

03072
25
20je.



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**EFFECTOS DE MODIFICACIONES QUIMICAS SOBRE
ACTIVIDADES ANTIGENICAS Y FARMACOLOGICAS DE LA
NOXIUSTOXINA**

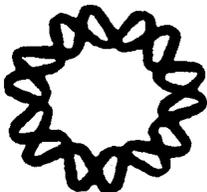
T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A :

MA. EMMA ALEJANDRA SOLACHE DIAZ



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CUERNAVACA, MORELOS

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

Trabajo realizado en el:
Laboratorio del Dr. Lourival D. Possani
Departamento de Bioquímica, Instituto de Biotecnología/UNAM
Cuernavaca, Mor.

Financiado en parte por los donativos:

Howard Huges Medical Institute N° 75191-527104
DGAPA-UNAM N° IN 205893
CONACyT N° 0018-N9105
al laboratorio del Dr. L. D. Possani

COMITE TUTORIAL:

Dr. Lourival D. Possani Postay

Dr. Alberto Darszon Israel

M. en C. Georgina Gurrola Briones

ABREVIATURAS

Arg	Arginina
BNTX	Anticuerpo monoclonal anti-NTX
BK	Canales de potasio de alta conductancia
BSA	Albúmina sérica bovina
cDNA	Acido ribonucleico complementario
CMC	Carboximetilcelulosa
Chtx	Caribdotoxina
DTT	Dithiotreitol
EDC	Etil, diaminopropil carbodiimida
EDTA	Etilendiaminoacetato disódico
ELISA	Inmunoensayo enzimático
FCS	Sucro fetal bovino
GABA	Acido gamaaminobutírico
Glu	Ac. glutámico
HAT	hipoxantina, aminopterina, timidina
His	Histidina
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
¹²⁵ I	Yodo radioactivo
Ibtx	Iberotoxina
K _d	Constante de afinidad
Ktx	Kaliotoxina
Lis	Lisina
Mgtx	Margatoxina
NMR	Resonancia Magnética Nuclear
NTX	Noxiustoxina
OPD	Ortofenilendiamina
OPI	Piruvato de sodio
PEG	Poli(etil)englicol
PTH	Fenilhidantoína
RIA	Radioinmunoensayo
SK	Canales de potasio de baja conductancia
Sytx	Sialotoxina
TEA	Tetraetilamonio
TFA	Acido trifluoroacético

INDICE

INTRODUCCION	1
I. Uso de las toxinas en el estudio de canales de potasio	2
a) Canales de potasio	2
b) Toxinas de alacrán	3
II. Modificaciones estructurales	7
III. Antigenicidad de las toxinas	9
ANTECEDENTES	10
Noxiustoxina	10
MATERIAL Y METODOS	13
I. Purificación de la toxina NTX del veneno del alacrán	13
<i>Centruroides noxius</i>	
II. Obtención de antisuero policlonal anti-NTX	13
III. Síntesis química de péptidos	14
IV. Acoplamiento de péptidos sintéticos a proteínas acarreadoras	14
V. Obtención de anticuerpos monoclonales contra péptidos sintéticos NTX C-terminal.	14
1. Protocolo de inmunización	14
2. Producción de Hibridoma:	16
a) Crecimiento de células de mieloma	
b) Aislamiento de células de bazo	
c) Fusión celular	
d) Clonación por dilución limitante	17
e) Producción de líquido ascítico	
f) Congelación de células	
VI. Titulación de los antiseros	18
1. Radioinmunoensayo (RIA)	18
2. Inmunoensayo enzimático (ELISA)	18
VII. Marcado de la toxina NTX y péptidos sintéticos con ¹²⁵ I	19

VIII. Obtención de membranas de cerebro de rata (fracción P3)	19
IX. Ensayos de unión a membranas de cerebro de rata	20
X. Ensayos de desplazamiento de la unión de ¹²⁵ I-NTX a fracción P3	20
XI. Modificaciones químicas a la toxina	20
1. Reducción y carboximetilación	21
2. Metilación	21
3. Hidrólisis con Bromuro de Cianógeno (CNBr)	21
4. Digestión con tripsina	21
5. Acetilación	21
XII. Purificación por HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Presión)	22
XIII. Análisis de aminoácidos	22
XIV. Secuenciación de aminoácidos	22
RESULTADOS Y DISCUSION	23
I. Purificación de NTX a partir del veneno del alacrán <i>C. noxius</i> .	23
II. Obtención del antisuero policlonal ant-NTX	23
III. Importancia de la estructura secundaria	26
IV. Participación del extremo carboxilo terminal	28
1. Generación de anticuerpos monoclonales contra extremo C-terminal	30
2. Hidrólisis con CNBr	30
3. Digestión con tripsina	35
V. Importancia de las cargas positivas	35
1. Acetilación con anhídrido acético	
CONCLUSIONES	44
BIBLIOGRAFIA	48

FIGURAS

	Pag.
Figura 1 Purificación de la noxiustoxina	24
Figura 2 Titulación del suero policlonal anti-NTX	25
Figura 3 Purificación de la NTX reducida y metilada	27
Figura 4 Reactividad de las clonas productoras de anticuerpos anti-NTX 21-39	29
Figura 5 Separación de los productos de hidrólisis de NTX con CNBr	31
Figura 6 Separación de los productos de digestión de NTX con tripsina	32
Figura 7 Separación de los productos de acetilación total de NTX con anhídrido acético	36
Figura 8 Curvas de desplazamiento de unión de ^{125}I -NTX a fracción P3 y reconocimiento por el suero policlonal anti-NTX de los productos de acetilación completa	37
Figura 9 Patrones de digestión triptica de NTX nativa y de tres fracciones productos de la acetilación completa de NTX	39
Figura 10 Separación de productos de acetilación parcial de NTX	41
Figura 11 Curvas de desplazamiento de la unión de ^{125}I -NTX a fracción P3 por los productos de la acetilación parcial de NTX	42
Figura 12 Reconocimiento por el policlonal anti-NTX de los productos de acetilación parcial de NTX	43

TABLAS

Tabla I	Secuencia de aminoácidos de algunas toxinas de alacrán que bloquean canales de potasio	6
Tabla II	Esquema de inmunización. Obtención del antisuero policlonal anti-NTX	15
Tabla III	Esquema de inmunización. Obtención de antisueros anti-péptidos NTX C-terminal.	15
Tabla IV	Péptidos sintéticos correspondientes a la región carboxilo terminal de NTX	28
Tabla V	Identificación de péptidos productos de digestiones con tripsina	33

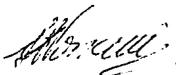
EFFECTOS DE MODIFICACIONES QUIMICAS SOBRE ACTIVIDADES ANTIGENICAS Y FARMACOLOGICAS DE LA NOXIUSTOXINA

Presenta. Ma. Emma Alejandra Solache Díaz

RESUMEN

Diversos canales iónicos selectivos a potasio se inhiben específicamente por una familia de péptidos neurotóxicos que se encuentran en venenos de alacrán. Este trabajo se basa en el estudio de la estructura-función de la noxiustoxina (NTX), una toxina perteneciente a dicha familia de neurotoxinas bloqueadoras de canales de potasio.

La NTX se obtuvo a homogeneidad, a partir del veneno del alacrán *Centruroides noxius*, y se utilizó tanto para generar un suero policlonal anti-NTX, como para realizar modificaciones químicas a dicha toxina con la idea de estudiar la participación de ciertos residuos de aminoácidos particulares así como de regiones estructurales, en la antigenicidad y en los efectos farmacológicos de esta proteína. Los resultados de tales modificaciones indican: 1) la reducción y carboximetilación, así como la reducción y metilación de los puentes disulfuro, eliminan la actividad funcional de la toxina. Esto se demostró farmacológicamente por ensayos de desplazamiento de la unión de ^{125}I -NTX a fracción P3 de cerebro de rata, y antigénicamente, en ELISA mediante reconocimiento por el suero policlonal anti-NTX. 2) El único residuo de metionina presente en la NTX, se encuentra poco accesible, o bien oculto en el interior de la toxina. 3) La digestión de NTX con tripsina permitió la obtención de un fragmento intermedio (libre de enlaces disulfuros), un hexapéptido amino terminal y un fragmento que corresponde a la toxina sin los dos péptidos mencionados anteriormente. Ninguno de ellos fué reconocido por el antisuero policlonal anti-NTX, ni desplazó la unión de NTX marcada a fracción P3 de cerebro de rata. 4) La NTX fué acetilada con anhídrido acético y los derivados fueron separados por cromatografía líquida de alta presión; se realizaron dos ensayos de modificación, en el 1° de ellos se obtuvieron 7 fracciones con varias modificaciones en las cuales se eliminó completamente la actividad farmacológica y la actividad antigénica disminuyó drásticamente, en el 2° ensayo se obtuvieron 6 fracciones parcialmente modificadas, en las cuales la modificación no indujo una pérdida significativa de la actividad farmacológica, mientras que la actividad antigénica disminuyó en relación directa con el grado de modificación que sufrió la toxina.



Vo.Bo. Dr. Lourival D. Possani Postay.

ABSTRACT

Several potassium channels are blocked with high affinity by specific neurotoxic peptides from scorpion venoms. In this work we have focused on the study of the structure-function relationship of noxiustoxin (NTX), a toxin from the venom of *Centruroides noxius* Hoffman, a Mexican scorpion.

NTX was purified to homogeneity, from the venom of the scorpion *Centruroides noxius*. We generate a polyclonal serum against NTX. We made chemical modifications to NTX to study the role of some particular residues and structural regions, in both the antigenicity and the pharmacological effects of the toxin. The results of these modifications show: 1) reduction and carboxymethylation, or reduction and methylation of the disulfide bridges, destroy the functional activity of the toxin, tested by competition with ^{125}I -NTX for binding to synaptosomes from rat brain and by recognition by the polyclonal antibody anti-NTX. 2) The only methionine residue in NTX, must be buried inside of the toxin. 3) Tryptic digestion of NTX yields a fragment (disulfide bridges free), an hexapeptide at the N-terminal region, and a fragment without those peptides, none of the fragments was recognized by the polyclonal antibody anti-NTX, neither compete with the binding of ^{125}I -NTX to synaptosomes. 4) NTX was acetylated with acetic anhydride and the modified derivatives were separated by HPLC. We did two modification assays, in the first one, we obtained 7 fractions polymodified in which the pharmacological activity was abolished completely whereas the antigenic activity was significantly affected; on the second assay we obtained 6 fractions partially modified, where the modification did not cause an important diminution of the pharmacological activity, whereas the antigenic activity decreased in relation with the level of modification of the toxin.

INTRODUCCION

El principal propósito de un veneno es el de interferir selectivamente con elementos de importancia crítica en los procesos fisiológicos esenciales. Los venenos animales ejercen una amplia diversidad de actividades biológicas, llevadas a cabo por componentes, que usualmente son proteínas. Dichos componentes en los venenos, han estado sujetos a una extensa investigación desde el inicio de éste siglo por dos razones principales: primero, sin tener en cuenta su origen, los venenos constituyen herramientas exquisitas en el estudio de sistemas fisiológicos. A mediados del siglo XIX, Claude Bernard (1857) utilizó el curare, un veneno obtenido de plantas, en la investigación de la comunicación entre nervio y músculo. El demostró que la acción paralizante del curare resultaba de un bloqueo de la acción periférica del nervio motor en músculo. En segundo término, la elucidación de los principios tóxicos presentes en el veneno puede ayudar al desarrollo de posibles vacunas para proteger al hombre en contra de picadura o mordedura de animales ponsoñosos (Menéz *et al.* 1992).

Las toxinas animales ejercen una gran diversidad de acciones, incluyendo alteraciones funcionales, ya sea del sistema nervioso central y periférico, de varios tipos de músculos o de la coagulación sanguínea. Sin embargo, cada una de estas acciones se lleva a cabo por la acción de los componentes del veneno sobre una variedad de blancos moleculares específicos, incluyendo canales iónicos, receptores y enzimas.

Respecto a las toxinas que interaccionan con canales iónicos, recientemente se ha analizado su conformación en el espacio, para tratar de elucidar si existen elementos estructurales comunes involucrados en el bloqueo de la neurotransmisión a nivel del canal, así como para identificar los motivos estructurales que imparten especificidad para los diversos canales iónicos (Bontems *et al.* 1991a y b; Park & Miller, 1992; Martins *et al.* 1990; Johnson & Sugg, 1992)

1. Uso de las toxinas en el estudio de canales de potasio

a) Canales de K⁺

Los canales de K⁺ están presentes en virtualmente todas las células eucarióticas, desde levaduras, hasta neuronas de mamíferos, y comprenden una familia de proteínas de membrana que se han clasificado de acuerdo a sus características biofísicas y farmacológicas. Estos canales modulan un gran número de eventos celulares, tales como la contracción muscular, la secreción neuroendócrina, la frecuencia y duración de potenciales de acción, la homeostasis de electrolitos y el potencial de reposo en membranas (Hille 1992). Con éste amplio rango de acción, encontramos así mismo, una gran diversidad de canales de K⁺ entre los que se encuentran los canales de K⁺ dependientes de ATP, canales de K⁺ activados por Na⁺ y los canales de K⁺ dependientes de Ca⁺⁺ cuyo mecanismo de compuerta se regula por Ca⁺⁺ citoplásmico así como por el potencial de membrana; este tipo de canales han sido clasificados de acuerdo a su conductancia en: a) canales BK de alta conductancia o Maxi K (250 pS) presentes tanto en células excitables como no excitables y se cree que juegan un papel en la modulación del acoplamiento celular estímulo-respuesta (Latorre *et al.* 1989), b) canales SK de baja conductancia (10-14 pS), sensibles a apamina, un péptido obtenido de abeja *Apis mellifera* y c) canales de conductancia intermedia (MK) que comparten algunas características farmacológicas presentes en los grupos BK y SK. Por otra parte, se encuentran también los canales de K⁺ dependientes de voltaje, tales canales existen funcionalmente como estructuras tetraméricas (Mckinnon 1991) formadas por la asociación de subunidades ya sea idénticas o disimilares (McCormack 1990; Li *et al.* 1992; Christie *et al.* 1990). Esta característica es importante para comprender la diversidad de los canales de K⁺ que se encuentran en diferentes tejidos (Wei *et al.* 1990). En base a su mecanismo de compuerta estos canales se subdividen a su vez en canales de K⁺: a) de corriente transitoria o canales tipo A, b) rectificadores tardíos, el ejemplo clásico lo constituye el canal de K⁺ dependiente de voltaje en el axón gigante de calamar, descrito por Hodgkin y Huxley en 1952 y c) de rectificación entrante o anómala.

Los avances en biología molecular han permitido adentrarse en la estructura de algunos canales de K⁺. Recientemente se han obtenido clonas individuales de cDNA que codifican para distintos canales de K⁺ dependientes de voltaje que exhiben propiedades defi-

nidas, cuando son expresados de manera heteróloga (Swanson *et al.* 1992; Pongs 1992; Timple *et al.* 1988). Mediante mutagénesis sitio dirigida se han definido regiones en esas proteínas que están involucradas en la activación y la inactivación de canales (Iverson & Rudy 1990; Busch *et al.* 1991; Oliva *et al.* 1991; Stocker *et al.* 1990), formación de poro (Yellen *et al.* 1991), o bien, que confieren sensibilidad a inhibidores peptídicos (MacKinnon & Miller 1989; MacKinnon 1991)

A pesar de estos rápidos avances en el estudio de la biología molecular de los canales, la composición de las subunidades de canales de K⁺ nativos y el papel fisiológico que juegan cada canal en particular, no es claro todavía. Hasta hace poco tiempo las drogas típicas para bloquear canales de K⁺ fueron las aminopiridinas, quinidinas y TEA (tetratilamonio), a pesar de que ellas no son específicas y tienen baja afinidad. Para resolver esos problemas, se ha intentado identificar ligandos selectivos y específicos para canales de K⁺. En la actualidad una herramienta valiosa en el estudio de los canales ha sido las toxinas obtenidas de diversas fuentes. Recientemente con la ayuda de toxinas que se unen a canales de K⁺ con alta afinidad, ha sido posible caracterizar y purificar tales canales (Rehm & Lazdunsky. 1988; Parcej & Dolly. 1989; Prestipino *et al.* 1989) .

b) Toxinas de alacrán

Los venenos de alacrán contienen una gran variedad de toxinas que actúan sobre canales de sodio o de K⁺, con una amplia gama de acciones y con especificidades marcadamente diferentes hacia diversas especies, incluyendo mamíferos y artrópodos. Las toxinas de alacrán pueden dividirse en 2 categorías estructurales con base en sus estructuras primarias, estas son: toxinas de cadena larga y toxinas de cadena corta (Possani 1984).

Toxinas de cadena larga.

Las toxinas de cadena larga contienen 60-70 residuos de aminoácidos con 4 enlaces disulfuro (Kopeyan *et al.* 1974, Rochat *et al.* 1979; Fontecilla-Camps *et al.* 1988), tales toxinas actúan sobre canales de sodio (Catterall *et al.* 1979). Todas ellas poseen secuencias homólogas y analogías en su estructura tridimensional, lo que se ha revelado por cristalografía de rayos X y estudios de resonancia magnética nuclear (Almassy *et al.* 1983; Fontecilla-Camps *et al.* 1980, 1988; Darbon *et al.* 1991) .

En 1980, Fontecilla-Camps y sus colegas reportaron la estructura tridimensional de la toxina variante 3 del veneno del alacrán *Centruroides sculpuratus* Ewing, encontrando que es una proteína globular con 3 láminas β antiparalelas y una alfa hélice, la cual se une a 2 láminas β por dos de los disulfuros. Subsecuentemente, se demostró que la toxina II de *Androctonus australis* Hector (Fontecilla-Camps. 1988) posee una arquitectura similar. También se demostró que tres de los cuatro puentes disulfuro parecen estar apareados de manera similar en todas las toxinas, mientras que el cuarto disulfuro no se conserva, sin embargo, esta diferencia no tiene efecto sustancial sobre el enrollamiento final de las toxinas.

Toxinas de cadena corta

Las toxinas de cadena corta comprenden 35-39 residuos de aminoácidos y 3 enlaces disulfuro (Possani *et al.* 1982; Johnson y Sug. 1992). Se han clasificado en toxinas que actúan selectivamente sobre insectos o mamíferos, ejerciendo su efecto sobre canales de K^+ (Dreyer. 1990). Al examinar sus estructuras primarias no revelan marcadas analogías con las toxinas de cadena larga y además, sus secuencias polipeptídicas tienen que ser algunas veces alineadas separadamente (Simard & Watt. 1990). El patrón de apareamiento de los 3 disulfuros es análogo al de los 3 disulfuros conservados de las toxinas de cadena larga (Ménez *et al.* 1992).

El efecto de éstas toxinas sobre canales de K^+ no se estudió sino hasta 1982 cuando Carbone *et al.* describieron el efecto de un péptido purificado del veneno del alacrán *Centruroides noxius* sobre el axón gigante de calamar (Carbone *et al.* 1982). Este péptido purificado y secuenciado por Possani *et al.* en 1982 llamado noxiustoxina (NTX), fué el primero en mostrar un efecto de bloqueo reversible sobre el canal de K^+ del axón gigante con una K_d de 390 nM en agua de mar.

Con el desarrollo y la relevancia que han adquirido recientemente los canales de K^+ , a el aislamiento y caracterización de nuevas toxinas de diferente origen, ha adquirido gran importancia en el estudio del bloqueo de canales de K^+ . Entre tales toxinas encontramos: la apamina, un polipéptido de 18 aminoácidos del veneno de abeja *Apis mellifera*, el cual bloquea el canal de K^+ dependiente de Ca^{++} de baja conductancia en cerebro y músculo esquelético (Huges *et al.* 1982); dendrotoxina (Dtx), una toxina del veneno de serpiente *Dendroapsis polylepis*, que actúa sobre un canal de K^+ dependiente de voltaje en neuronas CA1 de hipocampo (Dolly *et al.* 1984) y la caribdotoxina (Chtx), una toxina obtenida del veneno

del alacrán *Leiurus quinquestriatus*. La Chtx fué descrita originalmente como un bloqueador de los canales de K^+ dependientes de Ca^{++} de alta conductancia o Maxi K en músculo y células endócrinas (Miller *et al.* 1985); después se encontró que inhibía el canal de K^+ dependiente de voltaje (Kv1.3) encontrado en neuronas (Scheweitz *et al.*, 1989), linfocitos T (Sands *et al.* 1989; Leonard *et al.* 1992) y osteoclastos (Arket *et al.* 1992), en cada caso la inhibición ocurre con potencia similar en el rango nanomolar. La sialotoxina (Sytx), fué descrita como un bloqueador del canal de K^+ dependiente de Ca^{++} de baja conductancia sensible a apamina, también obtenida del veneno del alacrán *Leiurus quinquestriatus* (Castle & Strong 1986; Auguste *et al.* 1992). La Iberotoxina (Ibtx), es un potente bloqueador del canal de K^+ dependiente de Ca^{++} de alta conductancia ó Maxi K, obtenido a partir del veneno del alacrán *Buthus tamulus* (Gálvez *et al.* 1990). La margatoxina (Mgtx), una toxina obtenida del veneno del alacrán *Centruroides margaritatus*, posee una actividad selectivamente dirigida contra el canal de K^+ dependiente de voltaje Kv1.3 (García-Calvo *et al.* 1993) y kaliotoxina (ktx), obtenida del veneno del alacrán *Androctonus mauretanicus*, es una toxina que actúa sobre el canal de K^+ dependiente de Ca^{++} (BK) de neuronas (Crest *et al.* 1992). Todas ellas guardan características comunes en cuanto a su carga básica y su estabilización por puentes disulfuro intramoleculares, además presentan un alto grado de homología entre sí.

Se ha analizado la conformación en el espacio de múltiples toxinas, para tratar de elucidar si existen elementos estructurales comunes involucrados en su efecto electrofisiológico, así como para identificar los motivos estructurales que imparten la especificidad hacia los diversos canales iónicos. En éste contexto se ha estudiado ampliamente la caribdotoxina (Chtx), que comprende 37 residuos de aminoácidos y 3 enlaces disulfuro (Miller *et al.* 1985). Esta es una proteína altamente básica, con una carga neta de +5 a +6 a pH neutro (Gimenez-Gallego *et al.* 1988). La molécula de Chtx se conforma de un pequeño motivo estructural que consta de una triple lámina β , una alfa hélice y un fragmento extendido, que se mantienen unidos por 3 puentes disulfuro (Bontems *et al.* 1991 a y b). Se ha propuesto que ésta lámina β , la hélice, el fragmento extendido y los 3 disulfuros definen un motivo estructural común con otras toxinas de cadena corta, a pesar de ser aisladas de venenos de diferentes alacranes y de sus diferencias en tamaño, secuencia y actividades biológicas (Arseniev *et al.* 1984; Martins *et al.* 1990)

Un aspecto interesante de la estructura de la Chtx es la distribución espacial de sus diferentes cadenas laterales cargadas. La toxina contiene 9 residuos cargados positivamente (N terminal, 4Lis, 3 Arg, 1 His) y 2 residuos cargados negativamente (1 Glu y el C-terminal), organizados de manera que presentan 2 superficies cargadas, una de ellas localizada en la alfa hélice que presenta una carga negativa y dos positivas. La segunda, localizada en la lámina β , está compuesta por el C-terminal y cinco cargas positivas. Comparando estas características con la secuencia primaria de otras toxinas de la misma familia tales como NTX, Ibtx, Sytx, Mgtx y Ktx; se ha encontrado gran similitud entre ellas, por ejemplo una región hidrofóbica altamente conservada (Tabla I). En general la Chtx y la Ibtx guardan un 68% de similitud y conservan características semejantes, la mayoría de los residuos de la región hidrofóbica son conservados, la noxiustoxina posee una homología del 65% con la Chtx y 79% con la Mgtx. Finalmente la Sytx es muy diferente de las otras toxinas, teniendo sólo una valina y dos lisinas en común con Chtx.

NTX	TI INVKCTSPKQCSKPCKELYGSSAGAKCMNGKCKCYNN
Mgtx	TI INVKCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPH
Chtx	EFTNVSC TTSKECWSVCQRLHNTSRG-KCMNKKRCYS -
Ibtx	EFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVDRG-KCMGK KRCYQ -
Ktx	GVEINVKCSGSPQCLKPKKD-AGMRFG-KCMNRKCHCTP-

Tabla 1. Secuencia de aminoácidos de algunas toxinas de alacrán que bloquean canales de K^+ .

Si se compara el arreglo de las cadenas laterales positivas en las toxinas podemos ver que entre la Chtx y la Ibtx, existe una ligera modificación en la superficie cargada de la hélice alfa, mientras la superficie de la lámina β parece conservarse. En la noxiustoxina ambas superficies son perturbadas: la hélice presenta 3 cargas positivas (lisina 11, lisina 15 y lisina 18) y una carga negativa (ac. glutámico 19), mientras que la arginina 25 y la 34 son sustituidos por glicina y lisina respectivamente. Finalmente la Sytx posee dos cargas positivas en la hélice, pero presenta una superficie β plegada muy diferente a las otras toxinas. (Bontems *et al.* 1992).

II. Modificaciones estructurales

Se sabe que las propiedades farmacológicas como las antigénicas de una proteína frecuentemente involucran residuos de aminoácidos expuestos, el conocimiento de la localización de tales residuos ha permitido tener algunas conclusiones estructurales respecto a qué residuos participan directamente en la interacción proteína-receptor, y cuales son responsables de la antigenicidad de la proteína.

Una estrategia para tratar de identificar el papel de un residuo dado en la estructura o función de una proteína, consiste en cambiar las propiedades de sus cadenas laterales y del análisis de los efectos funcionales de dicho cambio (Fersht. 1987; Offord. 1987; Kaiser & Lawrence. 1984). Por ejemplo, se ha reportado que la reducción y carboximetilación o metilación de las neurotoxinas, elimina su estructura secundaria y su actividad fisiológica sobre el canal (Miroshninikov *et al.* 1978). Además, se sabe que la formación de puentes disulfuro restringe conformacionalmente y estabiliza estructuras espaciales que son esenciales para la actividad biológica. Utilizando esta estrategia, Rochat *et al.* 1976, modificaron químicamente la toxina II del alacrán *Androctonus australis* Hector, observando que: 1) al reducir y metilar un puente disulfuro de la toxina II, ésta pierde su actividad tóxica. 2) la modificación de 5 carboxilos de los 7 que contiene la toxina II, suprime la actividad tóxica. 3) la acetilación de residuos de lisina y tirosina en la toxina II, conduce a la pérdida de la actividad tóxica y antigénica. Por lo que ellos concluyen que la pérdida de toxicidad es debida principalmente a la modificación de los residuos de lisina (Rochat & Sampieri. 1976).

Otros trabajos con modificaciones químicas se han llevado a cabo con la toxina gamma de la cobra *Naja nigricollis*, con el fin de valorar el papel de los grupos amino en la función de la toxina, acetilando todos los residuos accesibles (Gatineau et al. 1990).

La acetilación de los grupos amino es uno de los métodos más comunes empleados en la modificación química de proteínas. Existen varias razones que apoyan su uso. Primero los grupos amino siendo cargados, tienden a estar localizados en la superficie de la estructura tridimensional de las proteínas en contacto con el medio ambiente y consecuentemente fácilmente accesible al ataque químico. Segundo, existe por lo menos un agente acetilante disponible que cumplirá los requisitos de alta especificidad y rápida reactividad bajo ciertas condiciones. Sin embargo, la caracterización analítica de la acetilación presenta ciertas dificultades y en consecuencia hay problemas en la interpretación de la relación entre acetilación y cambios ocurridos en la actividad biológica (Riordan & Vallee, 1967).

Además de las modificaciones realizadas directamente en el sitio antigénico o en la región tóxica, cuyos efectos se manifiestan claramente, otras sustituciones en residuos no involucrados en dichas regiones pueden causar efectos considerables, al generar cambios conformacionales o inducir alteraciones en las propiedades químicas de la proteína (Atassi, 1984).

Recientemente, con el avance en las técnicas de biología molecular se han podido clonar y expresar los genes que codifican para algunas toxinas y así por medio de mutaciones puntuales modificar específicamente un residuo. Esto se ha hecho recientemente con caribdotoxina (Park & Miller, 1992), donde se estudiaron los residuos cargados que están directamente involucrados en el contacto toxina-canal, usando Chtx recombinante. Este trabajo mostró que el cambio de algunos residuos cargados por glutamina, tiene gran influencia en la unión al canal de K^+ dependiente de Ca^{++} en músculo de rata, como es el caso de arginina 25, lisina 27 y arginina 34, mientras que los residuos cargados en la hélice alfa de la toxina no tienen efecto directo en su actividad. La conclusión de éste trabajo fue, que los grupos cargados positivamente en Chtx favorecen la interacción con el canal en dos formas: indirectamente por influencia electrostática a través del espacio y por contacto íntimo y directo con el canal por un lado de la molécula.

III. Antigenicidad de las toxinas

Recientemente, se ha acumulado información acerca de las regiones antigénicas de un gran número de proteínas de diferentes orígenes mediante el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales (Benjamin *et al.* 1984). Esta metodología ha demostrado ser de gran ayuda con toxinas de serpientes (Boulain *et al.* 1984; Grognet *et al.*, 1984) y alacranes (El Ayeb *et al.* 1984). También se han usado péptidos sintéticos y modificaciones químicas de residuos específicos de toxinas nativas de alacranes que reconocen canales de sodio (Bahraoui *et al.* 1987; El Ayeb *et al.* 1986; Kharrat *et al.* 1989). A partir de los resultados obtenidos en éstos trabajos, los autores han sugerido que la mayor parte de la toxina es antigénica, excepto las regiones altamente conservadas, especialmente en el extremo amino terminal y que el sitio tóxico no se traslapa con las regiones antigénicas (El Ayeb *et al.* 1986)

ANTECEDENTES

Noxiustoxina

El descubrimiento de la NTX como bloqueador del canal de K^+ del axón gigante del calamar (Carbone *et al.* 1982), fué motivo de gran interés en nuestro laboratorio, por lo que a partir de éste hecho se puso énfasis en la caracterización de dicha toxina, la cual mostró inducir la liberación de neurotransmisores en sinaptosomas de cerebro de ratón por bloqueo de la permeabilidad a K^+ , efecto que depende de la presencia de Ca^{++} extracelular (Sitges *et al.*, 1986) y al año siguiente, se reportó la caracterización fisiológica completa de la acción de NTX sobre el axón de calamar (Carbone *et al.* 1987).

Posteriormente se demostró que inhibía el canal de K^+ dependiente de Ca^{++} en músculo esquelético aunque con muy baja afinidad, K_d 450 nM (Valdivia *et al.* 1988), el canal de K^+ dependiente de Ca^{++} de baja conductancia de células endoteliales (Vaca *et al.* 1993), así como en canal de K^+ dependiente de voltaje en linfocitos T, K_d 0.2 nM (Moczydlowski *et al.* 1988; Sands *et al.* 1989).

Recientemente se han probado las propiedades de unión de la NTX a sinaptosomas de cerebro de rata, mostrándose que ésta se une a una sola clase de sitios con una K_d aparente de 300 nM (Valdivia *et al.* 1992). Apamina, un péptido neurotóxico que reconoce al canal de K^+ dependiente de Ca^{++} de baja conductancia de cerebro, no desplaza la unión de NTX marcada a membranas sinaptosomales, ésto indica que la NTX y la apamina no están reconociendo el mismo sitio en tales membranas. Por otra parte, la NTX es un potente inhibidor de la unión de ^{125}I -Chtx a sinaptosomas de cerebro (Vázquez *et al.* 1990), lo cual sugiere que el sitio de alta afinidad para NTX en sinaptosomas, es el canal de K^+ dependiente de voltaje (sensible a la Chtx).

Usando péptidos sintéticos, correspondientes a fragmentos traslapados de 9 a 39 residuos de aminoácidos de la noxiustoxina, se observó que ratones inyectados con el

nonapéptido sintético correspondiente al amino terminal NTX₁₋₉, presentaba síntomas de intoxicación similares a los observados con NTX nativa, mientras que el decapeptido NTX₃₀₋₃₉, no fue tóxico aún en grandes dosis. La NTX nativa a dosis aproximadas de 40 µg /20 gr de peso, causa en el ratón hiperexcitabilidad, lagrimeo, salivación convulsiones y muerte por parálisis respiratoria, la mayoría de estos síntomas se observaron en ratones inyectados con 200 µg del péptido sintético NTX₁₋₉ (Gurrola *et al.* 1989). Por otra parte, dicho péptido, indujo la liberación de GABA radioactivo en sinaptosomas de cerebro de ratón, de la misma manera que lo hace la NTX nativa, pero requiriendo una concentración más alta.

Posteriormente, siguiendo en el contexto de los péptidos sintéticos se observó que un hexapéptido formado por las secuencias invertidas de un tripéptido amino terminal TII y uno carboxilo terminal YNN, desplazaba el pegado de la NTX a un anticuerpo monoclonal anti-NTX (BNTX-16), con una cinética similar a la producida por la NTX desplazándose a sí misma, lo que supone que dicho hexapéptido es un epítipo conformacional o se encuentra formando parte importante de un determinante antigénico conformacional de la noxiustoxina. (Tesis de maestría Luis Vaca). Esto hace pensar que las regiones amino y carboxilo terminales, podrían encontrarse muy cerca en la conformación final que toma la toxina y por lo cual son reconocidos juntos por el anticuerpo y que probablemente el extremo carboxilo terminal estaría interactuando conjuntamente con el amino terminal en el reconocimiento de su receptor, favoreciendo así la afinidad o la estabilidad de tal unión, aunque sin tomar parte importante en la toxicidad.

En un trabajo realizado con caribdotoxina, también con péptidos sintéticos, se encontró que el dominio amino terminal de la Chtx imparte alta afinidad en la interacción con el canal de K⁺ dependiente de Ca⁺⁺ de alta conductancia (Maxi K) de músculo liso, pero no ejerce ningún efecto sobre la unión con el canal de K⁺ dependiente de voltaje (Kv1.3), mientras que el dominio carboxilo terminal de la Chtx define la interacción con este canal Kv1.3 presente en membranas de cerebro (Giangiacomo *et al.*, 1993).

Por otra parte, recientemente se ha definido que tanto la estructura secundaria de las toxinas, como las cargas presentes son de gran importancia en la interacción con los canales iónicos. Estudios recientes (Bontems *et al.* 1991 a; Johnson & Sugg 1992) indican que la mayoría de los residuos de aminoácidos cargados positivamente son conservados en varias toxinas bloqueadoras de canales de K⁺, y se localizan en una cara de la superficie de la proteína e interaccionan con el canal por atracciones electrostáticas, además se sabe que los

grupos amino deben tener un papel funcional, pero es necesario establecer si alguno de ellos es particularmente importante.

Estudios realizados por Anderson *et al* (1988) indican que la Chtx interactúa cerca de la boca de los canales de K^+ . Esta interacción involucra tanto cargas negativas sobre el canal (canal de K^+ tipo A Shaker) como cargas positivas en la región C-terminal de la toxina (Sugg *et al.*, 1990) además el trabajo de Park & Miller (1992) muestra que al mutar ciertos residuos cargados por glutamina, se provoca una alteración importante sobre todo en el caso de la lisina 27 (la cual se conserva en casi todas las toxinas que bloquean canales de K^+), mientras los residuos cargados de la hélice alfa de la toxina no tienen efecto directo en su actividad, por lo que concluyen que la Chtx interactúa con su receptor (canal KCa de conductancia grande) por la superficie de la lámina β .

Por las observaciones mencionadas anteriormente nos damos cuenta de la importancia de estudiar ciertas regiones y residuos de aminoácidos en la noxiustoxina que pudieran ser relevantes en su antigenicidad o en la unión a su receptor. Por lo que pensamos en abordar el estudio de la relación entre la estructura y la función de la NTX, fundamentalmente desde tres aspectos: la importancia de la estructura secundaria, la participación del extremo C-terminal y la participación de los residuos cargados positivamente.

La estrategia para elucidar el papel del carboxilo terminal fué obtener un ligando que se uniera a éste dominio y evaluar si al estar bloqueada dicha región, la toxina conservaba su capacidad de unión específica a membranas de cerebro de rata. Otra estrategia fué obtener fragmentos nativos productos de digestión de la toxina que nos permitieran saber si el C-terminal tiene algún papel funcional. Para determinar la participación de los residuos cargados positivamente, se pensó en modificar químicamente tales residuos y probar su capacidad de unión a membranas de cerebro, así como su reconocimiento por anticuerpos policlonales y monoclonales anti-NTX, para saber si la modificación afectó tanto farmacológicamente como antigénicamente.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos de modificaciones químicas y enzimática, así como de ligandos (anticuerpos), en el funcionamiento de la NTX.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Valorar la importancia de la estructura secundaria de la NTX, mediante su reducción y carboximetilación.
2. Evaluar si al estar bloqueado el extremo a C-terminal por un anticuerpo monoclonal, la toxina conserva su capacidad de unión específica a membranas de cerebro de rata y su antigenicidad.
3. Obtener fragmentos nativos productos de digestión de la NTX con tripsina, que nos permitan saber si el C-terminal tiene algún papel funcional.
4. Determinar que fragmentos productos de la digestión con tripsina, son importantes tanto en la unión a membranas de cerebro, como si siguen siendo reconocidas por un suero policlonal anti-NTX.
5. Valorar la participación de los residuos con carga positiva, modificando químicamente tales residuos, e identificar cuales tienen alguna importancia tanto en la unión a membranas de cerebro de rata, como en la antigenicidad de la molécula.
6. Obtener un suero policlonal dirigido contra NTX nativa, con el objeto de valorar la antigenicidad de la toxina nativa y modificada.

MATERIALES Y METODOS

I. Purificación de la toxina NTX del veneno del alacrán Centruroides noxius

El veneno obtenido por estimulación eléctrica del telson del alacrán se resuspendió en agua y centrifugó a 10000 x g durante 15 minutos para eliminar restos celulares y material mucoso. El veneno soluble se liofilizó y se guardó a -20 °C hasta su uso.

Para la purificación se usó el esquema originalmente descrito por Possani *et al.* (1981). El veneno soluble liofilizado fué disuelto en amortiguador de acetato de amonio 20 mM, pH 4.7 y fraccionado en base a diferencias en peso molecular. Se hicieron 4 aplicaciones independientes de veneno soluble de aproximadamente 500 mg cada una y fueron filtradas a través de una columna con Sephadex G-50 (2.9 x 170 cm). Se obtuvieron 4 fracciones, de las cuales la fracción II contenía cerca del 63% del material aplicado a la columna y fué la única fracción tóxica a mamíferos. Posteriormente, esta fracción se separó en una columna de intercambio iónico de Carboximetilcelulosa CM-32 (0.9 x 30 cm) en amortiguador de acetato de amonio 20 mM a pH 4.7, se eluyó con un gradiente lineal de NaCl (0 a 0.5 M) y se obtuvieron 14 fracciones. De estas fracciones se recuperó la número 11 y se recromatografió empleando la misma columna de CM-32, equilibrada con un amortiguador de fosfato de sodio 50 mM a pH 6.0 y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0.38 M. Se obtuvieron 7 fracciones, de las cuales la fracción 5 fué tóxica. Esta fracción se sometió a un último paso de purificación por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), para verificar la homogeneidad de la Noxiustoxina.

II. Obtención del suero policlonal anti NTX nativa.

Con la finalidad de obtener un suero policlonal contra NTX nativa, se inmunizaron 2 ratones hembras (7 semanas) de la cepa Balb/c con toxina nativa completa, con intervalos de 2 semanas entre cada inmunización. Se inocularon 20 µg de toxina en cada ocasión mediante el esquema de inmunización de la *Tabla II*. Después de la 3a inmunización los ratones se sangraron, se separó el suero y se probó la presencia de anticuerpos anti-NTX, mediante ensayos de ELISA.

III. Síntesis química de péptidos

Se sintetizaron 2 péptidos del extremo carboxilo terminal de la NTX, siguiendo el método descrito por Merrifield (Merrifield, 1963). Para la síntesis química de péptidos en fase sólida se utilizó un sintetizador automático marca Milligen/Biosearch modelo 9600. Todos los N-ter-butiloxicarbonil aminoácidos (boc-aminoácidos) y los Boc-aminoácidos-resinas (poliestireno derivatizado con grupos químicos reactivos aminados o halogenados) fueron adquiridos de Península Corporation (California, USA).

IV. Acoplamiento de péptidos sintéticos a proteínas acarreadoras

Los péptidos sintéticos se acoplaron a las proteínas acarreadoras BSA (albúmina sérica bovina) y tiroglobulina por medio de carbodiimida, mediante una modificación del método de Goodfried (Goodfried *et al.* 1964). Una cantidad de 5 mg de péptido C-terminal a los que se han incorporado 30,000 cpm del mismo ¹²⁵I-péptido se hicieron reaccionar con 10 mg del acarreador (tiroglobulina o BSA), se disolvieron en 500 µl de agua y posteriormente se añadieron 10 mg del agente acoplante EDC (etil, diaminopropilcarbodiimida) disuelto en 250 µl de agua. La mezcla se dejó reaccionar 12 hs a temperatura ambiente, después de esto se determinó la cantidad de radioactividad incorporada, posteriormente se dializó durante 24 hs contra agua y se determinó la radioactividad remanente al término de la diálisis.

V. Obtención de anticuerpos monoclonales contra péptidos sintéticos NTX C-terminal.

Se empleó una modificación del método de Galfre y Milstein (1981), teniendo como antígeno los péptidos carboxilo terminal NTX 21-39 y NTX 30-39.

1. Protocolo de Inmunización

Para la obtención de anticuerpos anti-péptidos sintéticos carboxilo terminal de NTX, se siguió un esquema de inmunización en el cual se inmunizaron 3 ratones Balb/c y 3 ratones Balb/k (hembras de 7 semanas), con cada uno de los antígenos: NTX 21-39 y NTX 30-39. Se inocularon 200 µg o 100 µg de cada antígeno según el esquema de la *Tabla III*. Después de la 3a. inoculación los ratones se sangraron y se obtuvo el suero. Posteriormente éste se probó en ELISA.

Tabla II. Esquema de inmunización. Para la obtención de suero policlonal anti-NTX

<i>Immunización</i>	<i>Antígeno</i>	<i>Adyuvante</i>	<i>Vía</i>
1*	20 µg	ACF	Sc
2*	20 µg	AIF	Sc
3*	20 µg	AIF	Sc
4*	20 µg	AIF	Sc
5*	20 µg	AIF	Sc
*			
6°	20µg	AIF	Id

Se inmunizaron 2 ratones Balb/c (hembras de 7 semanas), con la NTX nativa, con intervalos de 2 semanas entre cada inmunización. * Se dió 1 mes de descanso. Sc, Id, se refieren a inoculación subcutánea e intradérmica respectivamente y ACF ó AIF significa adyuvante completo o incompleto de Freund respectivamente. 15 días después de cada inmunización se sangraron a los ratones por la cola y el suero obtenido se probó en ELISA.

Tabla III. Esquema de inmunización para la obtención de anticuerpos monoclonales anti NTX C-terminal.

<i>Immunización</i>	<i>Antígeno</i>	<i>Adyuvante</i>	<i>Vía</i>
1*	200 µg	ACF	Sc
2*	100 µg	AIF	Sc
3*	100 µg	AIF	Sc-Ip
4*	100 µg	AIF	Sc-Ip
*			
5* (día -7)	100 µg	Sol'n salina	Ip
6* (día -4)	200 µg	Sol'n salina	Ip
7* (día -3)	200 µg	Sol'n salina	Ip-Iv

Se inmunizaron 3 ratones Balb/c y 3 ratones Balb/k (hembras de 7 semanas), con cada uno de los antígenos, Péptidos NTX carboxilo terminales NTX21-39 y NTX30-39. Sc, Id e Ip se refieren a inoculación subcutánea, intradérmica e intraperitoneal respectivamente, mientras que ACF ó AIF significa adyuvante completo o incompleto de Freund respectivamente. 15 días después de cada inmunización se sangraron a los ratones por la cola y el suero obtenido se probó en ELISA.

* Se dió 1 mes de descanso, después del cual se inmunizaron los ratones tres veces más, los días 7, 4 y 3 previos a la fusión.

2. Producción de hibridomas

a) Crecimiento de células de mieloma:

Se usó la línea celular P3X63Ag8 (Köhler y Milstein, 1975), a una densidad celular de 14×10^5 cel/ml. Estas células se mantuvieron en cultivo por lo menos una semana antes de realizar la fusión con las células de bazo. Para esto se descongelaron y se crecieron en un medio de cultivo que contiene DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium), 1% P/S (penicilina-estreptomicina), 1% L-glu (L-glutamina) y 10% de FCS (suero fetal bovino), en condiciones de atmósfera húmeda en presencia de 5% de CO₂ y a 37 °C. El día de la fusión las células se centrifugaron a 500 x g / 3 min y se lavaron dos veces con medio de cultivo adicionado con 1% P/S y 1% L-glu a 37 °C.

b) Aislamiento de células de bazo

Para la obtención de células de bazo se sacrificó el ratón inmunizado con la mejor respuesta humoral, se disectó el bazo y se colocó en una caja de Petri que contenía 10 ml de DMEM, 1% P/S, 1% L-glu. Se obtuvieron las células por perfusión. Se colocaron en un tubo cónico y se mantuvieron en reposo por 5 min a 4 °C para sedimentar los agregados celulares, se obtuvo el sobrenadante de la suspensión y se centrifugó a 500 x g a 4 °C durante 10 min. El botón celular se lavó 3 veces con el mismo medio y se determinó la viabilidad celular mediante exclusión con azul de tripano (Sigma).

c) Fusión celular

Se siguió el protocolo de Galfre y Milstein (1981). En un tubo cónico mezclamos las células de bazo y las células de mieloma en una proporción 1:4 (mieloma-bazo). Se centrifugó a 400 x g a temperatura ambiente durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y a la pastilla celular se le agregaron 1.5 ml de PEG-50 (polietilenglicol) durante 30 segundos con agitación suave. Se dejó en reposo 90 seg con agitación ocasional. Se diluyó con 7.5 ml con medio (DMEM, 1% p/s, 1% L-glu, 37 °C) durante 3 minutos y posteriormente con 20 ml del mismo medio durante 60 seg. Se dejó en reposo 5 a 10 minutos y se centrifugó a 1500 x g durante 5 minutos. Posteriormente se lavó con 20 ml de medio y se centrifugó una vez más a 1500 x g. Las células fusionadas (aprox. 1.5×10^6) se resuspendieron en 50 ml de medio completo que contenía HAT [Hipoxantina, aminopterina, timidina], 20% FCS (suero bovino fetal), 1% L-glu, 1% p/s, 1% aminoácidos no esenciales, 1% OPI (piruvato de sodio). Por

último se distribuyeron en 4 placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (Costar, Cambridge, MA. USA) a una concentración de aprox. 10^5 células por pozo (200 μ l) y se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Se alimentó el cultivo cambiando el medio los días 5, 7, 10 y 11 después de la fusión. Cuando ya se apreciaba un crecimiento adecuado, se tomaron los sobrenadantes y se les practicó un ensayo de ELISA sensibilizado con péptidos solos o acoplados a BSA, para determinar la producción de anticuerpos anti-péptido carboxilo terminal.

Los pozos que dieron una respuesta positiva en ELISA, se continuaron creciendo, primero en placas de 96 pozos, después en placas de 24 pozos y se clonaron.

d) Clonación por dilución limitante

Se ajustó la concentración celular a 5 cel /ml, de manera que al poner 200 μ l en cada pozo hubiera 1 célula. La clonación se realizó en placas de cultivo de 96 pozos y fondo plano (Costar, Cambridge, MA. USA). Los cultivos con crecimiento se probaron en ELISA contra los péptidos tanto libres como acoplados y los que resultaron positivos se expandieron en placas de 24 pozos. Posteriormente se cultivaron en botellas hasta obtener una concentración celular adecuada y se indujo la producción de líquido ascítico en ratones.

e) Producción de líquido ascítico

Las clonas productoras del anticuerpo deseado se mantuvieron en cultivo hasta un crecimiento de aproximadamente 4×10^5 cel/ml. Se centrifugaron, se lavaron con medio y se resuspendieron en el mismo medio a una concentración de 10^7 cel/ml. Posteriormente, se inocularon intraperitonealmente 200 μ l de ésta suspensión a ratones histocompatibles los cuales habían sido previamente inyectados con pristan (1 semana antes). Cuando los ratones presentaron tumor ascítico, se cosechó el líquido ascítico por punción en el abdomen, recolectándolo en un tubo y dejándolo 2hs. a temperatura ambiente para que se formara el coagulo de fibrina, se centrifugó a $830 \times g/10$ min y se mantuvo a -20°C.

f) Congelación de células

Las células con crecimiento óptimo se centrifugaron y se resuspendieron en 1 ml de DMEM completo con 40% de FCS y 10% de dimetilsulfóxido a 4 °C. Se colocaron en criotubos y se mantuvieron a -70 °C durante 24 hs, al término de las cuales se transfirieron a un tanque con nitrógeno líquido. Las células en éstas condiciones se mantienen por tiempo indefinido.

VI. Titulación de los Antisueros.

La presencia de anticuerpos anti-péptido ó anti-NTX en el suero, así como la titulación de los mismos, se realizó por inmunoensayo enzimático y por radioinmunoensayo.

a) Radioinmunoensayo (RIA)

Los sueros se probaron en diluciones de 1:100 hasta 1:100,000. Todas las diluciones se hicieron en amortiguador salino de fosfatos pH 7.8, con 1% de albúmina sérica bovina (PBS-BSA).

Se mezclaron 100 µl de cada dilución de suero problema con 100 µl de ^{125}I -NTX (20,000 cpm) y suero normal de ratón a una dilución final 1:500. Se incubó a 4 °C durante 24 hs. Posteriormente se añadieron 50 µl de inmunoglobulina de conejo anti-ratón (segundo anticuerpo) y se dejó reaccionar a 4 C durante 24 hs. La mezcla de reacción se diluyó con 2 ml de PBS-BSA y se centrifugó a 3000 rpm durante 30 min. Se descartó el sobrenadante y se contó la radioactividad presente en el botón celular. Las cpm presentes en el botón celular son proporcionales a la cantidad de ^{125}I -NTX reconocida por los sueros probados. Se graficaron cuentas por minuto contra logaritmo de la dilución del suero.

b) Inmunoensayo enzimático (ELISA)

Se emplearon placas de vinil de 96 pozos (Costar 2596), que se recubrieron con el antígeno, ya fuera NTX ó péptidos sintéticos, a una concentración de 3µg/ml (100 µl), en amortiguador de bicarbonato de sodio 20 mM, pH 9.2. Se incubó toda la noche a temperatura ambiente.

Los sitios libres en la placa se saturaron con 100 µl de gelatina al 0.5% en amortiguador salino de fosfatos 15 mM (PBS), pH 7.4. Se incubó 4hs a 37 °C. Se probaron diluciones de los sueros de 1:100 a 1:100,000. Las diluciones se hicieron en PBS-BSA y se colocaron 100 µl de cada dilución en la placa, se dejó reaccionar 4 hs a 37 °C y se lavó la placa 5 veces con PBS-0.1% tween 20. Se añadió a cada pozo 100 µl del segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa (Ig de conejo anti-ratón), dejándolo reaccionar por 2hs a 37 °C. La placa se lavó 5 veces con PBS-0.1% tween 20.

Las placas se revelaron con una solución de ortofenilendiamina 0.4 mg/ml con 1.2% de peróxido de hidrógeno, en amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 5. Se dejó desarrollar el color de 5 a 10 minutos y se detuvo la reacción adicionando 50 μ l de HCl 6 N. Se leyó absorbancia a 490 nm y se graficó absorbancia contra logaritmo de la dilución.

VII. Marcado de la toxina NTX y péptidos sintéticos con ¹²⁵I

Para efectuar el marcado de peptidos y proteínas se siguió el método de la lactoperoxidasa (Morrison y Bayse., 1970). La reacción se llevó a cabo en amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.4. A 2 μ gr (0.5 nmoles) de NTX se agregaron 1mCi de Na¹²⁵I, 5 μ l de lactoperoxidasa (1 unidad/ml) y 3 μ l de H₂O₂ 5 mM. Después de 5 minutos a temperatura ambiente se añadió otra alícuota de lactoperoxidasa y H₂O₂, y una más a los 10 minutos. Por último la proteína marcada se separó en una columna de Sephadex G-15 equilibrada con amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.4 y 0.1 M de NaCl.

En experimentos independientes, se marcaron también la toxina NTX metilada y los péptidos sintéticos NTX carboxilo terminal en condiciones experimentales similares.

VIII. Obtención de membranas de cerebro de rata. (fracción P3)

La fracción P3 fué preparada usando el método de Catteral (1979). Se anesteciaron dos ratas Wistar (250-300 gr de peso) y se decapitaron, los cerebros fueron removidos y colocados en una solución de sacarosa 32 mM en tris-HCl 5 mM pH 7.4 frío, con inhibidores de proteasas (Fluoruro-fenil-metano-sulfónico 0.1 mM, iodoacetamida 1 mM, fenantrolina 0.1 mM y pepstatina A 1 mM.). Los cerebros se homogenizaron con golpes en el homogenizador de vidrio con pistilo de teflón, en 30-40 ml de la solución de sacarosa. Posteriormente la suspensión se sedimentó a 1,000 x g en un rotor GSA ó JS13 por 10 minutos. El sobrenadante se guardó y el precipitado se resuspendió en 40 ml de la misma solución, se homogenizó y se centrifugó una vez más a 1000 x g durante 10 minutos. Se juntaron los dos sobrenadantes y se centrifugaron a 17000 x g en un rotor GSA o JS13 durante 1 hora. El precipitado se resuspendió en 20 ml de la solución de sacarosa. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry.

Se hicieron alícuotas y se mantuvieron a -70 °C hasta su uso.

IX. Ensayos de unión a membranas de cerebro de rata

Todos los experimentos de unión con NTX se llevaron a cabo en tubos de poliestireno de 12 x 75 mm, ya que la toxina se adsorbe a superficies de vidrio. El medio de incubación (500 µl) estuvo constituido por NaCl 50 mM en Tris-HCl 20 mM pH 7.4 y 0.1% albúmina sérica bovina. Los ensayos se hicieron por duplicado, empleando una concentración de ^{125}I -NTX de 100 pM y 3.6 µg/ml de fracción sinaptosomal. La unión inespecífica se determinó en presencia de 10 nM de toxina nativa y la incubación se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 45 minutos. La reacción de unión se detuvo por la adición de 4 ml de una solución de lavado fría que contenía NaCl 100 mM en Tris-Hepes 20 mM pH 7.4, seguido por una filtración rápida a través de filtros GF/B (Whatman de fibra de vidrio) que fueron preadsorbidos en polietilenoimina al 0.5% y posteriormente se hicieron dos lavados con el mismo amortiguador. Como controles se puso la toxina marcada sin fracción P3 para descartar el pegado de la toxina a filtros y fracción P3 con toxina marcada en el que se determinó unión total.

X. Ensayos de desplazamiento de la unión de ^{125}I -NTX a fracción P3

Los ensayos de desplazamiento de la unión de toxina nativa marcada a las membranas de cerebro de rata, se hicieron con las toxinas que habían sufrido alguna modificación química o fragmentos productos de digestión, para determinar si éstos conservaban la capacidad de competir con la toxina nativa en la unión a su receptor. Estos ensayos se realizaron siguiendo el mismo protocolo que los ensayos de unión pero en lugar de desplazar con toxina nativa fría, se compete con la toxina modificada o los productos de digestión, a una concentración final de 10 nM.

XI. Modificaciones Químicas a la toxina

1. Reducción y Carboximetilación

La proteína se ajustó a una concentración de 1mg/ml en una solución que contiene cloruro de guanidinio 6 M y EDTA 1mg/ml en Tris-HCl 200 mM, pH 8.6. Se añadió ditioneitol (DTT) en un exceso 10 veces molar con respecto a los puentes disulfuro presentes en la

proteína. Posteriormente se burbujeó nitrógeno gaseoso a través de la solución y se incubó por 2 hs a 55 °C. La carboximetilación se llevó a cabo con ac. iodoacético en un exceso 10 veces molar con respecto al DTT adicionado e incubando por 30 minutos a temperatura ambiente protegiendo de la luz.

2. Metilación

Previamente se realizó una reducción siguiendo el protocolo anterior y se llevó a cabo la metilación usando iodometano en un exceso 10 veces molar con respecto a la cantidad de DTT que se usó.

3. Hidrólisis con Bromuro de Cianógeno (CNBr)

La proteína previamente desnaturalizada (ya sea con urea 8 M ó cloruro de guanidinio 8 M), se disolvió en ac. fórmico al 70% para que quedara aproximadamente a 5 mg/ml y se agregó CNBr en un exceso molar de 250 veces sobre las metioninas presentes en la proteína. Se incubó durante 16 hs a temperatura ambiente y protegido de la luz y se purificó por HPLC.

4. Digestión con tripsina

Para la digestión de NTX nativa con tripsina se siguió el protocolo descrito por Sugg y col., 1990. La toxina nativa (250 µg) se disolvió en 250 µl de acetato de amonio 0.1 M pH 7.8 y se añadieron 25 µl de una solución de tripsina (1mg/ml en HCL 0.1 N) que correspondía al 1% en peso de la proteína. Se incubó a 37 °C durante 120 hs añadiendo alícuotas de tripsina cada 24 hs.

5. Acetilación

La toxina se disolvió en un amortiguador de Tris-HCl 200 mM a pH 8 a una concentración de 1 mg/ml. Se agregó el anhídrido acético en un exceso molar 1: 40 ó 1: 5 con respecto a la toxina (según se deseara una acetilación total o parcial, respectivamente). El pH se mantuvo

por la adición de NaOH 0.2 N. Se incubó durante 30min a 37 °C y posteriormente se purificó por HPLC en una columna C4.

XII. Purificación por HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Presión)

Para la purificación tanto de péptidos como toxinas, se empleó un cromatógrafo Beckman y las muestras se pasaron a través de columnas VYDAC C4 y C18, según la muestra a purificar. Para eluir se empleó un gradiente lineal de 0 a 60% de acetonitrilo durante 60 minutos y se detectó a una longitud de onda de 230 nm.

XIII. Análisis de aminoácidos

Cada muestra (1 nmol) se trató con fenol al 0.05% para proteger los grupos lábiles de los aminoácidos que se degradan fácilmente, se hidrolizó con HCl 6 N a 110 °C durante 20 hs y se colocó en un analizador automático System 6300E High Performance Analyzer Beckman, USA.

XIV. Secuenciación de aminoácidos

Se empleó un secuenciador automático ProSequencer modelo 6400/6600 MilliGen/Biosearch, USA, cuyo funcionamiento se basa en la degradación de Edman (Edman & Begg, 1967). Tal degradación es un proceso cíclico, en el cual los residuos de aminoácidos son liberados uno a uno del extremo amino terminal del péptido y son identificados como derivados de feniltiohidantoina. Existen tres pasos en cada ciclo: acoplamiento del fenil-isotiocianato (Pitc) con el residuo amino terminal, liberación del residuo amino-terminal por ciclización en medio ácido y conversión del derivado tiazolinona formado, hacia una forma más estable, el derivado tiohidantoina, el cual puede ser identificado cromatográficamente.

RESULTADOS Y DISCUSION

I. Purificación de NTX a partir del veneno del alacrán *C. noxius*

Para la purificación de la NTX, se usó el protocolo descrito por Possani *et al.* (1981). Primeramente, el veneno soluble liofilizado se pasó a través de una columna de Sephadex G-50, para separar los componentes de acuerdo a su peso molecular. Se obtuvieron 4 fracciones, con una recuperación total del 84%, de ellas la fracción II contenía cerca del 70% del material aplicado (se sabe que es la única fracción tóxica a mamíferos). Esta se pasó a través de una columna de intercambio iónico de carboximetilcelulosa y se eluyó con NaCl. En esta separación la recuperación fué del 81% y se obtuvieron 14 fracciones de las cuales se recuperó la fracción 11, que correspondió al 7%. Esta fracción se recromatografió empleando la misma columna pero equilibrada a pH 6.0, se obtuvieron 7 fracciones de las que se recuperó la número 5 correspondiente a la noxiustoxina. La recuperación de la columna CM-celulosa pH 6 fué del 50% en donde la fracción II-11.5 correspondió al 7.5% del material aplicado en esta columna. Los pasos de esta purificación se muestran en la figura 1. Esta última fracción II- 11.5, se sometió a una purificación por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en una columna C18, con el objeto de verificar la homogeneidad de la NTX, en ésta la recuperación fué del 50%. Por último, se hizo reconocimiento por anticuerpos monoclonales anti-NTX en ELISA y secuencia para comprobar que la muestra obtenida correspondía a NTX pura (datos no mostrados).

II. Obtención de suero policlonal anti-NTX

Con el objeto de obtener una herramienta que nos permitiera identificar a *grosso modo* si las modificaciones realizadas a la toxina tenían algún efecto sobre la antigenicidad, así como si los péptidos generados por digestiones conservaban la capacidad antigénica de la toxina completa, se pensó en generar un suero policlonal anti-NTX, para lo cual se inmunizaron 2 ratones Balb/c hembras con la toxina nativa (según el esquema de la tabla III) y después de la tercera inmunización se obtuvieron los sueros para probar la presencia de anticuerpos anti NTX. Esto se hizo mediante ensayos de ELISA y RIA. Por ELISA se obtuvo un título de anticuerpos de 1:10,000, mientras que por RIA se obtiene en título de 1:20,000, como puede verse en la figura 2.

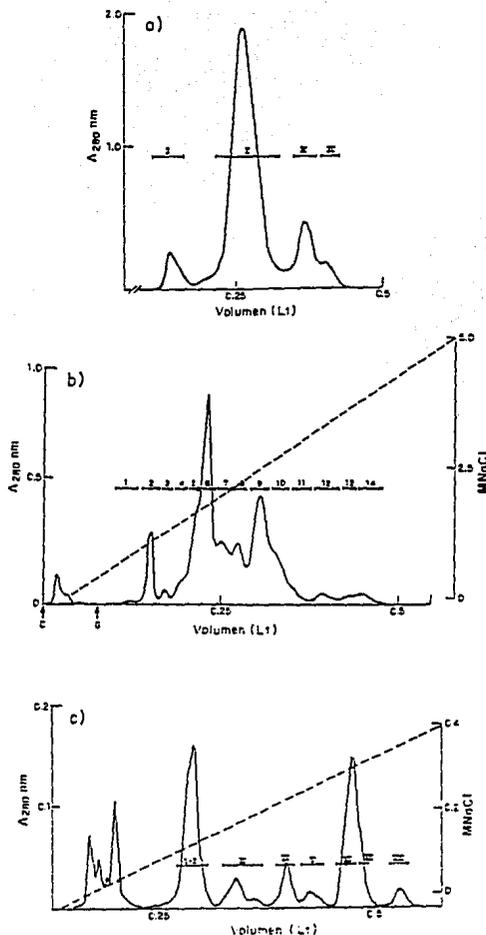
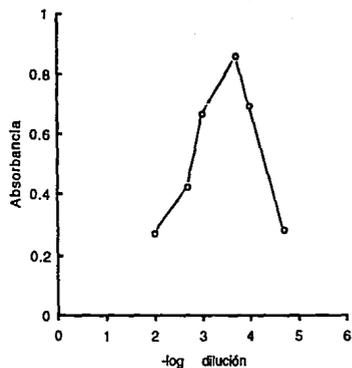


Figura 1. Purificación de la noxiustoxina.

a) El veneno soluble se aplicó a una columna de Sephadex G-50 (2.9x170 cm) equilibrada con amortiguador de acetato de amonio 20 mM, pH 4.7, corrida a un flujo de 25 ml/hr. Se colectaron fracciones de 2.5 ml por tubo. Se obtuvieron 4 fracciones que se colectaron como indican las barras horizontales. La recuperación de la columna fué del 84% en donde la fracción II corresponde al 70%. b) La fracción II se aplicó en una columna de CM-celulosa (0.9x30 cm) en amortiguador de acetato de amonio 20 mM, pH 4.7, a un flujo de 30 ml/hr. Se eluyó con un gradiente salino de 0 a 0.5 M de NaCl en el mismo amortiguador. En esta columna la recuperación fué del 81%. Se obtuvieron 14 fracciones (barras horizontales), de las cuales, la fracción II-11 corresponde al 7%. c) La fracción 11 se aplicó a una columna de CM-celulosa, equilibrada con un amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 6, a un flujo de 30 ml/hr. Se eluyó con un gradiente lineal de NaCl (0-0.38 M) y se colectaron 7 fracciones. La recuperación de la columna fué del 50%, la NTX corresponde al 7.5% del material aplicado en dicha columna.

a)



b)

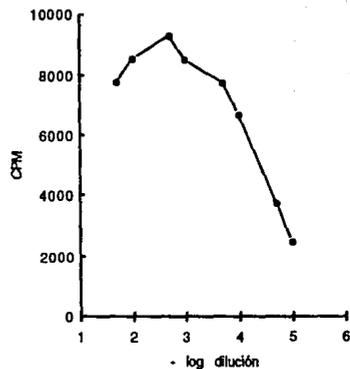


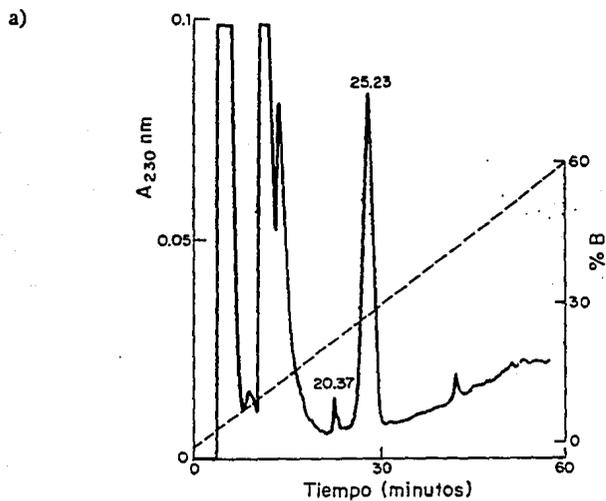
Figura 2. Titulación de suero policlonal anti-NTX

El suero policlonal se tituló por medio de ensayos de a) ELISA en el cual, se probaron diluciones seriadas del suero anti-NTX contra NTX nativa a 3 $\mu\text{g/ml}$. La unión de los anticuerpos se reveló usando un anticuerpo de conejo anti-ratón conjugado a peroxidasa, b) RIA, donde se probaron diluciones seriadas del suero anti-NTX con ^{125}I -NTX y se precipitaron con anticuerpo de conejo anti-ratón, la especificidad se determinó por la cantidad de radioactividad presente en el precipitado. Los puntos de ambas gráficas son el promedio de ensayos por duplicado.

III. Importancia de la estructura secundaria

Para evaluar la importancia de la estructura secundaria en la toxina, se llevó a cabo la reducción y carboximetilación de la noxiustoxina en presencia de cloruro de guanidinio, DTT y ácido iodoacético, siguiendo la metodología descrita previamente por Possani *et al.* (1981). Los productos de reacción se separaron en una columna de Biogel P2 y posteriormente se purificaron por HPLC fase reversa en una columna C4 en donde se obtuvieron 2 fracciones, que probablemente corresponden a la toxina parcial y completamente reducida o bien dos formas parcialmente reducidas, en las cuales sólo las cisteínas libres se carboximetilaron. Tales fracciones no desplazaron la unión de ^{125}I -NTX a sinaptosomas de cerebro de rata ni tampoco fueron reconocidas por el suero policlonal anti-NTX. Esta pérdida en la función y en la antigenicidad podría deberse al hecho de que al introducir cargas negativas mediante la carboximetilación, se estarían afectando las atracciones electrostáticas que existen entre la toxina y su receptor, por lo que se pensó en reducir y metilar la toxina de manera que sólo se bloquearan las cisteínas pero sin alterar la carga neta de la toxina. Así, se redujo y metiló la toxina con yodometano en un exceso 10 veces molar con respecto al DTT añadido (20 veces exceso molar con respecto a las cisteínas presentes en la proteína). Se purificó por HPLC y se obtuvieron dos fracciones, una de ellas al parecer correspondió a la NTX sin reducir ni metilar ya que su tiempo de retención, así como el comportamiento en el reconocimiento por el policlonal y en desplazamiento en fracción P3 es el mismo que el de la NTX nativa. La otra fracción parece ser la NTX metilada, que al igual que la toxina carboximetilada no desplazó el pegado de la NTX marcada, ni tampoco fue reconocida por el policlonal anti NTX. **Figura 3.**

Se pensó que probablemente la toxina metilada había perdido afinidad por el canal, y por lo tanto se requeriría una cantidad muy grande de la toxina metilada para poder desplazar a la toxina nativa marcada que estaba unida a la fracción P3, pero probablemente, si ensayáramos el pegado directo de la toxina metilada marcada se lograría ver el pegado. Entonces la toxina metilada se marcó con ^{125}I , que tuvo una actividad específica de 63 Ci/mmol, con ella se ensayó la unión directa en fracción P3, sin embargo no logramos observar tal unión, lo que indica que la toxina metilada perdió completamente la afinidad por su receptor presente en la fracción P3.



b)

# Fracción metilación NTX	Reconocimiento anti-NTX	Desplazamiento NTX-I ¹²⁵	comentarios
(1) 20.37	positivo	positivo	NTX nativa
(2) 25.23	negativo	negativo	NTX metilada

Figura 3. a) Purificación de NTX reducida y metilada. Se redujeron 10 µg de toxina nativa con DTT en exceso 20 veces molar con respecto a las cisteínas presentes en la proteína, la reacción se realizó en presencia de cloruro de guanidinio 8 M y en ambiente reductor, la metilación se llevó a cabo con yodometano en un exceso 10 veces molar con respecto al DTT. Se pasó por HPLC en una columna C4 y se eluyó con un gradiente de 0-60% de acetonitrilo (Las fracciones que salen inicialmente corresponden a los productos de reacción). b) Capacidad de desplazamiento de ¹²⁵I-NTX en sinaptosomas y reconocimiento por el suero policlonal anti-NTX en ELISA. Los componentes que eluyen antes del tiempo 20.88 son productos de reacción (cloruro de guanidinio, DTT, yodometano).

IV. Participación del extremo carboxilo terminal

Para elucidar el papel que el extremo carboxilo terminal juega en la función de la toxina podían seguirse varias estrategias, una de las cuales era la obtención de productos de digestiones químicas o enzimáticas que correspondieran a fragmentos C-terminal o bien toxina nativa sin dicho fragmento; otra posibilidad era la obtención de un ligando específico hacia la región C-terminal que permitiera unir dicha región y evaluar la función de la toxina con esa parte de la molécula bloqueada. Se consideró que tales ligandos podían ser anticuerpos monoclonales.

1. Generación de anticuerpos monoclonales contra el extremo C-terminal

Se trabajó en la generación de anticuerpos monoclonales contra dos péptidos sintéticos correspondientes a la región C-terminal, cuyas secuencias abarcaron los residuos 21 a 39 y 30 a 39 (Tabla IV).

NTX nativa	TIINVKCTSPKQCSKPCKELYGSSAGAKCMNGKCKCYNN
NTX 21-39	_____
NTX 30-39	_____

Tabla IV. Péptidos sintéticos correspondientes a la región carboxilo terminal de la noxiustoxina (NTX)

Estos péptidos se sintetizaron químicamente en un sintetizador de péptidos automático Milligen Biosearch 9600. Los péptidos se purificaron y se acoplaron por medio de carbodiimida (Goodfriend *et al*, 1964) a un acarreador (tiroglobulina o BSA).

Con los péptidos acoplados a tiroglobulina se inmunizaron lotes de 4 ratones Balb/c hembras de 8 semanas. El esquema de inmunización consistió en 3 inoculaciones de 50 μ g de péptido-acarreador por vía subcutánea, a intervalos de 2 semanas. Después de la segunda y tercera inmunización se evaluó la producción de anticuerpos anti-péptido en el suero de los animales inmunizados mediante ensayos de ELISA contra cada péptido, en este caso acoplado a BSA (conjugado heterólogo). Cuando se obtuvo un título de anticuerpos suficientemente alto, se llevó a cabo la fusión de las células de bazo de los ratones inmunizados con células de mieloma de la línea P3X63Ag8. Los hibridomas obtenidos (30% de las células fusionadas), se seleccionaron por su capacidad de crecimiento en medio HAT (Hipoxantina-aminopterina-timidina) y se determinó mediante ELISA su producción de anticuerpos anti-péptidos NTX C-terminal. Posteriormente, los hibridomas que reconocieron a los péptidos C-terminal se clonaron mediante la técnica de dilución limitante y así se obtuvieron 5 clonas que al parecer eran específicas contra los péptidos NTX 21-39 y NTX 30-39 acoplados a BSA, pero que al probar su reactividad cruzada contra antígenos como BSA-carbodiimida o toxina II.9.2.2, dieron reacción positiva (Figura 4), definiéndose que dichos anticuerpos no eran específicos contra un antígeno de NTX, sino que estaban reconociendo epítopos distribuidos en varios antígenos diferentes, es decir, se trata de anticuerpos monoclonales que reconocen epítopos promiscuos.

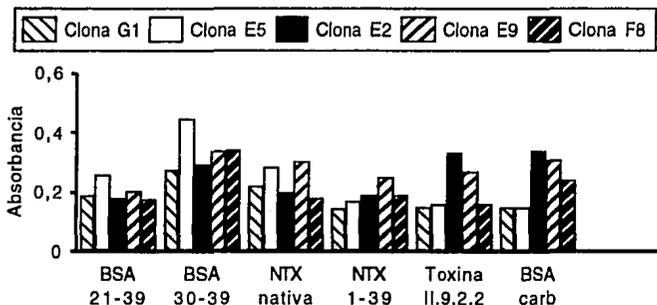


Figura 4. Reactividad de las clonas productoras de anticuerpos anti NTX 21-39.

El reconocimiento se llevó a cabo mediante un ELISA, se sensibilizó una placa con cada uno de los antígenos a una concentración de 3 μ g/ml y se hicieron reaccionar con los sobrenadantes de las clonas obtenidas. Los datos graficados son el promedio de dos ensayos.

2. Hidrólisis con CNBr

Debido a que los anticuerpos antes mencionados no fueron específicos, decidimos explorar otra opción para estudiar la posible relevancia del extremo C-terminal, que consistió en la obtención de péptidos nativos productos de digestión de la toxina. Primero se efectuó la hidrólisis con CNBr el cual rompe en residuos de metionina en condiciones ácidas. La toxina desnaturalizada con cloruro de guanidinio 6 M o urea 8 M, se hidrolizó con CNBr en un exceso 250 veces molar con respecto a los residuos de metionina en presencia de ácido fórmico, se incubó 16 horas a temperatura ambiente. Para saber si se había hidrolizado la toxina, una alícuota de esa fracción se redujo y carboximetiló como control. Este producto se pasó por HPLC(Figura 5), En el cromatograma se puede observar que no se separaron dos fracciones, como se esperaría debido a que la toxina sólo tiene una metionina, sino que se obtuvo sólo una fracción en el mismo tiempo de retención de la toxina nativa. Esto indicó que la toxina no logró hidrolizarse. En experimentos posteriores (3 experimentos) se obtuvieron resultados idénticos aún cuando se usaron concentraciones de CNBr hasta 500 veces molar. Sin embargo, empleando las mismas condiciones de hidrólisis se ensayó la digestión de mioglobina, la cual contiene 2 metioninas, y se obtuvo una digestión completa de esta proteína. Estos resultados nos hacen pensar que la NTX, es una proteína que se encuentra estructurada en forma muy compacta y que el residuo de metionina no está accesible, por lo que no pudo ser atacado por el CNBr.

3. Digestión con tripsina

Posteriormente, como una alternativa en la obtención de péptidos nativos, se efectuó una digestión con tripsina, la cual cataliza la hidrólisis de enlaces peptídicos de lisina y arginina, excepto cuando el siguiente residuo es prolina. Debido a que la noxiustoxina posee 7 lisinas pero una de ellas está junto a una prolina, tendríamos 6 sitios susceptibles de corte. Se llevó a cabo la digestión de 2 muestras de NTX con tripsina, debido a que en la digestión sólo se logra digerir un 20% del total de toxina y los productos de digestión resultantes de un sólo experimento no eran suficientes para el análisis completo de cada uno de dichos productos.

a) NTX

1 10 15 20 25 30 35 39
TIINVKCTSPKQCKPKCKELYGSSAGAKCM/NGKCKCYNN

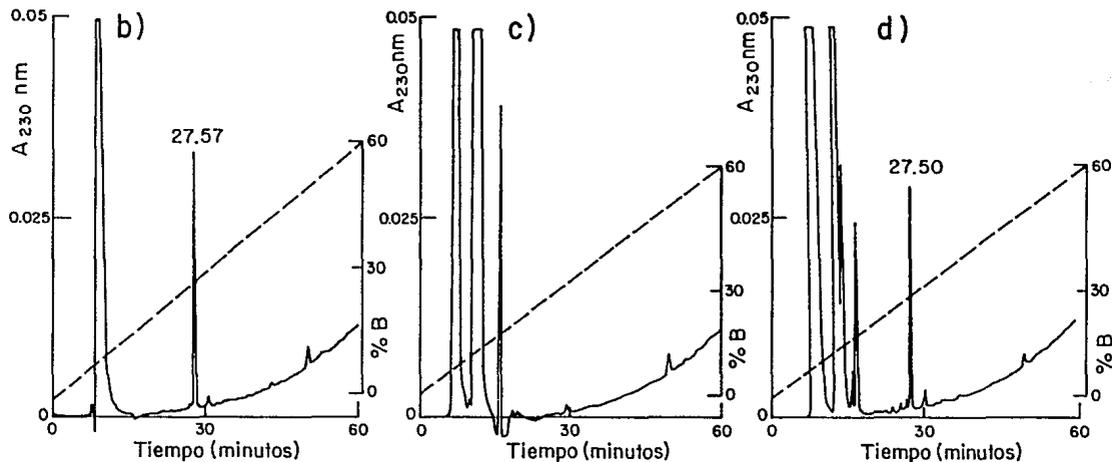


Figura 5. Separación de fragmentos productos de hidrólisis de NTX con CNBr.

La separación se llevó a cabo por HPLC en una columna C4, se eluyó con un gradiente de 0 - 60% de acetonitrilo durante 60 min. a) en la secuencia de aminoácidos de la NTX se señala con una diagonal donde se lleva a cabo la ruptura por CNBr. b) 10 µg de NTX en presencia de urea como control de la proteína sin hidrolizar, c) control de los productos de reacción (urea, CNBr, ac. iodoacético, DTT y octanol), d) Hidrólisis con CNBr en presencia de urea. de 10 µg de NTX reducida y carboximetilada.

a) NTX

5 10 15 20 25 30 35 39
 TIINVK/CTSPK/QCSKPCK/ELYGSSAGAK/CMNGK/CK/CYNN

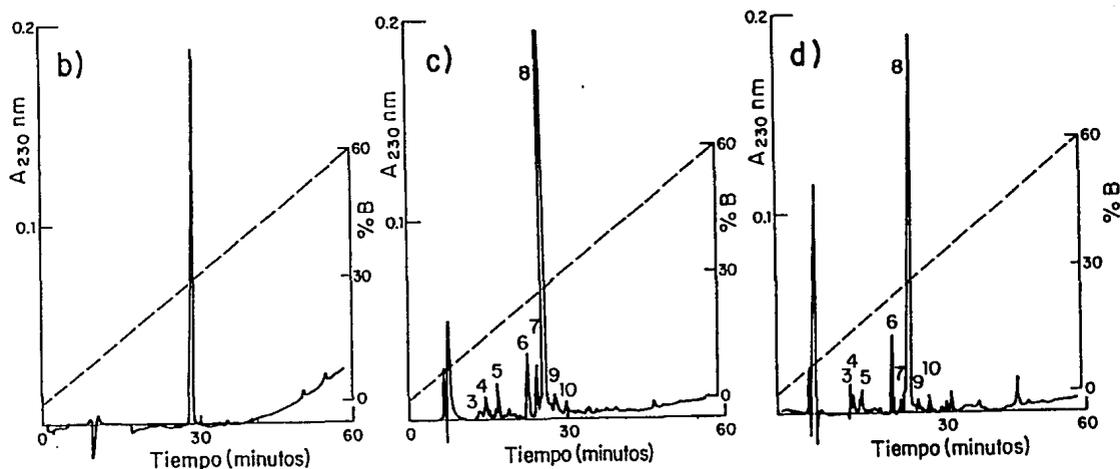


Figura 6. Separación de fragmentos productos de la digestión de NTX con tripsina.

Se efectuó la digestión triplicada de dos muestras de NTX, en las mismas condiciones de reacción, 1% en peso de tripsina en presencia de acetato de amonio pH 7.8, se incubó por 120 hs a 37 °C. Los productos se separaron por HPLC fase reversa en una columna C4, eluyendo con un gradiente de 0-60% de acetonitrilo durante 60 minutos (líneas punteadas). a) Secuencia de aminoácidos de la NTX donde se muestran los 6 posibles sitios de corte de la tripsina (líneas diagonales). b) Control de proteína NTX sin digerir, en presencia de acetato de amonio. c) Fragmentos productos de la 2a. digestión de NTX con tripsina (270 µg de NTX), a los cuales se les realizó análisis de aminoácidos. d) Fragmentos productos de la primera digestión de NTX con tripsina (300 µg NTX), con los cuales se efectuaron: reconocimiento por el suero policlonal anti-NTX y ensayos de desplazamiento de la unión de NTX marcada a sinaptosomas. También se realizó la secuencia de la fracción 6 cuyo tiempo de retención fué de 23.92 min.

La digestión se efectuó con 1% en peso de tripsina con respecto a la proteína, en presencia de acetato de amonio pH 7.8, se incubó a 37 °C durante 120 hs, añadiendo alícuotas de tripsina cada 24 hs. Las condiciones empleadas en estos experimentos fueron más drásticas que las empleadas para otras toxinas, y se decidieron en base a experimentos piloto. Al término de la incubación los fragmentos de digestión se separaron por HPLC (Figura 6) y los patrones de digestión obtenidos en ambas muestras fueron muy similares, por lo que se asumió que las fracciones obtenidas en la primera digestión eran los mismos que los de la segunda.

Con los péptidos obtenidos en la primera digestión se probó el desplazamiento de la unión de toxina marcada a sinaptosomas y el reconocimiento por el suero policlonal anti-NTX y con los péptidos obtenidos en la segunda digestión se hizo análisis de aminoácidos y secuencia en algunos (Tabla V).

1a. Tripsina # Fracción	2a. Tripsina # Fracción	Análisis de aminoácidos (basado en 2a. Trip)	Reconocimiento Suero anti-NTX (1a. Trip)	Desplazamiento NTX-1 ²⁵ (1a. Trip)
(3) 15.87	(3) 14.59	No determinado	negativo	negativo
(4) 16.35	(4) 15.87	7__18-- -29__39	negativo	negativo
(5) 18.08	(5) 18.25	No determinado	negativo	negativo
(6) 23.92	(6) 24.06	ELYGSSAGAK	negativo	negativo
(7) 25.24	(7) 25.80	No determinado	negativo	negativo
(8) 27.12	(8) 26.48	NTX completa	positivo	positivo
(9) 28.96	(9) 27.12	TIINVK (N terminal)	negativo	negativo
(10) 31.09	(10) 31.32	análisis a.a negativo	negativo	negativo

Tabla V. Identificación de los péptidos correspondientes a las digestiones con tripsina por análisis de aminoácidos, reconocimiento por Ac. policlonal anti-NTX en ELISA y capacidad de desplazamiento de la ¹²⁵I-NTX por tales fracciones. En la fracción num. 4 la línea punteada indica los aminoácidos que faltan.

Los resultados mostrados en la Tabla V indican que la fracción número 6 corresponde al fragmento intermedio ELYGSSAGAK (identificado por secuencia) el cual se libera al ser hidrolizadas las lisinas 18 y 28, debido a que no existen enlaces disulfuro que eviten que esta fracción se separe. Este péptido al ser probado en ensayos de unión, no logra desplazar el pegado de la ¹²⁵I-NTX a sinaptosomas, ni tampoco es reconocido por el suero policlonal anti NTX en ELISA. La fracción número 8 es la toxina nativa que no logró ser digerida y

desplaza el 100% el pegado de la toxina marcada y es perfectamente reconocida por el policlonal. La fracción 9, se identificó por secuencia como el amino terminal de la toxina, formado por los aminoácidos TIINVK, tal fragmento queda libre al ser hidrolizada la lisina de la posición 6, en ensayos de unión esta fracción no desplaza la unión de ^{125}I -NTX a sinaptosomas, ni es reconocida por el suero policlonal anti-NTX. Por último la fracción 4, se identificó por análisis de aminoácidos como la toxina completa sin el fragmento intermedio (fracc. 6), ni el fragmento amino terminal (fracc. 9), lo que sugiere que se permitió la hidrólisis de la lisina 6 y las lisinas 18 y 28. En experimentos preliminares esta fracción no fué reconocida por el suero policlonal anti-NTX ni tampoco desplazó la unión de ^{125}I -NTX a sinaptosomas.

De esta forma con los experimentos de digestión tróptica se obtuvo la siguiente información:

1. La NTX es extremadamente resistente a la digestión enzimática (con 120 hs sólo el 20% es hidrolizada).
2. El péptido intermedio que va del residuo 18 al 28, no desplaza a la ^{125}I -NTX unida a fracción P3, ni es reconocido por el suero policlonal anti-NTX, sin embargo ésto no descarta la posibilidad de que dentro de la proteína completa dicho fragmento intermedio esté jugando algún papel ya sea en la afinidad o en la estabilización de la unión.
3. De la misma forma, el péptido N-terminal de posiciones 1-6 no parece intervenir en estas condiciones experimentales, en el pegado de la ^{125}I -NTX y en el reconocimiento por sueros. Pero aunque este fragmento fuese importante en la unión de NTX a su receptor, como ha sido demostrado previamente (Gurrola 19??) probablemente tiene tan baja afinidad que se requeriría una gran cantidad del péptido para desplazar a la NTX nativa. Sin embargo en otros ensayos realizados sobre canal de K^+ dependiente de Ca^{++} de baja conductancia de membranas de aorta de vaca, empleando Patch clamp (Vaca et al, 1989), dicho péptido si es funcional.
4. Con la fracción num. 4 no pudo realizarse una caracterización más amplia debido a que la cantidad que obtuvimos fué demasiado pequeña, pero de forma preliminar pudimos observar que el hecho de que la toxina sin amino ni fragmento intermedio, no sea reconocida por el suero anti-NTX, puede deberse a que el fragmento intermedio parece ser importante estabilizador de la estructura de la toxina; mientras que, el no observar desplaza-

miento del pegado de ^{125}I -NTX a fracción P3, probablemente se relaciona más con la falta de la región amino terminal en la toxina.

V. Importancia de las cargas positivas

Se ha comprobado en diversos casos que es difícil obtener una acetilación completa de todos los grupos epsilon amino de las proteínas. Por ejemplo, se ha reportado que la acetilación completa del péptido S de la ribonucleasa requirió un exceso 300 veces molar de anhídrido acético (Vithayathil & Richards, 1960). Cuando la acetilación se llevó a cabo con un exceso 50 veces molar, se formaron péptidos mono, di y tri acetilados, los cuales pudieron separarse por electroforesis. Sin embargo, para la mayoría de las proteínas el 60 a 90% de los grupos amino libres se acetilan con anhídrido acético. Los grupos no susceptibles a modificación pueden presumiblemente estar ocultos de alguna manera en el interior de la estructura tridimensional de la proteína.

Para la valoración de los residuos positivos en la unión al canal y en la antigenicidad, realizamos modificaciones químicas de la NTX con anhídrido acético.

1. Acetilación de lisinas con anhídrido acético

La noxiustoxina tiene 8 residuos que son susceptibles de acetilación (7 lisinas y el amino terminal). Para iniciar se intentó llevar a cabo una acetilación en la que obtuviéramos derivados polimodificados que nos permitieran saber si al modificar ya sea todas o la mayoría de las cargas se perdía o no la actividad de la toxina. Se realizó la acetilación con un exceso 40 veces molar de anhídrido acético con respecto a la NTX, se dejó reaccionar durante 30 minutos a 37 °C y posteriormente se separó por HPLC. Se obtuvieron 7 fracciones, las cuales tienen un tiempo de retención mayor que la toxina nativa (Figura 7), lo que nos indica que son más hidrofóbicas, y además concuerda con lo esperado, ya que al acetilar las lisinas se aumenta la hidrofobicidad de la molécula.

Las fracciones obtenidas se probaron en ensayos de unión, donde mostraron haber perdido completamente la actividad de desplazar a la toxina marcada, así mismo se probaron en ELISA y en todas ellas el reconocimiento por el suero policlonal anti-NTX se redujo un 90%. (Figura 8.).

a) NTX

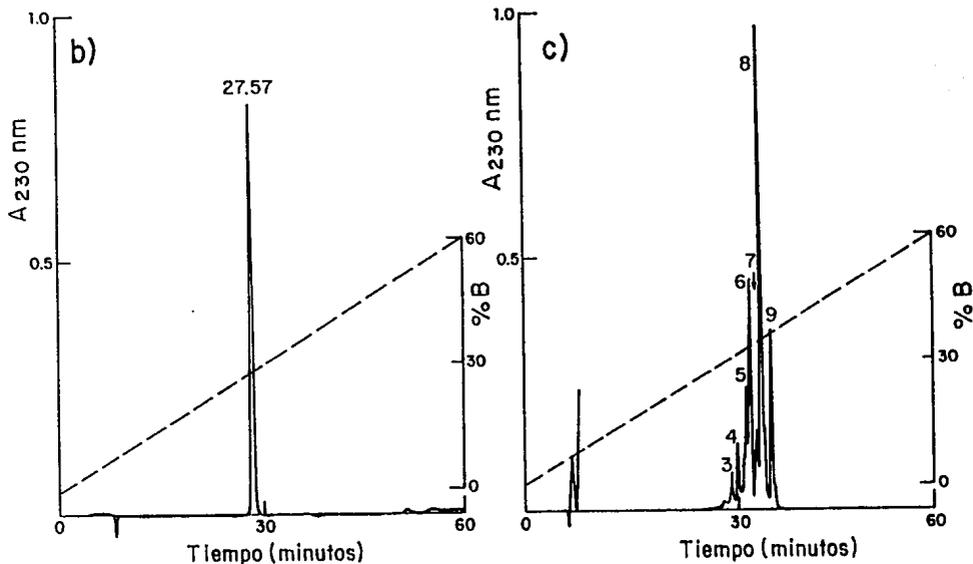
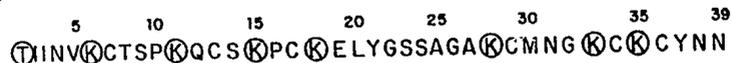
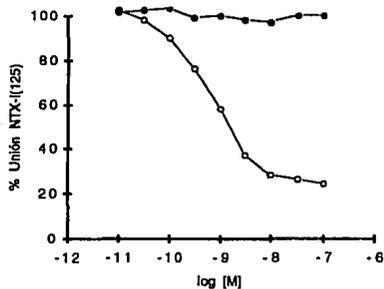


Figura 7. Separación de los fragmentos productos de acetilación total de la NTX con anhídrido acético.

Se llevó a cabo la acetilación de los grupos amino libres de la NTX con anhídrido acético en un exceso 1:40 veces molar con respecto a la toxina. a) Secuencia de la NTX en donde los sitios susceptibles de acetilación están encerrados en un círculo. Las muestras se corrieron en HPLC fase reversa en una columna C4, con un gradiente de elución de 0-60% de acetonitrilo durante 60 min. b) Control de proteína sin modificar, 125 µg de NTX en Tris-HCl 20 mM y 2 µl de NaOH 0.2 N. c) Productos de la modificación química de 500 µg de NTX con anhídrido acético.

a)



b)

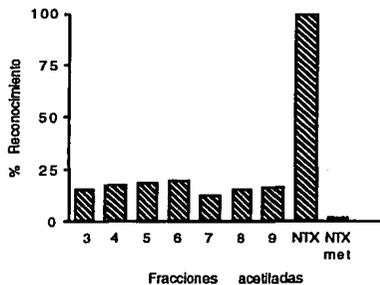


Figura 8. a) Curvas de desplazamiento de la unión de NTX 125 a fracción sinaptosomal de cerebro de rata de las fracciones de acetilación completa de NTX, (●) corresponden a las curvas de las fracciones 3,4,5,6,7,8,9, (○) corresponden a la curva de NTX nativa desplazándose a sí misma. b) reconocimiento de las fracciones productos de acetilación completa de NTX a una concentración de 3 μ g/ml, por el policonal anti-NTX en ELISA.

Tales resultados comprueban que las modificaciones efectuadas en la toxina eliminan completamente su capacidad de unión al canal, mientras que el hecho de que haya disminuido el reconocimiento por el policlonal quiere decir que las cargas también afectan la antigenicidad; probablemente el reconocimiento que existe se debe a que los anticuerpos en el suero están dirigidos no sólo contra epítopos conformacionales, si no también contra epítopos secuenciales que resultan afectados con la modificación.

Con el objeto de identificar los residuos que habrían sufrido modificación en cada una de las fracciones, se elaboraron mapas trípticos. Mediante la digestión con tripsina de la toxina nativa reducida y carboximetilada, fué posible obtener un patrón de digestión tríptica con el cual comparar las digestiones de las fracciones modificadas, también reducidas y carboximetiladas, de esta manera, ya que la tripsina, no sería capaz de romper en las lisinas que hubieran sufrido modificación, el patrón de digestión de la toxina modificada en uno o varios residuos sería diferente del obtenido con la toxina sin modificar.

Se hizo la digestión con NTX nativa, la cual había sido previamente reducida, carboximetilada y pasada por Biogel P2 para eliminar los productos de reacción. La digestión se llevó a cabo con tripsina (1% en peso con respecto a la proteína) en acetato de amonio pH 8.0, se incubó a 37 °C durante 4 horas, se purificó por HPLC y se obtuvieron 7 componentes importantes, que se tomaron como patrón de digestión. Posteriormente se realizó la digestión de las fracciones acetiladas 4, 8 y 9 (de las cuales existía suficiente material). Estas fracciones se redujeron, carboximetilaron y digirieron con tripsina en las mismas condiciones que se emplearon en la toxina nativa (Figura 9). En estos casos se esperaba que las lisinas que no hubieran sido modificadas pudieran ser atacadas por la tripsina y puesto que las muestras están reducidas y carboximetiladas, los fragmentos productos de la digestión podrían separarse y aparecer como diferentes componentes cromatográficos.

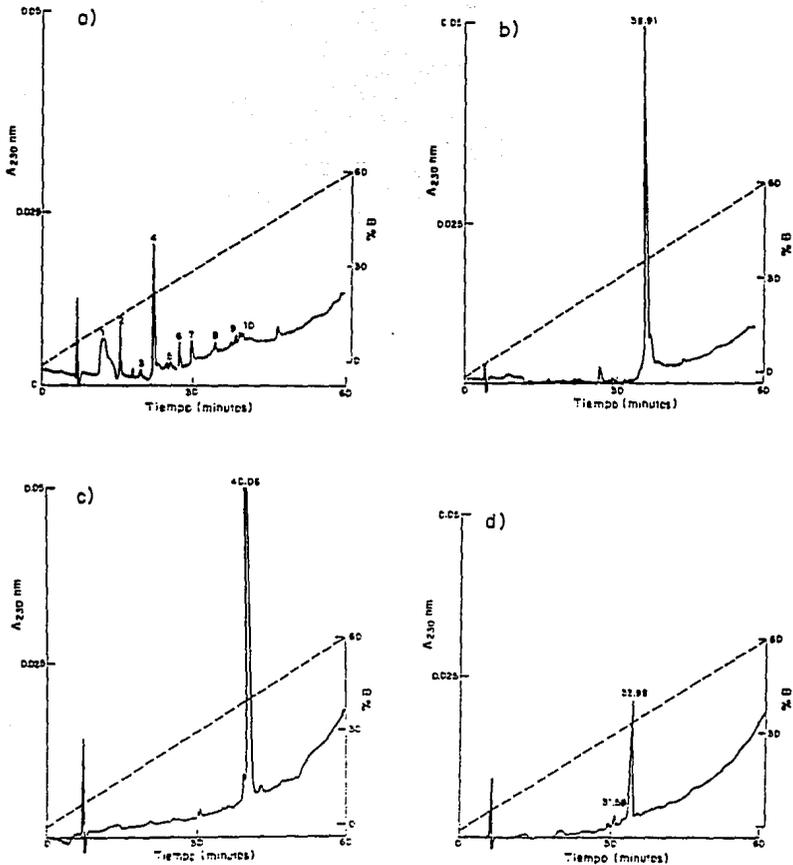


Figura 9 Patrones de digestión enzimática obtenidos de NTX nativa y de tres fracciones productos de la acetilación completa de NTX.

a) Patrón de digestión de NTX nativa reducida y carboximetilada pasada por Biogel-P2 y digerida con tripsina. Fracciones obtenidas en la acetilación completa de NTX, reducidas y carboximetiladas, pasadas por Biogel-P2 y digeridas con tripsina, b) fracción 8, c) fracción 9, d) fracción 4.

Los resultados que obtuvimos con las fracciones 4, 8 y 9 fueron los siguientes:

Al digerir la fracción 8, obtuvimos un sólo componente en el HPLC, lo que indica que al efectuar la digestión, dicha fracción no sufrió ningún cambio, debido a que todos los sitios susceptibles de corte por la tripsina estaban bloqueados por la acetilación. El mismo caso se presenta con la fracción 9, después del tratamiento con tripsina, se obtiene únicamente un componente. Esto nos lleva a suponer que esta fracción también sufrió una acetilación completa, por lo que no pudo ser digerida por la tripsina. A pesar de que las fracciones 8 y 9 tienen todas sus lisinas modificadas, el hecho de que estas dos fracciones se hayan separado en 2 diferentes componentes después de la acetilación, nos indica que entre ellas debe existir alguna diferencia, la cual pudo ser que la fracción 9 (que se retarda en salir y por lo tanto es más hidrofóbica), probablemente además de tener todas las lisinas acetiladas, sufrió modificación en las tirosinas, ya que el anhídrido acético es capaz de acetilar el grupo fenólico de los residuos tirosil en las proteínas (Riordan & Vallee, 1976)

En el caso de la fracción número 4, al digerir se obtiene un patrón de HPLC en el cual se observan dos componentes, a los que se les hizo análisis de aminoácidos y se observó que el componente mayoritario es la toxina sin amino terminal y el componente pequeño es el hexapéptido amino terminal TIINVK, lo que quiere decir que en dicha fracción sólo queda libre de modificación la lisina de la posición 6 y por lo tanto es susceptible de corte por la tripsina. En este caso se puede argumentar que ese residuo probablemente se encuentra menos accesible por lo que es el último que se acetila. Por otra parte, en esta muestra no logramos identificar si el residuo amino terminal había sufrido modificación debido que no se le hizo secuencia de aminoácidos que nos hubiera permitido saber si tal residuo estaba bloqueado o no.

A partir de estos resultados de la modificación total de la toxina, se pensó en hacer modificaciones parciales en las cuales pudieramos tener fracciones que hubieran sufrido acetilación en pocos residuos y así evaluar lo que sucede al modificar ligeramente la toxina, y ver si los residuos alterados estaban involucrados en la función de la toxina; por lo que llevamos a cabo una acetilación con un exceso 5 veces molar de anhídrido acético con respecto a la toxina, en las mismas condiciones que la acetilación anterior. La muestra acetilada se pasó por HPLC y se obtuvieron 6 fracciones (figura 10).

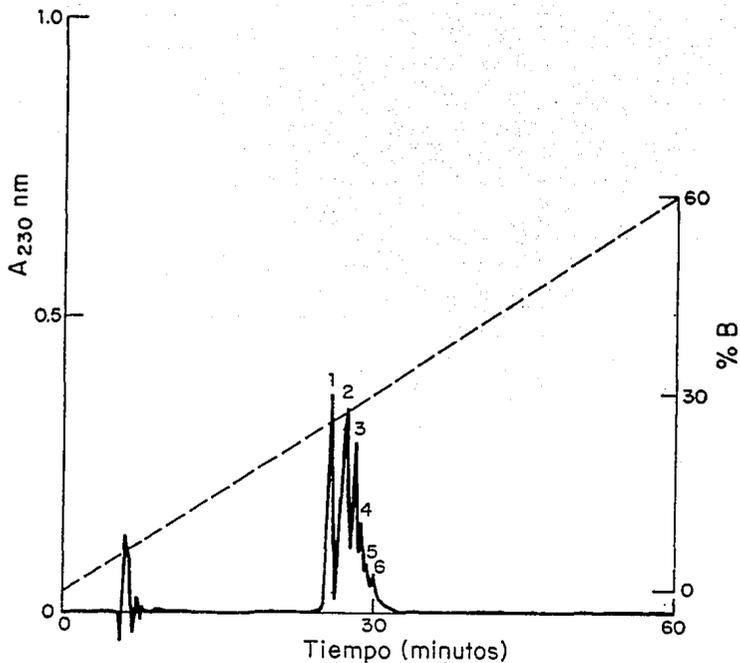


Figura 10. Separación de las fracciones productos de la acetilación parcial de NTX con anhídrido acético.

Se acetilaron 500 μg de NTX nativa con anhídrido acético en una proporción molar 1:5 con respecto a la toxina, en amortiguador Tris-HCl 20mM, en presencia de NaOH 0.2 N. Se dejó reaccionar durante 30 min a 37 $^{\circ}\text{C}$ y se purificó por HPLC fase reversa en una columna C4, eluyendo con un gradiente lineal de acetonitrilo de 0-60% durante 60 min.

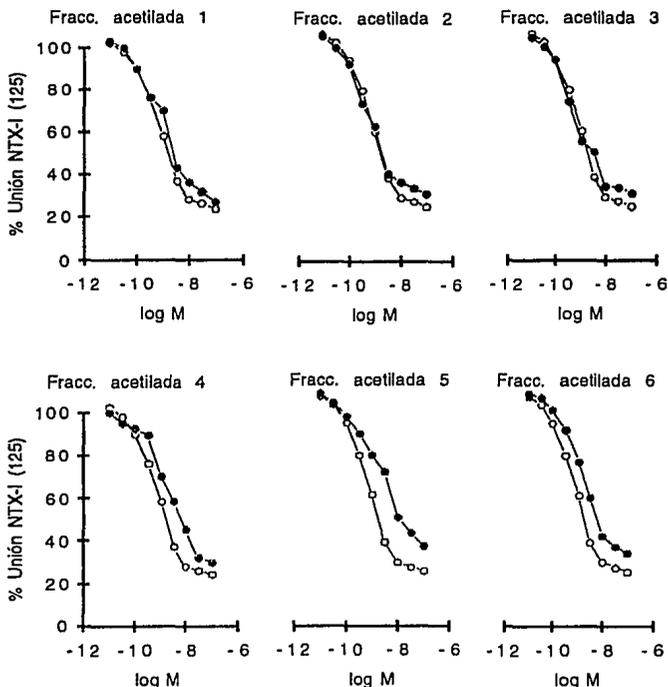


Figura 11. Curvas de desplazamiento de la unión de ^{125}I -NTX a fracción sinaptosomal de cerebro de rata, de las fracciones obtenidas en la acetilación parcial de NTX.

Se probó la capacidad de cada muestra de desplazar la unión de ^{125}I -NTX (250 pM) a fracción sinaptosomal. Las muestras se ensayaron en un rango de concentraciones de 0.01 nM a 100 nM y la unión se determinó midiendo la radioactividad presente en filtros de fibra de vidrio Whatman GF/B. (●) Curvas correspondientes a cada una de las fracciones acetiladas, (○) Curvas correspondientes al desplazamiento de NTX nativa.

Estas fracciones se ensayaron en su capacidad de desplazamiento de la unión de ^{125}I -NTX a fracción sinaptosomal. Cada una de las fracciones se probó en un rango de concentraciones de 0.01 nM a 100 nM, mientras que la ^{125}I -NTX estuvo presente en una concentración de 250 pM (figura 11). La curva de desplazamiento observada en las fracciones 1, 2 y 3 es la misma que la observada al desplazar con la toxina nativa. Con las fracciones 4, 5 y 6 ocurre algo similar, pero se requiere una concentración mayor de estas muestras para el desplazamiento, sin embargo, esta concentración no es ni una orden de magnitud más de la que se emplea con la NTX nativa para desplazarse a sí misma. Por lo que podemos concluir que las modificaciones que sufrió la toxina, no afectan su unión a la fracción sinaptosomal.

Las fracciones acetiladas se probaron también en ensayos de ELISA para evaluar si conservaban su antigenicidad. Para ésto se sensibilizó una placa con cada una de las fracciones a una concentración de $1\mu\text{g}/\text{ml}$ y se hizo reaccionar con un suero policlonal y con 6 monoclonales anti-NTX

El reconocimiento de los anticuerpos hacia las fracciones, disminuye gradualmente conforme aumenta el grado de acetilación de cada una de ellas. En la fracción 6 el reconocimiento disminuye en un 40%, en la fracción 5 en un 30% y en las fracciones 3 y 4 un 20%. Tales resultados señalan que la acetilación está afectando de alguna manera la antigenicidad de la toxina (figura 12).

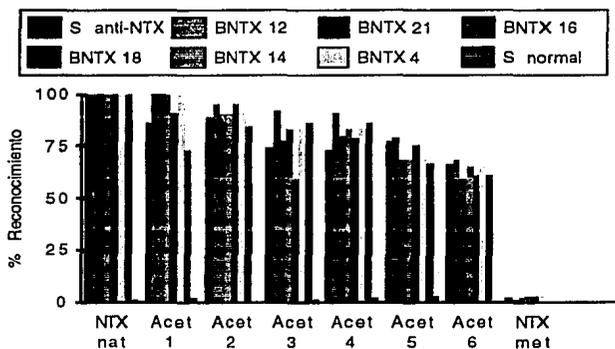


Figura 12. Reconocimiento en ELISA de las fracciones productos de acetilación 1:5, por el suero policlonal y los anticuerpos monoclonales anti-NTX indicados en el retablo situado arriba de la gráfica.

Para identificar los residuos modificados mediante esta acetilación parcial, la opción fué seguir el mismo protocolo empleado en la identificación en el caso de la acetilación total.

En este protocolo las moléculas de toxina modificada, previamente reducida y carboximetilada se digieren con tripsina y posteriormente se purifican por HPLC. Para ello requeriríamos como mínimo al rededor de 80 μg de cada muestra debido a que en la digestión obtendríamos casi tantas fracciones como las obtenidas al digerir la NTX nativa red y cmet, que sirvió como control (ver *figura 9.a*). Sin embargo, la cantidad que obtuvimos de cada una de las fracciones parcialmente modificadas no fué suficiente para realizar este protocolo, por lo que no logramos identificar en que residuo había existido una modificación.

De cualquier manera es interesante notar, que tanto el reconocimiento por el receptor en fracción P3, como el reconocimiento de dichas fracciones por el suero policlonal anti-NTX, disminuye de manera directamente proporcional con el grado de modificación que sufrió la toxina.

CONCLUSIONES

Algunos de los hallazgos experimentales más importantes de esta tesis se enumeran abajo:

Se obtuvo un suero policlonal anti-NTX cuyo título fué de 1:10000 por ELISA y de 1:20000 por RIA.

Con base en los resultados obtenidos de las modificaciones químicas y digestiones efectuadas sobre la noxiustoxina en este estudio, se derivaron las siguientes conclusiones:

- La integridad de los puentes disulfuro es necesaria para la actividad tóxica de la toxina NTX, así como para conservar su actividad antigénica..
- Parece ser que la metionina presente en la NTX se encuentra oculta o de alguna manera inaccesible por lo que no pudo ser hidrolizada por el CNBr
- La NTX se encuentra estructuralmente muy compacta y difícilmente puede ser atacada por agentes químicos o enzimáticos. Esta idea se apoya en la dificultad de hidrolizar la toxina con CNBr así como en el hecho de que al digerir a la NTX con tripsina, sin previa desnaturalización sólo se logró digerir el 20%.

Probablemente la toxina presenta esta estructuración debido a la existencia de tres enlaces disulfuro en sólo 39 residuos de aminoácidos. En este contexto es importante hacer notar que las toxinas animales tienen un alto contenido de disulfuros, en promedio, ellas poseen 1 disulfuro por 14 ± 4 aminoácidos. Un valor que es substancialmente diferente al de otras proteínas, incluyendo proteínas ricas en disulfuros como la ribonucleasa, la lisozima, la tripsina, la quimiotripsina y la amilasa (Shulz & Schrimmer, 1979), las cuales tienen en promedio 1 disulfuro cada 34 residuos de aminoácidos.

- Tanto el fragmento intermedio como el hexapéptido N-terminal, que obtuvimos mediante la digestión de la NTX con tripsina, no lograron desplazar la unión de NTX marcada a fracción P3. De la misma manera la toxina sin los dos fragmentos mencionados anteriormente, tampoco logró desplazar a la toxina nativa, a pesar de que cuenta con el resto de la molécula.. Por lo que la importancia de éstos péptidos dentro del contexto de la proteína, no puede

descartarse. En el aspecto antigénico ocurre algo similar, ninguno de los fragmentos obtenidos en la digestión fué reconocido por el suero policlonal anti-NTX. Basados en estos datos y datos previos obtenidos en el laboratorio (Gurrola *et al.* 1989) suponemos que el extremo N-terminal es fundamental en la afinidad por el receptor, mientras que el fragmento intermedio parece tener importancia en dar estabilidad a esta unión y en la antigenicidad de la toxina.

- La toxina completamente modificada por acetilación pierde su actividad farmacológica y antigénica. La lisina en la posición numero 6, es el último residuo que se acetila, lo que sugiere que es el residuo de lisina que se encuentra en una región menos accesible que el resto de las lisinas.

- En cuanto a las modificaciones parciales de la toxina, no fué posible identificar qué residuo había sufrido modificación, ya que tuvimos una gran limitante: la cantidad de toxina. Debido a que la NTX se obtiene en una proporción muy baja en el veneno total (1%), la cantidad disponible de esta toxina fué mínima, lo que nos imposibilitó para realizar mapas trópicos que nos permitieran obtener fragmentos identificables por secuencia de aminoácidos.

Además de las conclusiones y hallazgos experimentales más importantes, se discute en la parte final de esta tesis algunas limitantes encontradas durante el desarrollo de la misma y se apunta hacia algunas perspectivas futuras haciéndose referencia a la literatura pertinente publicada.

La idea de efectuar modificaciones en la toxina permanece en pie, ya que ésta es una estrategia muy útil en la identificación o elucidación del sitio que está interactuando con el canal. Una alternativa favorable en este sentido, sería la de clonar el gene que codifica para la NTX que permitiera posteriormente realizar las modificaciones por medio de mutaciones puntuales, que además de hacer posible la modificación específica de un residuo dado, eliminaría la limitante de la cantidad de toxina.

Las observaciones obtenidas en este trabajo, y resultados previos en experimentos realizados en nuestro laboratorio (Gurrola *et al.* 1989), parecen sugerir que en el sistema de membranas de cerebro de rata que estamos probando, el extremo carboxilo terminal de la NTX no es relevante en la unión de la toxina a los canales presentes en dichas membrana. Sin embargo, esta región de la molécula puede estar participando en la selectividad

hacia ciertos canales, que se sabe que son bloqueados por NTX, pero que no se han estudiado ampliamente en este sentido, como el canal de K^+ dependiente de calcio en músculo esquelético ó el Maxi K (Valdivia *et al.* 1988) y el canal de K^+ dependiente de voltaje de linfocitos T Kv1.3 (Swanson, 1990).

Existen estudios con otras toxinas que bloquean canales de K^+ y que comparten con NTX una gran semejanza a nivel de su secuencia de aminoácidos, tal es el caso de la Mgtx, una toxina obtenida del veneno del alcarán *Centruroides margaritatus*, cuya secuencia conserva un 79% de homología con la NTX. La Mgtx inhibe la unión de ^{125}I -Chtx a canales de K^+ dependientes de voltaje en membranas sinaptosomales de cerebro de rata; al igual que la Chtx, la Mgtx bloquea la corriente de K^+ tipo n en linfocitos T humanos (Kv1.3), con una potencia 20 veces mayor que Chtx (Kd 50 pM). Además la Mgtx tiene una velocidad de disociación más lenta y no afecta canales de K^+ dependientes de Ca^{++} .

El bloqueo sobre canal Kv1.3 se estudió con Mgtx recombinante, la cual mostró las mismas características de bloqueo que la toxina nativa, posteriormente, el residuo histidina de la región C-terminal de la rMgtx fué remplazado por asparagina, que corresponde al residuo 39 del extremo C-terminal de la NTX. La resultante Mgtx H39N es un inhibidor más débil que Mgtx del canal Kv1.3 (Kd 200 pM), lo cual indica que este residuo es importante en la afinidad por el canal. Si pensamos que la Mgtx conserva un alto grado de homología con NTX (en esta región existen sólo dos diferencias entre las dos toxinas, NTX posee 2 asparaginas 38 y 39, mientras que en la Mgtx son prolina e histidina respectivamente). Estos datos nos sugieren que NTX podría estar bloqueando al mismo canal por el extremo C-terminal, pero probablemente con una afinidad menor que la Mgtx.

Entre las otras toxinas con las cuales NTX posee una gran homología en secuencia se encuentran: la Chtx, la Ibtx y la Ktx. La Chtx bloquea tanto al canal Kv1.3 como al canal de K^+ activado por Ca^{++} , mientras que la Ibtx y la Ktx son selectivos para canales de K^+ activados por Ca^{++} . Con la Chtx y la Ibtx, Giangiacomo *et al* (1993) realizaron un estudio con el objeto de identificar las regiones de la Chtx que imparten selectividad hacia los dos tipos de canales que bloquea. Para ello construyeron por síntesis química dos toxinas químicas Ch-Ibtx e Ib-Chtx, así como un péptido truncado Chtx7-37. Ambas toxinas químicas inhibieron la unión de ^{125}I -Chtx a membranas de retículo sarcoplásmico de músculo liso, y ambas bloquearon el canal Maxi-K incorporado en bicapas lipídicas. En contraste, la unión de la Chtx radiomarcada en cerebro y las corrientes de canal Kv1.3 expresado en oocitos, sólo fué inhibida por la quimera Ib-Chtx. Estos hallazgos sugieren que el dominio

C-terminal de la Chtx está interactuado con el canal Kv1.3, mientras que el dominio N-terminal imparte alta afinidad en la interacción con el canal Maxi-K. Estas observaciones apoyan la idea de que las toxinas están interactuando con diversos tipos de canales por dominios diferentes en su estructura.

Sin embargo, existen reportes, en los cuales se propone que la unión de la Chtx con el canal no se lleva a cabo sólo con un extremo de la toxina como lo sugieren en el trabajo antes citado, sino que la interacción tiene lugar por medio de una superficie hidrofóbica que actúa directamente con el canal (Maxi K). Esta superficie está formada por 8 de los 32 residuos de aminoácidos presentes en la Chtx. Parece ser que de esos 8 residuos de importancia crucial en la interacción, 4 interactúan directamente con la base del canal (Arg 25, Lis 27, Met 29 y Asn 30), además de ser la superficie de interacción primaria con el poro. Se sugiere también que la lisina 27, participa en estabilizar fuertemente esta unión. Los residuos restantes (Ser 10, Trp 14, Arg 34, Tyr 36), están localizados adyacentemente a la superficie de interacción y parece ser que interactúan con las paredes laterales del canal (Stampe *et al.* 1994).

Un hecho interesante en este grupo de toxinas homólogas que bloquean canales de K^+ es la conservación de la posición de las cisteínas, lo que sugiere un patrón común de formación de puentes disulfuro, como se ha demostrado para la Ibtx y la Chtx, cuyas estructuras en solución fueron resueltas por NMR de 2-dimensiones (Bontems, F. 1991a y b; Johnson & Sugg. 1992). Por otra parte, es interesante hacer notar que los dos residuos de prolina presentes en la NTX, residen en una región de la molécula que tiene una conformación de alfa-hélice en la Chtx y en la Ibtx. Cómo estos residuos afectan la estructura de la NTX debe ser resuelto por espectroscopía H-NMR. Pero muy probablemente ellos estén jugando un papel básico en la estructura de la toxina y quizá sean responsables de algunas diferencias estructurales importantes entre la Chtx o la Ibtx y la NTX.

Finalmente, en este momento, en el laboratorio del Dr. L. Possani se está sintetizando el gene de la NTX para estudiar por técnicas de DNA recombinante, las posibles regiones estructurales más importantes de la NTX. Quizás por mutaciones puntuales dirigidas, se consiga determinar con mayor precisión, el papel de algunos de los aminoácidos estudiados por vía química, en esta tesis.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

BIBLIOGRAFIA

- Almassy, R. J., Fontecilla-Camps, J. C., Suddath, F.L. & Bugg, C. F. (1983). Structure of variant-3 scorpion neurotoxin from *Centruroides sculpuratus*, Ewing, refined at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 170: 497-527.
- Anderson, C. S., MacKinnon, R., Smith, C. & Miller, C. (1988). Charybdotoxin block a single Ca⁺⁺ activated K⁺ channels. Effects of channel gating, voltage and ionic strength. *J. Gen. Physiol.* 91: 317-333.
- Arket, S. A., Dixon, S. J. & Sims, S. M. (1992). Substrate influences rat osteoclast morphology and expression of potassium conductances. *J. Gen. Physiol. (Lond)* 458: 633-653.
- Arseniev, A.S., Kondakov, V.I., Maiorov, V.N. & Bystrov, V.F. (1984). NMR Solution spatial structure of short scorpion insectoxin I5A. *FEBS Lett.* 165: 57-62.
- Atassi, M. Z. (1984). Antigenic structures of proteins. *Eur. J. Biochem* 145: 1-20.
- Auguste, P., Huges, M., Mourre, C., Moinier, D., Tartar, A. & Lazdunski, M. (1992). Scyllatoxin, a blocker of Ca⁺⁺ activated K⁺ channels: Structure-function relationships and brain localization of the binding sites. *Biochem.* 31: 648-654.
- Bahraoui, E., El Ayeb, M., Granier, C., Van Rietschoten, J. & Rochat, H. (1987). Antigenicity of peptides 19-28 or toxin II from the scorpion *Androctonus australis Hector* a measured by different solid-phase tests and characterization of specific antibodies purified by immunoaffinity on the peptide or the toxin. *Toxicon* 25: 957-964.
- Benjamin, D. C., Berzafsky, J.A., East, I.J., Gurd, F. R. N., Hannum, C., Leach, S. J., Margoliash, E., Michael, J. G., Miller, A., Prager, E. M., Reichlin, M., Sercatz, E. E., Smith-Gill, S. J., Todd, P. E. Wilson, A. C. (1984). The antigenic structure of proteins a reappraisal. *Annu. Rev. Immunol.* 2: 67-101.
- Bernard, C. (1857). *Leçon sur les effets des substances toxiques et médicamenteuse*. Ed. Paris:Bailliere: 283-306.
- Bontems, F., Gilquin, B., Roumestand, C., Ménez, A. & Toma. F. (1992). Analysis of side-chain organization on a refined model of charibdotoxin: structural and functional implications. *Biochem.* 31: 7756-7764.
- Bontems, F., Gilquin, B., Roumestand, C., Ménez, A., Toma, F., (1992). Analysis of side-chain organization on a refined model of Charybdotoxin: structural and functional implications. *Biochem.* 31: 7756-7764.
- Bontems, F., Roumestand, C., Boyot, P., Gilquin, B., Doljanski, Y., Ménez, A. & Toma, F. (1991a). Three-dimensional structure of natural charybdotoxin in aqueous solution by H-NMR. Charybdotoxin possesses a structural motif found in other scorpion toxins. *Eur. J. Biochem* 196: 19-28.

- Bontems, F., Roumestand, C., Gilquin, B., Ménez, A. & Toma, F. (1991b). The refined structure of charybdoxin reveals the presence of a common structural motif in scorpion toxins and insect defensins. Science 254: 1521-1523.
- Boulain, J. C., Ménez, A., Coudere, J., Grazyna, F., Liacopoulos, & P. Fromageot, P. (1982). Neutralizing monoclonal antibody specific for *Naja nigricollis* toxin A: preparation, characterization and localization of the antigenic binding site. Biochem. 21: 2910-2915.
- Busch, A.E., Hurst, R.S., North, R.A., Adelman, J.P. & Kavangough, M.P. (1991). Current inactivation involves a histidine residue in the pore of the rat lymphocyte potassium channel R GK5. Biochem. Biophys. Res. Commun. 171: 1384-1390.
- Carbone, E., Prestipino, G., Spadavecchia, L., Franciolini, F. & Possani, L. D. (1987). Blocking of the squid axon K⁺ channel by noxiustoxin, a toxin from the venom of the scorpion *Centruroides noxius*. Pflügers Arch. (Eur. J. Physiol.) 408: 423-431.
- Carbone, E., Wanke, E., Prestipino, G., Possani, L. D. & Maelicke, A. (1982). Selective blockage of voltage-dependent K⁺ channels by a novel scorpion toxin. Nature 296: 90-91.
- Castle, N. A. & Strong, P. N. (1986). Identification of two toxins from scorpion (*Leiurus quinquestriatus*) Venom which block distinct classes of calcium activated potassium channels. FEBS Lett. 209: 117-121.
- Catterall, W.A., Morrow, C.S. & Hartshorne, R.P. (1979). Neurotoxin binding to receptor sites associated with voltage-sensitive sodium channels in intact, lysed and detergent-solubilized brain membranes. J. Biol. Chem 254: 11359-11387.
- Christie, M.J., North, R. A., Osborne, P.B. & Douglas, J.P. (1990). Heteropolymeric potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes from cloned subunits. Neuron 4: 405-411.
- Crest, M., Jaquet, G., Goia, M., Zerrouk, H., Benslimane, A., Rochat, H., Mansuelle, P., & Martin-Eauclaire, M.F. (1992). Kaliotoxin, a novel peptidyl inhibitor of neuronal BK-Type Ca⁺⁺ activated K⁺ channels characterized from *Androctonus mauretanicus mauretanicus* venom. J. Biol. Chem 267: 1640-1647.
- Darbon, H., Weber, C., & Braun, W. (1991). Two-dimensional H-Nuclear magnetic resonance study of AaHIT, an anti-insect toxin from the scorpion *Androctonus australis Hector*. Sequential resonance assignments and folding of the polypeptide chain. Biochem. 30: 1836-1845.
- Dolly, J. O., Halliwell, J. V., Black, J. D., Williams, R. S., Pelchem-Mathews, A., Breeze, A. L., Mehraban, F., Othman, I. B. & Black, A. R. (1984). Botulinum neurotoxin and dendrotoxin as probes for studies on transmitter release. J. Physiol. (Paris) 79: 280-303.
- Dreyer, F. (1990). Peptide toxins and potassium channels. Rev. of Physiol. Biochem and Pharmacol. 115: 93-136.

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

El Ayeb, M., Bahraoui, E. M., Granier, C., Delori, P., Van Rietschoten, J. & Rochat, H. (1984). Immunochemistry of scorpion alfa-toxin: purification and characterization of two functionally independent IgG populations raised against toxin II of *Androctonus australis Hector*. Mol. Immunol 21: 223-232.

El Ayeb, M., Darbon, H., Bahraoui, E., Vargas, O. & Rochat, H. (1986). Differential effects of defined chemical modifications on alfa and beta toxins. Antigenic and pharmacological activities of scorpion. Eur. J. Biochem. 155: 289-294.

Fersht, A. R. (1987). Dissection of the structure and activity of the tyrosyl-tRNA synthetase by site-directed mutagenesis. Biochem. 26: 8031-8037.

Fontecilla-Camps, J.C., Almasy, R. J., Suddath, F. L., Watt, D. D. & Bugg, C. E. (1980). Three-dimensional structure of a protein from scorpion venom: a new structural class of neurotoxins. Proc. Natl Acad. Sci. USA 77: 6496-5000.

Fontecilla-Camps, J. C., Harbersetzer-Rochat, C. & Rochat, H. (1988). Orthorhombic crystals and three-dimensional structure of the potent toxin II from the scorpion *Androctonus australis Hector*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7443-7447.

Fontecilla-Camps, J.C. (1989). Three-dimensional model of the insect-directed scorpion toxin from *Androctonus australis Hector* and its implication of the evolution of scorpion toxins in general. J. Molec. Evol. 29: 63-67.

Galfre, G. & Milstein, C. (1981). Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. Meth. Enzymol. 73: 1-46.

Galvez, A., Gimenez-Gallego, G., Reuben, J.P., Roy-Contancin, L., Feigenbaum, P., Kaczorowski, G. & Garcia, M.L. (1990). Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance Ca^{++} activated potassium channel from the venom of the scorpion *Buthus tamulus*. J. Biol. Chem. 265: 11083-11090.

Garcia-Calvo, M., Leonard, R.J., Novick, J., Stevens, P. S., Schmalhofer, W., Kaczorowski, G.J. & Garcia, M. L. (1993). Purification, characterization and biosynthesis of Margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. J. Biol. Chem. 268: 18899-18874.

Gatineau, E., Takechi, M., Bouet, P., Mansuelle, P., Rochat, H., Harvey, A. L., Montenay-Garrestier, T. & Ménez, A. (1990). Delineation of the functional site of a snake venom cardiotoxin: preparation, structure and function of monoacetylated derivatives. Biochem. 29: 6480-6489.

Giangiaco, K. M., Garcia, M. L. & Owen, B.M. (1992). Mechanism of Iberotoxin block of the large-conductance calcium activated potassium channel from bovine aortic smooth muscle. Biochem 31: 6719-6727.

Giangiaco, K. M., Sugg, E. E., Garcia-Calvo, M., Leonard, R. J., McManus, O. B., Kaczorowski, G. J. & Garcia, M. L. (1993). Synthetic charybdotoxin-iberotoxin chimeric peptides define toxin binding sites on calcium-activated and voltage-dependent potassium channels. Biochem. 32: 2363-2370.

Giangiaco, K. M., Sugg, E. E., Garcia-Calvo, M., Leonard, R. J., McManus, O. B., Kaczorowski, G. J. & Garcia, M. L. (1993). Synthetic Charybdotoxin-Iberotoxin chimeric peptides define toxin binding sites on calcium activates and voltage-dependent potassium channels. Biochem. 32: 2363-2370.

Jimenez-Gallego, G., Navia, M. A., Reuben, J. P., Katz, G. M., Kaczorowski, G.J. & Garcia, M. L. (1988). Purification, sequence and model structure of charybdotoxin, a potent selective inhibitor of calcium-activated potassium channels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 3329-3333.

Goodfriend, L. T., Levine, L. & Fasman, G. D. (1964). Antibodies to bradykinin and angiotensin: a use of carbodiimides in immunology. Science 144: 1344-1346.

Grognet, J. M., Gatineau, E., Bougis, P., Harvey, A. L., Coudere, J., Fromageot, P. & Ménez, A. (1986). Two neutralizing monoclonal antibodies specific for Naja nigricollis cardiotoxin: preparation, characterization and localization of the epitope. Molec. Immunol. 23: 1329-1337.

Gurrola, G. B., Mollinar-Rode, T., Stiges, M., Bayon, A. & Possani, L. D. (1989). Synthetic peptides corresponding to the sequence of noxiustoxin indicate that the active site of this channel blocker is located on its amino terminal portion. J. Neural. Transm. 77: 11-20.

Haberman, E. (1984). Apamin. Pharmacol. Ther. 25: 255-270.

Hille, B. (1992). Ionic Channels of excitable membranes. Ed. Sinauer, Sunderland, M. A. : 115-135.

Hodgkin, A.L. & Huxley, A.F. (1952). The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo. J. Physiol 116: 497-506.

Hugues, M., Duval, D., Kitabgi, P., Lazdunski, M. & Vincent, J. P. (1982). Preparation of a pure monoiodo derivatives of the bee venom neurotoxin apamin and its binding properties to rat brain synaptosomes. J. Biol. Chem. 257: 2762-2769.

Iverson, L.E. & Rudy, B., (1990). The role of the divergent amino and carboxyl domains on the inactivation properties of potassium channels derives from the shaker gene of Drosophila. J. Neurosci. 10: 2903-2916.

Jan, L. & Jan, Y.N. (1992). Structural elements involved in specific K⁺ channel function. Annu. Rev. Physiol. 54: 535-555.

Johnson, B.A. & Sugg, E. E. (1992). Determination of the three-dimensional structure of Iberotoxin in solution by H Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. Biochem. 31: 8151-8159.

- Köhler, G. & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. Nature 256: 495-497.
- Kaiser, E.T. & Lawrence, D.S. (1984). Chemical mutation of enzyme active sites. Science 226: 505-511.
- Kharrat, R., Darbon, H., Rochat, H. & Granier, G. (1989). Structure/activity relationships of scorpion alfa-toxins. Eur. J. Biochem. 181: 381-390.
- Kopeyan, C., Martínez, G., Lissitzky, S., Miranda, F. & Rochat, H. (1974). Disulfide bonds of toxin II of the scorpion *Androctonus australis Hector*. Eur. J. Biochem. 47: 483-489.
- Latorre, R., Oberhauser, A., Labarca, P. & Alvarez, O. (1989). Varieties of Calcium-activated potassium channels. Annu. Rev. Physiol. 51: 385-399.
- Leonard, R. J., García, M. L., Slaughter, R.S. & Reuben, J. P. (1992). Selective blockers of voltage-gated K⁺ channels depolarize human T lymphocytes: Mechanism of the antiproliferative effect of charybdotoxin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 10094-10098.
- Li, M., Jan, Y.N. & Jan, L.Y. (1992). Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. Science 257: 1225-1230.
- MacKinnon, R. (1991). Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. Nature 350: 232-235.
- MacKinnon, R. & Miller, C. (1989). Mutant potassium channels with altered binding of charybdotoxin, a pore blocking peptide inhibitor. Science 245: 1382-1385.
- Martins, J. C., Zhang, W., Tartar, A., Lazdunski, M. & Borremans, F. A. M. (1990). Solution conformation of leiurotoxin I(Syllatoxin) by 1H nuclear magnetic resonance. FEBS Lett. 260: 249-253.
- McCormack, K., Lin, J.W., Iverson, L.E. & Rudy, B. (1990). Shaker K⁺ channel subunits from heteromultimeric channels with novel functional properties. Biochem. Biophys. Res. Commun 171: 1361-1371.
- Menez, A. (1991). Immunology of snake toxins. Snake Toxins. Ed. A. L. Harvey. New York: Pergamon: 35-90.
- Menez, A., Bontems, F., Roumestand, C., Gilquin, B. & Toma, F. (1992). Structural basis for functional diversity of animal toxins. Proc. Royal Society of Edinburgh 99B: 83-103.
- Menez, A., Gatineau, E., Roumestand, C., Harvey, A.L., Mouawad, L., Gilquin, B. & Toma, F. (1990). Do cardiotoxins possess a functional site? Structural and chemical modification studies reveal the functional site of cardiotoxin from *Naja nigricollis*. Biochimie 72: 575-588.

- Merrifield, R. (1963). Solid phase peptide synthesis I: Synthesis of a tetrapeptide. Ed. J. AM. Chem. Soc. 85: 2144-2154.
- Miller, C., Moczydlowski, E., Latorre, R. & Phillips, M. (1985). Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca⁺⁺ activated K⁺ channels from mammalian skeletal muscle. Nature 313: 316-318.
- Moczydlowski, E., Lucchesi, K. & Ravindran, A. (1988). An emerging pharmacology of peptide toxins targeted against potassium channels. J. Membrane Biol. 105: 95-111.
- Morrison, M. & Bayse, G.S. (1970). Catalysis by lactoperoxidase. Biochem. 9: 2995-3000.
- Offord, R. E. (1987). Protein engineering by chemical means? Protein Eng. 1: 151-157.
- Oliva, C., Wiedelmann, R., Bennett, C., Folander, K., Swanson, R. & Smith, J. (1991). Alternative splicing contributes to K⁺ channel diversity in the mammalian central nervous system. Soc. Neurosci. Abst. 17: 775.
- Parcej, D. & Dolly, J. O. (1989). Elegance persists in the purification of the K⁺ channels (letter: comment). Biochem. J. 257: 899-903.
- Park, C. S. & Miller, C. (1992). Mapping function to structure in a channel-blocking peptide: electrostatic mutants of charybdotoxin. Biochem. 31: 7749-7755.
- Pongs, O. (1992). Structural basis of voltage-gated K⁺ channel pharmacology. Trends Pharmacol. Sci. 13: 359-365.
- Possani, L. D., Martin, M. B., Svendsen, I. B. (1982). The primary structure of Noxiustoxin: a K⁺ channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffman. Carlsberg Res Commun. 47: 285-289.
- Possani, L.D. (1984). Structure of scorpion toxins. Handbook of Natural toxins. Ed. Tu. A.T. Ed. 2: 513.
- Possani, L.D., Dent, R. A., Martin, M. B., Maelicke, A. & Svendsen, I. B. (1981). The amino terminal sequence of several toxins from the venom of the mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffman. Carlsberg Res. Commun. 46: 207-214.
- Possani, L.D., Valdivia, H. H., Ramirez, A.N., Gurrola, G. B. & Martin, B. M. (1992). K⁺ channel blocking peptides isolated from the venom of scorpions. Recent Advances in Toxinology Research. Ed. P. Gopalakrishnakone & C. K. Tan 1: 39-58.
- Prestipino, G., Valdivia, H. H., Liévano, A., Darszon, A., Ramirez, A. N. & Possani, L. D. (1989). Purification and reconstitution of potassium channel proteins from squid axon membranes. FEBS lett. 250: 270-274.
- Rehm, H. & Lazdunski, M. (1988). Purification and subunit structure of a putative K⁺ channel protein identified by its binding properties for dendrotoxin I. Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 85: 4919-4923.

Riordan, J. F., Vallee, B. L. (1967). Acetylation. Methods Enzymol. Ed. 11: 565-570.

Rochat, H. C. & Sampieri, F. (1976). Structure-function relationships of scorpion neurotoxins. Biochemistry 15(11): 2254-2261.

Rochat, H., Bernard, P. & Couraud, F., (1979). Scorpion toxins: chemistry and mode of action. Advances in Cito pharmacology. Ed. Ceccarelli, B. & Clementini, F. New York: Raven Press. 3: 325-334.

Roumestand, C., Gatineau, E., Gilquin, B., Ménez, A. & Toma, F. (1990). Site-directed chemical modifications as an aid for the three-dimensional structure studies of the toxic site of a cardiotoxin using proton NMR and distance geometry calculations. Peptides, chemistry, structure and biology. Proc. 11th. American Peptide Symposium. Ed. Rivier, J. E. & Marshall, G.R. Leiden: ESCOM: 622-624.

Rudy, B. (1988). Diversity and ubiquity of K⁺ channels. Neuroscience 25: 729-749.

Sands, S. B., Lewis, R. S. & Cahalan, M. D. (1989). Charybdotoxin blocks voltage-gated K⁺ channels in human and murine T lymphocytes. J. Gen. Physiol 93: 1061-1074.

Schweitz, H., Bidard, J. N., Maes, P. & Lazdunski, M. (1989). Charybdotoxin is a new member of the K⁺ channel toxin family that includes dendrotoxin I and mast cell degranulating peptide. Biochem. 28: 9708-9714.

Shulz, G. E. & Stryer, R. H. (1979). Principles of protein structure. Ed. Cantor, C. R. Heidelberg: Springer-Verlag.

Simard, M. & Watt, D. D., (1990). Venoms and Toxins. The biology of the Scorpions. Ed. Polis, G. A. Stanford University Press: 414-444.

Sitges, M., Possani, L. D. & Bayón, A. (1986). Noxiustoxin, a short-chain toxin from the mexican scorpion *Centruroides noxius*, induces transmitter release by blocking K⁺ permeability. J. Neurosci. 6: 1570-1574.

Stampe, P., Kolmakova-Partensky, L. & Miller, C. (1994). Intimations of K⁺ channel Sytructure from a complete functional map of the molecular surface of charybdotoxin. biochem 33: 443-450.

Stocker, M., Stuhmer, W., Wittka, R., Wang, X., Muller, R., Ferrus, A. & Pongs, O. (1990). Alternative shaker transcripts express either rapidly inactivating or noninactivating K⁺ channels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 8903-8907.

Sugg, E. E., García, M. L., Reuben, J. P., Patchett, A. A. & Kaczorowski, G. J. (1990). Synthesis and structural characterization of charybdotoxin, a potent peptidyl inhibitor of the high conductance Ca⁺⁺ activated channel. J. Biol. Chem. 31: 18745-18748.

Swanson, R. & Folander, K. (1992). In vitro synthesis of RNA for expression of ion

channels in *Xenopus*. Methods Enzymol. 207: 310-319.

Swanson, R., Marshall, J., Smith, J.S., Williams, J.B., Boyle, M.B., Folander, K., Luneau, C.J., Antanavage, J., Oliva, C., Buhrow, S.A., Bennett, C., Stein, R.B. & Kaczmarek, L. K. (1990). Cloning and expression of cDNA and genomic clones encoding three delayed rectifier potassium channels in rat brain. Neuron 4: 929-939.

Timple, L.C., Schwarz, T.L., Tempel, B.L., Papazian, D.M., Jan, Y.N. & Jan, L.Y. (1988). Expression of functional potassium channels from shaker cDNA in *Xenopus* oocytes. Nature 313: 143-145.

Vaca, L., Gurrola, G. B., Possani, L. D. & Kunza, D. L. (1993). Blockade of a K (Ca) Channel with syntetic peptides from noxiustoxin: a K⁺ channel blocker. J. Membr. Biol. 134: 123-129.

Valdivia, H. H., Martin, B. M., Escobar, L. & Possani, L. D. (1992). Noxiustoxin & Leiurutoxin III, two homologous peptide toxins with binding properties to synaptosomal membrane K⁺ channels. Biochem int. 27: 953-962.

Valdivia, H. H., Smith, J. S., Martin, B. M., Coronado, R. & Possani, L. D. (1988). Charybdotoxin and Noxiustoxin, two homologous peptides inhibitors of the K(Ca) Channel. FEBS Lett. 226: 280-284.

Vazquez, J., Feigenbaum, P., Katz, G., King, V.F., Reuben, J. P., Roy-Contancin, L., Slaughter, R. S., Kaczorowski, G. J. & García, M. L. (1989). Characterization of high affinity binding sites for charybdotoxin in sarcolemal membranes from bovine aortic smooth muscle. J. Biol. Chem. 264: 29902-29909.

Vazquez, J., Feigenbaum, P., King, V. F., Kaczorowski, G. F. & García, M. L. (1990). Characterization of High affinity binding sites for charybdotoxin in synaptic plasma membranes from rat brain. J. Biol. Chem. 265: 15564-15571.

Vithayathil, P. & Richards, F. M. (1960). J. Biol. Chem. 235: 1029.

Wei, A., Covarrubias, M., Butler, A., Baker, K., Pak, M. & Salkoff, L. (1990). K⁺ current diversity is produced by an extenden gene family conserved in *Drosophila* and mouse. Science 248: 599-603.

Yellen, G., Jurman, M.E., Abramson, T. & MacKinnon, R. (1991). Mutation affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K⁺ channel. Science 251: 939-942.