sequence has no similarity to any of the other components. We have also conducted a search for sequence similarities with other known proteins using the data bank and the program Eugene (Baylor College of Medicine, Houston-Texas, U.S.A.). No significant similarity was obtained with any of the protein sequences in the above data bank. Only small similarities were found with proteins like the human prorelaxin precursor. In this example six amino acids of the domain boundary 1–14 from Helothermine are identical with the domain 104–117 of the precursor. Similarly six amino acids of the domain 5–17 of Helothermine correspond to amino acids at positions 55–67 of the

bovine proenkephalin precursor. Less significant similarities were found with some neurotoxins from the venom of green mamba snakes. For example, four amino acids from position 5-15 of Helothermine correspond to identical positions of the domain 29-39 from toxin 2 of the Eastern green mamba, and five amino acids of the same position of Helothermine correspond to the domain 28-38 of the Western green mamba toxin 2. However, since these similarities are not statistically significant, more sequence data from Helothermine must be obtained before discussing this subject further.

Another important aspect of this work is the physiological role of this toxin. Beaded lizards are known to feed on eggs and new born rats and birds. Since they are slow moving animals it is conceivable that they have evolved specific toxins to immobilize their prey. Following this rationale and comparing the *Heloderma* venoms with that of snakes and scorpions there are important differences among these poisonous animals. Elapid snake venoms have low mol. wt toxins that block specifically certain types of receptor molecules on the membrane of excitable tissues, such as the acetylcholine receptor (CHIANG and LEE, 1963). Scorpion venoms contain ion channel blocking peptides (CATTERALL, 1976; CARBONE *et al.*, 1982). *Heloderma* venom contains larger mol. wt proteins (HENDON and TU, 1981; KOMORI *et al.*, 1988; NIKAI *et al.*, 1988) that are toxic to mice, but from which no exact molecular mechanism of action is yet known. Gilatoxin (HENDON and TU, 1981) was reported to be a neuromuscular blocker which causes labored breathing and paralysis of locomotion of intoxicated animals. Comparison of chromatographic profiles strongly suggest that gilatoxin (from *H. suspectum*), and component II-2 of the beaded lizard (our Fig. 2b) correspond to similar toxic fractions. Both are different from Helothermine. Lethal toxin from *H. h. horridum* (KOMORI *et al.*, 1988) causes inhibition of the contractile response to direct stimulation of skeletal muscles, with a presumably paralyzing effect on the diaphragm. This toxin is eluted at the beginning of the Sephadex G-75 column and called component A, by KOMORI *et al.* (1988). It corresponds to our fraction I (Fig. 1), while Helothermine is eluted in fraction II. The *N*-terminal amino acid sequence of horridum toxin (NIKAI *et al.*, 1988) is very different from the other toxins isolated from *Heloderma* venom (Fig. 5). It has an LD₅₀ value (0.38 µg/g) in mice, intermediate between gilatoxin (2.7 µg/g) and 0.135 µg/g for lethal toxin (KOMORI *et al.*, 1988). Helothermine has an LD₅₀ certainly lower than 2.5 µg/g, but higher than 1.25 µg/g. Some effects observed in mice injected with Helothermine are lethargy, partial paralysis of rear limbs and lowering of body temperature. Additionally, electrophysiological experiments were conducted to study the possible mechanism of action of Helothermine. Three distinct preparations were assayed: squid axon membranes, ganglion cells of the dorsal root of chick (CARBONE, E. and POSSANI, L. D., unpublished results) and rat neonatal heart cells (YATANI, A., MOCHICA-MORALES, J. and BROWN, A. M., unpublished results). The results obtained indicate that Helothermine does not affect Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ permeability under the experimental conditions assayed. However, preliminary results obtained with papillary muscle of left ventricle of rat, treated with 2 µg of Helothermine, show a 20% decrease in tension (PODER, T., MOCHICA-MORALES, J. and POSSANI, L. D., unpublished results).

In conclusion, the four toxins described thus far in the venom of *Heloderma*, are distinct molecular components, which share some similarities: they all have acidic isoelectric points, single polypeptide chains, with high mol. wts (greater than 25,000), a definitive physiological effect on muscle tissues, and they certainly play an important cooperative toxic effect with other components of the venom, as already demonstrated by the experiments of HENDON and TU (1981).

Acknowledgements—The authors thank Professor EMILIO CARBONE from the Dipartimento de Anatomia e Fisiologia Umana, University of Torino (Italy), and Professor ARTHUR M. BROWN and Drs TOM PODER and AISUKO YATANI from the Department of Physiology and Molecular Biophysics of Baylor College of Medicine (Houston, TX, U.S.A.) for the electrophysiological experiments with Helothermine. The authors are thankful to Mr FREDY CORONAS VALDERRAMA for technical assistance. Supported in part (scholarship to J.M.M.) by the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACyT).

REFERENCES

- ALAGON, A. C., MALDONADO, M. E. A., JULIA, J. Z., SANCHEZ, C. R. and POSSANI, L. D. (1982) Venom from two subspecies of *Heloderma horridum* (Mexican beaded lizard): general characterization and purification of *N*-benzoyl-L-arginine ethyl ester hydrolase. *Toxicon* **20**, 463–475.
- ALAGON, A. C., POSSANI, L. D., SMART, J. and SCIBLEUNING, W. D. (1986) Helodermatine, a kallikrein-like, hypotensive enzyme from the venom of the *Heloderma horridum horridum* (Mexican beaded lizard). *J. exp. Med.* **164**, 1835–1845.
- BOGERT, C. M. and MARTIN DEL CAMPO, R. (1956) The Gila monster and its allies. The relationships, habits and behavior of lizards of the family Helodermatidae. *Bull. Am. Mus. nat. Hist.* **109**, 1–238.
- CATTERALL, W. (1976) Purification of a toxic protein from scorpion venom which activates the action potential Na^+ ionophore. *J. biol. Chem.* **251**, 5528–5536.
- CARBONE, E., WANKE, E., PRESTIPINO, G., POSSANI, L. D. and MAELICKE, A. (1982) Selective blockage of voltage-dependent K^+ channels by novel scorpion toxin. *Nature, Lond.* **296**, 90–91.
- CHANG, C. C. and LEE, C. Y. (1963) Isolation of neurotoxins from the venom of *Bungarus multicinctus* and their modes of neuromuscular blocking action. *Archs Int. Pharmacodyn. Thér.* **144**, 241–257.
- DEHAYE, J. P., WINAND, J., DAMIEN, C., POLOCZEK, P., SVOBODA, M. and CHRISTOPHE, J. (1984a) Stimulatory effects of Gila monster venom on rat pancreatic acini. *Peptides* **5**, 333–337.
- DEHAYE, J. P., WINAND, J., MICHEL, P., ROBBERECHT, P., WAELBROECK, M., VANDERMEERS, A., VANDERMEERS-PIRET, M. C. and CHRISTOPHE, J. (1984b) Pancreatic secretory factor (PSF), a protein from Gila monster venom stimulating enzyme secretion from rat pancreatic acini. *FEBS Lett.* **166**, 283–287.
- EDMAN, P. A. and BEGG, G. (1967) A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.* **1**, 80–91.
- GILLET, L., ROBBERECHT, P., WAELBROECK, M., CAMUS, J. C., DENEFF, P., KOENING, W. and CHRISTOPHE, J. (1984) Interaction of Gila monster venom with secretin receptors in rat pancreatic membranes. *Peptides* **5**, 407–409.
- HENDON, R. R. and TU, A. T. (1981) Biochemical characterization of the lizard Gilatoxin. *Biochemistry* **20**, 3517–3522.
- HOSHINO, M., YANAIHARA, C., HONG, Y. M., KISHIDA, S., KATSUMARU, Y., VANDERMEERS, A., VANDERMEERS-PIRET, M. C., ROBBERECHT, P., CHRISTOPHE, J. and YANAIHARA, N. (1984) Primary structure of Helodermin, a VIP-secretin-like peptide isolated from Gila monster venom. *FEBS Lett.* **178**, 233–239.
- KOMORI, Y., NIKAI, T. and SUGIHARA, H. (1988) Purification and characterization of a lethal toxin from the venom of *Heloderma horridum horridum*. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **154**, 613–619.
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature, Lond.* **227**, 680–685.
- LOEB, L. (1913) The venom of *Heloderma*. In: *The Venom of Heloderma*, pp. 1–48 (LOEB, L., Ed.) Washington, D.C.: Carnegie Institution of Washington.
- MARTIN, B. M., CARBONE, E., YATANI, A., BROWN, A. M., RAMIREZ, A. N., GURROLA, G. B. and POSSANI, L. D. (1988) Amino acid sequence and physiological characterization of toxins from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus tecomanus* Hoffmann. *Toxicon* **26**, 785–794.
- MERS, D. (1969) Isolierung und Eigenschaften eines Kallikreins aus den Gift der Krustenechse *Heloderma suspectum*. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **350**, 821–826.
- MOORE, S. and STEIN, W. H. (1963) The chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. In: *Methods in Enzymology*, Vol. VI, pp. 819–831 (COLOWICK, S. P. and KAPLAN, N. O., Eds). New York: Academic Press.
- NIKAI, T., IMAI, K., SUGIHARA, H. and TU, A. T. (1988) Isolation and characterization of Horridum toxin with arginine ester hydrolase activity from *Heloderma horridum* (beaded lizard) venom. *Archs Biochim. Biophys.* **264**, 270–280.
- PARKER, D. S., RAUFMANN, J. P., O'DONOHUE, T. L., BLEDSOE, M., YOSHIDA, H. and PISANO, J. J. (1984) Amino acid sequence of Helospectins, new members of the glucagon superfamily, found in Gila monster venom. *J. biol. Chem.* **259**, 11751–11755.
- REISFELD, R. A., LEWIS, V. J. and WILLIAMS, D. E. (1962) Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature, Lond.* **195**, 281–283.
- ROBBERECHT, P., WAELBROECK, M., DEHAYE, J. P., WINAND, J., VANDERMEERS, A., VANDERMEERS-PIRET, M. C. and CHRISTOPHE, J. (1984) Evidence of helodermin, a newly extracted peptide from Gila monster venom, is a member of the secretin/VIP/PIII family of peptides with an original pattern of biological properties. *FEBS Lett.* **166**, 277–282.

- SHILOAH, J., KLHANSKY, C., DE VRIES, A. and BERGER, A. (1975) Phospholipase B activity of a purified phospholipase A from *Vipera palaestinae*. *J. Lipid Res.* **14**, 267-278.
- SOSA, B. P., ALAGON, A. C., MARTIN, B. M. and POSSANI, L. D. (1986) Biochemical characterization of the phospholipase A, purified from the venom of the Mexican beaded lizard (*Heloderma horridum horridum* Wiegmann). *Biochemistry* **25**, 2927-2933.
- TOLKSDORF, S., McREADY, M. H., MCGULACH, D. R. and SCHWENK, E. (1949) The turbidimetric assay of hyaluronidase. *J. Lab. clin. Med.* **34**, 74-89.
- TU, A. T. (1977) Gila monster venoms. In: *Venoms: Chemistry and Molecular Biology*, pp. 531-534 (Tu, A. T., Ed.) New York: John Wiley.
- TU, A. T. and HENDON, R. R. (1983) Characterization of lizard venom hyaluronidase and evidence for its action as a spreading factor. *Comp. Biochem. Physiol.* **76B**, 377-383.
- VANDERMEERS, A., VANDERMEERS-PIRET, M. C., ROBBERECHT, P., WAELEIRCECK, M., DEHAYE, J. P. and CHRISTOPHE, J. (1984) Purification of a novel pancreatic secretory factor (PSF) and a novel peptide with VIP- and secretin-like properties (helodermin) from Gila monster venom. *FEBS Lett.* **166**, 273-276.
- VANDERMEERS, A., GOURLET, P., VANDERMEERS-PIRET, M. C., CAUVIN, A., DENEFF, P., RATHE, J., SVOBODA, M., ROBBERECHT, P. and CHRISTOPHE, J. (1987) Chemical immunological and biological properties of peptides like vaso-active-intestinal peptide and peptide-histidine isoleucimidine extracted from the venom of *Heloderma horridum horridum* and *Heloderma suspectum*. *Eur. J. Biochem.* **164**, 321-327.