

00551

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS, OPCIÓN
MAESTRÍA EN CIENCIAS.

Título de la tesis:

"Aislamiento y caracterización de un péptido del veneno del alacrán *Centruroides noxius*-Hoffmann, que bloquea específicamente el canal de potasio HERG".

Presenta:

Q.F.B. Genaro Pimienta Rosales.

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

"Que no soy un santo, bien lo sé.
La cuenta llevo yo de mis pecados
y es tal su número que mejor será
dejarla a un lado, no venga a
entorpecer este relato".

El Converso
José Manuel Fajardo.

"La verdad no tiene la obligación de
ser siempre interesante. La prueba es
que en ocasiones no lo es".

La muerte y la brújula
Jorge Luis Borges.

Esta tesis está dedicada a mis padres Ana María y Eulogio,
y a mis hermanas Ana Lucia y Verónica. Quiero también hacer un
apartado bibliográfico (por así llamarle) y citar a mis cuates,
que no se han salvado de aguantarme ahora ni nunca. Mis
agradecimientos son grandes para el Dr. Possani y su grupo por
su apoyo.

I. -PRELIMINAR:

Este trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Lourival Domingos Possani Postay, bajo la tutoría de la Dra. Georgina Gurrola Briones. Estuvo financiado en parte por los donativos de la Howard Hughes Medical Institute Grant No. 75197-527107 y DGAPA-UNAM No. IN217997. Para el desarrollo de este trabajo, recibí beca del CONACyT y un complemento económico de DGEP.

II. -LISTA DE ABREVIATURAS:

-Aminoácidos utilizados:

L-Pro-OH prolina

L-Ala-OH alanina

L-Lys-OH lisina

L-Cys-OH cisteína

L-Phe-OH fenilalanina

L-Met-OH metionina

L-Gln-OH glutamina

L-Asn-OH asparagina

L-Thr-OH treonina

L-Gly-OH glicina

L-His-OH histidina

L-Asp-OH aspártico

L-Glu-OH glutámico

L-Tyr-OH tirosina

-(ATP) adenosintrifosfato

-(Boc) t-butoxicarbonilo

-(Ca²⁺) calcio

-(Cl⁻) cloro

-(CLAP) cromatografía líquida de alta precisión

-(CDV) canal dependiente de voltaje

-(CPDV) canal de potasio dependiente de voltaje

-(CPRE) canal de potasio rectificador de la corriente entrante

-(DIPEA) dimetil-N,N-diisopropiletildiamina

-(DCC) diciclohexilcarbodiimida

-(DCM) diclorometano

-(DMF) dimetilformamida

-(ErgTx) Ergtoxina nativa

-(ErgTxCOOH) Ergtoxina carboxilo libre

-(ErgTxNH₂) Ergtoxina carboxiamidada

-(Fmoc) 9-fluorenilmetiloxycarbonilo

-(FR) fase reversa

-(g) gramos

-(H⁺) protón

- (HBTU) hexafluorofosfato de benzotriazoliloxytetrametiluronio
- (HBOt)), 2-(1 H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato
- (K⁺) potasio
- (L) grupo protector transitorio
- (MBHA) p-metiloxibencidrilamina
- (MCD) péptido degranulador de mastocitos
- (mequ) miliequivalentes
- (mg) miligramos
- (ml) mililitros
- (mM) milimolar
- (mmol) milimoles
- (Na⁺) sodio
- (PAL) *peptide amide linker*
- (PEG) polietilenglicol
- (pI) punto isoeléctrico
- (rpm) revoluciones por minuto
- (S) grupo protector permanent
- (SPFS) síntesis química de péptidos por el método de la fase sólida
- (TFA) ácido Trifluoroacético
- (tRNA) RNA de transferencia
- (Trt) trifenilmetil

III.-LISTA DE FIGURAS:

- Figura 1. Motivos estructurales descritos hasta el momento para péptidos de origen natural.
- Figura 2. Canales Iónicos.
- Figura 3. Separación de la Fracción peptídica del veneno por CLAP-FR e identificación de los componentes activos.
- Figura 4. Obtención de ErgTx por intercambio iónico.
- Figura 5. Dicroísmo circular de ErgTx.
- Figura 6. Comparación de ErgTx con la secuencia de toxinas aisladas de diferentes organismos.
- Figura 7. Producto de la síntesis química de ErgTxNH₂.
- Figura 8. Producto de la síntesis química de ErgTxCOOH.

- Figura 9. Oxidación de ErgTxNH₂ en presencia de O₂.
- Figura 10. Plegamiento de ErgTxNH₂, en presencia de Glutati6n reducido y oxidado.
- Figura 11. Recromatografía de ErgTxNH₂.
- Figura 12. Mezcla de ErgTxNH₂ + ErgTx.
- Figura 13. Mezcla de ErgTxCOOH + ErgTx.
- Figura 14. Oxidaci6n de ErgTxCOOH en presencia de DMSO 20%, cuando la reacci6n se lleva al equilibrio.
- Figura 15. Plegamiento de ErgTxCOOH en presencia de glutati6n reducido y oxidado + cloruro de guanidinio 1M.
- Figura 16. Plegamiento de ErgTxCOOH previamente plegada.

IV.-RESUMEN:

El gen *erg* (hom6logo al gen *ether-a-go-go*, *eag* en *Drosophila*) se expresa principalmente en coraz6n, gl6ndulas adrenales y cerebro. Erg (*herg* en humanos), codifica para un canal de potasio (K⁺) ERG, crucial en la fisiología del coraz6n y en la excitabilidad neuronal de mamíferos. HERG es un componente molecular responsable de arritmias cardíacas y posiblemente de la proliferaci6n de células cancerígenas. HERG es bloqueado por varios antiarrítmicos clase III, algunos antihistamínicos y el antipsic6tico haloperidol. Sin embargo, aún no se cuenta con una herramienta molecular adecuada para el estudio bioquímico de ERG y para el desarrollo de un nuevo fármaco. Las toxinas de origen animal representan herramientas valiosas para el estudio fisiológico y estructural de canales i6nicos. En especial, las toxinas de alacrán, han servido como molécula de prueba para caracterizar la regi6n formadora del poro en canales de K⁺. En el presente trabajo se reporta por primera vez, la purificaci6n, caracterizaci6n estructural y sntesis química de Ergtoxina (ErgTx). ErgTx es una toxina aislada del alacrán mexicano *Centruroides noxius*, que bloquea específicamente y con alta afinidad, al canal de K⁺ ERG. ErgTx es un péptido b6sico de 42 aminoácidos estabilizado por 3 puentes disulfuro. Es una molécula difícil de sintetizar y con una estructura distinta a las que se han reportado para toxinas de animal.

V.-OBJETIVOS:

Objetivo General.

Identificar, purificar hasta homogeneidad y caracterizar un componente peptídico del veneno del alacrán *Centruroides noxius-Hoffmann*; capaz de bloquear el canal de K^+ HERG.

Objetivos particulares.

- a) Identificar y aislar el péptido de interés
- b) Caracterización química del péptido aislado
 - composición de aminoácidos
 - peso molecular
 - estructura primaria
 - patrón de puentes disulfuro
 - modificaciones post-traduccionales
 - estructura secundaria
- c) Síntesis química del péptido

VI.-HIPÓTESIS:

El alacrán *Centruroides noxius-Hoffmann*, es el más venenoso en América del Norte; la inyección de su veneno altera las funciones del sistema nervioso, circulatorio y cardíaco de su presa o agresor. Tomando en cuenta la complejidad farmacológica de este veneno y la participación del canal de K^+ HERG en la ritmicidad del latido cardíaco; es posible aislar del veneno de este alacrán, un inhibidor del canal de K^+ HERG.

VII.-METODOLOGÍA:

a) Obtención del Veneno.

Los alacranes fueron colectados en el estado de Nayarit, México. El veneno se obtuvo por estimulación eléctrica del telson y fue colectado en una caja de Petri. Antes de comenzar la extracción, los animales fueron anestesiados con CO_2 . El veneno se disolvió en agua bidestilada y se centrifugó durante 10 minutos a 15000 revoluciones por minuto (rpm). Se utilizó una centrífuga Beckman J2-21 equipada con un rotor JA-20. El

sobrenadante se juntó en un solo envase y finalmente fue liofilizado y guardado a -20°C .

b) Métodos Cromatográficos y de Purificación.

La purificación constó de dos etapas. Durante la primer etapa, la fracción soluble del veneno fue sometida a un proceso de filtración en gel. Se utilizó una columna Sephadex G-50 medio de Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Suecia). El eluyente fue acetato de amonio 20 mM, pH 4.7 y un flujo de 40 ml/hora. Durante la segunda etapa, la fracción peptídica obtenida por filtración en gel, fue separada por Cromatografía Líquida de Alta Precisión (CLAP). Se utilizó un cromatógrafo Waters y una columna semipreparativa de fase reversa (FR) C-18, Vydac.

c) Caracterización Química.

La composición de aminoácidos se determinó por hidrólisis ácida de 15 microgramos del péptido reducido y carboximetilado (para poder cuantificar las cisteínas). Se utilizó un analizador Beckman 6300. La masa se determinó analizando 1 microgramo de péptido puro con un espectrómetro de masas de ionización "electrospray". La secuencia de aminoácidos del péptido previamente reducido y carboximetilado se obtuvo utilizando un secuenciador Beckman LF 3000. Para las digestiones peptídicas, se utilizaron enzimas Boehringer Mannheim grado secuenciación.

d) Síntesis Química de ErgTx.

La síntesis química de ErgTx se realizó por el método de fase sólida, siguiendo la estrategia de Fmoc (Atherton and Sheppard 1989).

d.1 ErgTx con el extremo carboxilo amidado (ErgTx-NH₂).

Se utilizó la resina Rink-Amide-MBHA(p-metilbencidrilamina) con una densidad de 0.62 mequ./g. Los amino ácidos utilizados fueron: Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Phe-OH, Fmoc-L-Met-OH, Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-L-Thr(OtBu)-OH, Fmoc-L-Gly-OH, Fmoc-L-His(Trt)-OH, Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-L-Tyr(OtBu)-OH, Fmoc-L-Ser(OtBu)-OH, Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Val-OH. Todos estos reactivos fueron marca Peninsula Laboratories, Inc.

En cada acoplamiento los aminoácidos se activaron en forma de éster en presencia de la mezcla de los activadores N-hidroxibenzotriazol (HBOt), 2-(1 H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HBTU) y dimetil-N,N-diisopropiletilendiamina (DIPEA), en una proporción estequiométrica 1:1:2. La mezcla de reacción se agitó durante 45-60 minutos en cada acoplamiento. Al final de cada acoplamiento, se acetiló con anhídrido acético en presencia de DIPEA durante 30 minutos para facilitar la purificación del producto final. Al terminar de acoplar el último aminoácido, el péptido se lavó 10 veces con dimetilformamida (DMF) y después tres veces con diclorometano (DCM) y tres veces con metanol absoluto; la humedad se eliminó aplicando vacío, utilizando un rotaevaporador marca Savanth. La resina seca se solvató con reactivo K (ácido trifluoroacético, TFA 85%; tiofenol 5%, agua 5%, anisol 5% y etanoditiol 1%), se agregó además una proporción 1/100 de ditiotreitól. La proporción resina/reactivo K fue de 15 mg de resina/ml de reactivo K. La mezcla de reacción se dejó agitando a temperatura ambiente dentro de una campana de extracción, durante 90 minutos.

El péptido se separó de la resina por filtración, recibiendo en éter isopropílico frío para precipitar el producto peptídico crudo. El filtrado se dejó reposar 60 minutos y después se lavó tres veces con éter isopropílico frío centrifugando a 3000 rpm, durante 10 minutos y decantando el sobrenadante. Entre cada lavado, el precipitado se dejó reposar cinco minutos. Finalmente, el péptido se disolvió rápidamente en un volumen mínimo de ácido acético al 20%, y se liofilizó. El péptido crudo y liofilizado se purificó por CLAP-FR utilizando una columna C-4 semipreparativa y un gradiente lineal: 0-60%B, donde A es TFA 0.12% en agua tetradestilada y B es acetonitrilo 0.1% en agua tetradestilada.

d.2 ErgTx con el extremo carboxilo libre (ErgTx-COOH).

Se utilizó la resina PEG-PAL marca Peninsula Laboratories, Inc., con una densidad de 0.15 mequ./g. Los aminoácidos utilizados fueron los mismos que para la síntesis de ErgTx-NH₂.

El primer acoplamiento se llevó a cabo con el aminoácido activado en forma de anhídrido simétrico, de acuerdo al siguiente protocolo: en un matraz de fondo redondo se disolvió 1 mmol de Fmoc-L-Pro-OH, en un volumen mínimo de DCM. A la

disolución se agregaron 0.475 mmol de dicitclohexilcarbodiimida (DCC), previamente disueltos en 1 ml de DCM. La mezcla se agitó a temperatura ambiente, durante 10 minutos (tiempo suficiente para la formación de un precipitado blanco: dicitclohexilurea). El precipitado se lavó tres veces con DCM y se eliminó por filtración. El sobrenadante se concentró por evaporación al vacío hasta obtener un sólido blanco (el anhídrido simétrico), libre de DCM. Finalmente, el anhídrido simétrico se mezcló con 200 mg de resina y 0.1 miliequivalentes de 4-dimetilaminopiridina. Los tres reactivos se disolvieron con tres ml de DCM; la reacción se dejó agitando a temperatura ambiente durante una hora.

Los aminoácidos subsiguientes se activaron en forma de éster en presencia de la mezcla de los activadores N-hidroxibenzotriazol HBT, HBTU y DIPEA, en una proporción estequiométrica 1:1:2. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos en cada acoplamiento. Para la síntesis de ErgTxCOOH, decidimos no acetilar al final de cada reacción y así disminuir la posibilidad de reacciones secundarias. Al terminar de acoplar el último aminoácido, el protocolo de ruptura del péptido de la resina y su purificación fue el mismo que describimos para ErgTxNH₂.

e) Plegamiento de ErgTxNH₂ y ErgTxCOOH.

Las condiciones de plegamiento *in-vitro* ensayadas para ErgTxNH₂ y ErgTxCOOH se muestran en la tabla I y se describen en la sección de resultados. Los reactivos utilizados fueron grado analítico. El monitoreo de la reacción y la separación de la mezcla de reacción, al final de cada ensayo, se hicieron por CLAP-FR con una columna C-18 analítica y semipreparativa respectivamente. Las condiciones ensayadas fueron las siguientes:

Tabla I.

Condiciones ionicas	PH	Temperatura	Dilución	Rendimiento	Actividad
1. Glutación reducido/oxidado (5mM/0.5mM), fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0.1 M	7.8	25°C	1 mg de toxina en 10 ml	< 1.0%	Negativa
1. Glutación reducido/oxidado (5mM/0.5mM), fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0.1 M	8.0	25°C	1 mg de toxina en 10 ml	< 1.0%	Negativa
2. Glutación reducido/oxidado (5mM/0.5mM), fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0.1 M	7.8	4°C	1 mg de toxina en 10 ml	< 0.1%	Negativa
3. Dimetilsulfóxido 20%	6.0	25°C	1 mg de toxina en 10 ml	<1.0%	Negativa
4. Glutación reducido/oxidado (5mM/0.5mM), cloruro de guanidinio 1M, EDTA 1 mM	7.8	25°C	1 mg de toxina en 200 ml	<1.0%	Muy poca actividad

VIII.- ANTECEDENTES:

1.1 .- Estrategias para el Descubrimiento y Diseño de Fármacos.

La naturaleza es capaz de generar moléculas orgánicas pequeñas con estructuras complejas y propiedades farmacológicas diversas. Una consecuencia es que los fármacos más eficientes disponibles para el ser humano, son de origen natural (Petsko 1996). Se han aislado péptidos y compuestos heterocíclicos con actividad insecticida, antimicrobiana, antiviral, antiprotozoaria, antineoplásica, proneoplásica, antiinflamatoria e inmunosupresiva (Humphrey and Chamberlain, 1997).

A inicios del siglo XIX, se gestó un gran interés por estas moléculas, llamadas posteriormente "productos naturales" o metabolitos secundarios. Este movimiento dio origen a la química orgánica (denominada así por su énfasis en la química de los seres vivos). Desde entonces y hasta la fecha, el estudio de la

naturaleza química y estructural de los productos naturales, ha sido crucial en el descubrimiento de nuevos fármacos, alterando profundamente el curso de la historia de la humanidad (Petsko 1996).

Por definición, el descubrimiento de un nuevo fármaco comienza siempre por la identificación de una molécula con actividad biológica (molécula líder). Estudios de la estructura y la función de la molécula líder permiten mejorar sus propiedades farmacológicas (i.e. estabilidad, especificidad, afinidad, farmacocinética y bioequivalencia), hasta obtener un compuesto que pueda comercializarse como medicamento (Blundell 1996). Para la búsqueda de una molécula líder, se siguen tres estrategias: el análisis de 1) extractos de plantas y microorganismos, 2) veneno de animales ponzoñosos ; y 3) librerías combinatorias generadas *in-vitro*, de péptidos o compuestos orgánicos (Petsko 1996).

Se puede atribuir a la naturaleza el crédito por haber inventado la química combinatoria. Sin embargo, es el hombre quien la ha puesto en práctica (Verdine 1996). El principio de la química combinatoria es la generación simultánea de una gran cantidad de compuestos por combinación aleatoria de los reactivos. Esta estrategia se basa en la premisa de que mientras más grande sea el número de compuestos generados, mayor es la probabilidad de encontrar una molécula con actividad biológica (Hogan Jr., 1996; Nakanishi and Kahn 1998).

El descubrimiento de nuevos fármacos de origen natural, ha sido por excelencia una tarea ardua y lenta. Esto se debe a que la mayoría de los productos naturales se pueden aislar sólo en pequeñas cantidades y a que poseen estructuras complejas, difíciles de sintetizar y caracterizar. Tratando de resolver este problema, los químicos implementaron la construcción de librerías combinatorias *in-vitro*, a partir de protocolos de síntesis química sencillos. Esta estrategia permite generar colecciones muy grandes de moléculas. Sin embargo, aún a pesar de sus bondades metodológicas, la construcción de librerías combinatorias , no ha logrado igualar la diversidad química y funcional ofrecida por la naturaleza (Petsko 1996).

Antes de iniciar la búsqueda o el diseño de un nuevo fármaco, es necesario identificar un receptor potencialmente involucrado en algún desorden fisiológico (receptor farmacológico) y caracterizarlo bioquímicamente. El siguiente paso es realizar la búsqueda de un ligando específico para este receptor, mediante ensayos de unión. La estructura

tridimensional del receptor, facilita el descubrimiento o diseño de un ligando con potencial terapéutico (Hogan Jr., 1996).

Hasta finales de la década de los sesenta, los compuestos con posible actividad farmacológica, eran ensayados en sistemas de cultivo celular y modelos animales *in-vivo*. Estos métodos eran lentos y la búsqueda no estaba dirigida contra un receptor determinado. Sin embargo, los compuestos seleccionados presentaban propiedades farmacocinéticas y de biodisponibilidad adecuadas (Veber 1997).

Con el nacimiento de la biología molecular, la búsqueda de nuevos fármacos ha cambiado radicalmente de estrategia. Los proyectos de secuenciación genómica, han permitido identificar biomoléculas novedosas como posibles receptores farmacológicos (Veber *et al.*, 1997). A partir de esta información, se ha determinado la estructura tridimensional de más de 4000 macromoléculas, muchas de las cuales han sido identificadas como blanco para el diseño de nuevos fármacos (Blundell 1996).

Estudios estructurales de la interacción ligando-receptor han permitido afinar las cualidades terapéuticas de algunos ligandos (Blundell 1996; Hubbard 1997; Nisbet and Moore 1997). Durante la última década, el diseño de fármacos a partir de información estructural cobró varios frutos y se consolidó como la estrategia preferida para el descubrimiento de nuevos fármacos. Un ejemplo relevante es el desarrollo de varios inhibidores de la proteasa del virus de inmunodeficiencia humana VIH (Revisado por Veber *et al.*, 1997; Wilken and Kent 1998; DeGrado and Summa 1999).

1.2.- Características de los Compuestos Bioactivos.

Las interacciones entre un ligando y su receptor, son en su mayoría de carácter hidrofóbico. Debido a esto, los compuestos que se unen como ligandos o inhibidores a receptores o enzimas, tienden a ser hidrofóbicos (Baxter 1997). En ambientes acuosos, las moléculas conformacionalmente flexibles tienden a adquirir conformaciones que reducen la hidrofobicidad de su superficie externa. A este fenómeno se le llama "colapso hidrofóbico". Como consecuencia, las moléculas con potencial terapéutico deben poseer una conformación restringida y así evitar este fenómeno. Por definición, cualquier molécula cuya estructura presenta restricciones conformacionales y además tiene regiones

hidrofóbicas en su superficie se dice que tiene una "estructura privilegiada". Esta premisa ha sido tomada con éxito como punto de partida para el desarrollo de nuevos fármacos, por varios laboratorios tanto en la academia como en la industria (Baxter 1997).

De hecho, la mayoría de los fármacos, y en especial los que se administran por vía oral, poseen un perfil de atributos físico-químicos en su superficie muy semejante y, a grandes rasgos, no son muy diversos químicamente. Esto no debería de sorprender, pues incluso los receptores moleculares de un fármaco (proteínas) no difieren mucho químicamente entre sí, a pesar de su promiscuidad funcional. Muy posiblemente, la necesidad de poseer estabilidad metabólica y un perfil farmacocinético adecuado, restringen las posibilidades estructurales de una molécula bioactiva (Leeson and Rees 1999).

1.3 Biosíntesis de Compuestos Orgánicos.

Los seres vivos han desarrollado la capacidad de producir metabolitos secundarios en respuesta a necesidades específicas y a las contingencias ambientales. El proceso mediante el cual un producto natural es desarrollado, comprende la recombinación al azar y la mutación del material genético existente en un organismo. Esto se traduce en la formación de nuevas enzimas capaces de catalizar la síntesis de compuestos orgánicos novedosos. Cuando uno de estos compuestos orgánicos es de utilidad para el organismo, los genes encargados de su biosíntesis, son retenidos y mejorados mediante modificaciones genéticas posteriores (Verdine 1996). Los productos naturales son sintetizados cada uno por un complejo multienzimático, a partir de una molécula simple (i.e. acetato). Durante este proceso, cada enzima participa de manera distinta en el ensamblaje de una molécula compleja (Nisbet and Moore 1997; Verdine 1996).

1.4.- Toxinas de Origen Animal.

Las toxinas de origen animal, son proteínas aisladas de animales venenosos, que se unen a receptores específicos (i.e. enzimas o canales iónicos), y alteran la homeostasia de procesos biológicos (Trémeau et al., 1995); actúan modulando el potencial

de membrana e interrumpiendo cascadas enzimáticas (Kharrat et al., 1997; Froy and Gurevitz 1998; Ménez et al., 1992). Por lo general, son péptidos estructurados compactos (miniproteínas), estabilizados por 3 o 4 puentes disulfuro y casi siempre difíciles de digerir. Las anémonas de mar, los hongos, las arañas, los alacranes, las serpientes y demás animales ponzoñosos representan una fuente de moléculas (principalmente péptidos) bioactivas, altamente afines y específicas; con potencial terapéutico y biotecnológico (Froy and Gurevitz 1998; Vita 1998). Algunos de estos compuestos ya se han comercializado como medicamentos y otros han servido como molécula líder en el desarrollo de nuevos fármacos (McIntosh et al., 1999; Trémeau et al., 1995; Vita et al., 1998; Vita et al., 1999).

El estudio del veneno de animales ponzoñosos comenzó a principios de este siglo con la identificación de sus componentes tóxicos y el aislamiento de los primeros péptidos bioactivos. Aunque el objetivo inicial era desarrollar medios específicos y eficaces para proteger al hombre contra el piquete y la mordedura de estos organismos; éstas moléculas resultaron ser valiosas herramientas para el estudio de fenómenos fisiológicos (Ménez 1992; Possani 1984).

Las toxinas son únicas en cuanto a los motivos estructurales que adoptan y las modificaciones post-traduccionales que portan. Son miniproteínas globulares ricas en cisteínas y de estructura primaria variable (Dauplais et al., 1997). Muchas de estas moléculas tienen uno o más aminoácidos no ribosomales (aminoácidos distintos a los 20 para los que codifica la naturaleza) y pueden o no tener el carboxilo terminal amidado (Humphrey and Chamberlain 1997). Se ha descrito un péptido glicosilado (Hassani et al., 1999) y uno con un Bromo unido covalentemente (Rigby et al., 1999). Las modificaciones post-traduccionales (ausencia de extremos polares por ciclización del péptido o amidación del extremo carboxilo terminal, enlaces peptídicos en posición cis y presencia de aminoácidos no ribosomales) confieren estabilidad proteolítica y reducen los efectos entrópicos desfavorables en las interacciones ligando receptor (Humphrey and Chamberlain 1997).

Esta diversidad farmacológica se dio por duplicación y subsecuente evolución divergente de una "molécula madre". Análisis genéticos en el alacrán israelita *Leiurus quinquestriatus* (Froy et al., 1999) y en varias especies de moluscos marinos del género *Conus* (Duda Jr and Palumbi 1999), presuponen la existencia de un ancestro común específico que dio

origen a la colección de péptidos que componen el veneno de estos organismos.

1.5.- Inhibidores Peptídicos de Canales de K⁺.

La búsqueda de inhibidores peptídicos de canales de K⁺, es actualmente un área muy activa (García et al., 1999). De las secreciones de animales ponzoñosos, tales como serpientes, insectos, arañas, y alacranes se han aislado herramientas moleculares muy valiosas para el estudio bioquímico de canales de K⁺ (Gendeh et al., 1997). Recientemente, los organismos ponzoñosos de origen marino han llamado la atención por la compleja farmacología de sus venenos. En 1996 Terlau y colaboradores, identificaron en el veneno del molusco *Conus purpurascens*, la primer toxina peptídica inhibidora de canales de K⁺, procedente de un organismo marino. Recientemente, las anémonas de mar han atraído la atención por ser el primer animal marino del cual se han aislado toxinas que bloquean canales de K⁺ (Revisado por Gendeh et al., 1997). Estas toxinas varían en el tipo de canal que bloquean. Algunas se unen a canales de K⁺ dependientes del voltaje: las dendrotoxinas aisladas del veneno de la serpiente Mamba (revisado por Harvey and Anderson 1991), el péptido degranulador de mastocitos (MCD), aislado del veneno de la abeja *Apis mellifera* (Bidard et al., 1987 citado por Harvey and Anderson, 1991) y toxinas de alacrán como la noxiustoxina, aislada del veneno del alacrán *Centruroides noxius* (Carbone, et al., 1982; Possani et al., 1982). Otras bloquean canales de K⁺ activados por Ca²⁺, tales como la apamina, aislada de la abeja europea (Hughes, et al., 1982 citado por Harvey and Anderson, 1991) y la caribdotoxina, aislada del veneno del alacrán Israelita *Leiurus quinquestriatus* (Miller et al., 1985b).

1.6.- Toxinas Aisladas de Alacrán.

Los alacranes son un grupo de animales antiguo y con una distribución muy amplia sobre la faz de la tierra. Su historia comprende más de 400 millones de años, durante los cuales han sufrido cambios mínimos en su morfología (Possani et al., 1999; Froy et al., 1999). No obstante, han desarrollado una maquinaria farmacológica eficiente (veneno), acompañada de una estrategia

de picadura, que le permite envenenar a su presa o enemigo (Froy et al., 1999). Pertenecen a la clase *Arachnida* y al orden *Scorpionidae*. Existen aproximadamente 1500 especies, agrupadas en 6 familias. Los alacranes peligrosos para el hombre pertenecen a la familia *Buthidae* (Possani 1984; Possani et al., 1999b).

Desde su aparición en la tierra, el veneno de los alacranes ha estado expuesto a presión evolutiva. Debido a esto, cada alacrán ha acumulado diferentes genes que codifican para una gran diversidad de toxinas (Bougis et al., 1989). De hecho, el veneno de cada alacrán, es una mezcla de más de una familia de toxinas homólogas con diferencias en su toxicidad y sus propiedades de unión a su receptor blanco (Li et al., 1998). Estas diferencias están supeditadas a variaciones en la secuencia de aminoácidos y muy posiblemente al patrón de cisteínas entre cada toxina.

Las toxinas de alacrán aisladas hasta el momento, son péptidos básicos, que conservan un mismo patrón de puentes disulfuro y un arreglo conformacional muy similar. Son moléculas con una longitud de 29-70 aminoácidos, 6-8 cistinas y una estructura compuesta por 3 hojas beta y una hélice alfa (Bontems, F. et al., 1991; Revisado por Possani et al., 1999a ; Vita 1998).

Es muy probable que el incremento en la toxicidad dentro de cada familia de péptidos, este asociado a la adquisición de una carga neta positiva en la superficie de la molécula. De hecho, este es un requisito físico necesario, para la interacción toxina-receptor (Li et al., 1998). Esta hipótesis fue propuesta y demostrada por Li y colaboradores (1998), cuando aislaron tres toxinas altamente homólogas del veneno del alacrán *Buthus martensii*-Karsch. Una de estas toxinas, BmK M8 con punto isoeléctrico (pI) de 5.30 y sin actividad; otra, BmK M4 con un pI de 7.53 y actividad mínima; y una tercer toxina, BmK M1 con un pI 9.01 y capaz de bloquear corrientes iónicas.

En una segunda aproximación al problema, Li y colaboradores (1998), determinaron la secuencia nucleotídica y clonaron los genes correspondientes a estas tres toxinas. Con este trabajo demostraron que estos péptidos son el producto de genes diferentes. Este grupo de investigadores propuso que la existencia de toxinas inactivas y relativamente acídicas, es un vestigio de las primeras etapas en la evolución del veneno. Dicho de otra forma, durante el proceso de evolución del veneno, fueron apareciendo múltiples isoformas de una molécula, hasta el

punto en que surgió la isoforma con el pI y la toxicidad máxima (Li et al., 1998).

El veneno de alacrán se obtiene para su estudio, por estimulación eléctrica o maceración del telson. En él, las toxinas de naturaleza peptídica representan la familia de componentes más importante (Possani et al., 1984). En general son ligandos específicos de canales iónicos de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- presentes en la membrana de células excitables y no excitables (Possani et al., 1999b; Froy et al., 1998).

Las toxinas específicas para canales de Na^+ fueron las primeras en describirse, debido a su importancia médica (Caterall 1977; Caterall 1980; Miranda 1970). Estas toxinas actúan interrumpiendo el mecanismo de compuerta de los canales de Na^+ y alterando la permeabilidad de la membrana (Caterall 1995). Se han descrito cuatro tipos de toxinas contra canales de Na^+ : las denominadas 1) alfa (depresoras) y 2) beta (excitatorias), que actúan específicamente contra tejido de mamíferos; 3) las que son específicas para crustáceos; y 4) las que actúan preferencialmente contra insectos (Revisado por Possani et al., 1999a).

La toxina denominada clorotoxina ha sido el único péptido de origen natural específico para un canal de Cl^- . Esta toxina fue aislada del veneno del alacrán *Leiurus quinquestriatus* (Debin et al., 1993).

Hasta hace 20 años, no existía un solo inhibidor peptídico de canales de K^+ . Hoy en día, las toxinas que bloquean canales de K^+ , son las más estudiadas y la mayoría se han aislado del veneno de distintos alacranes venenosos (Miller 1995a).

En 1982, Possani y colaboradores, aislaron del veneno del alacrán mexicano *Centruroides noxius*, el primer inhibidor peptídico de canales de K^+ , y lo bautizaron con el nombre de noxiustoxina. Tres años después, el grupo de Miller (1985b) aisló del veneno del alacrán israelita *Leiurus quinquestriatus*, el péptido caribdotoxina, también capaz de inhibir corrientes iónicas de K^+ . Pronto se aislaron una gran cantidad de péptidos contra canales de K^+ , de tal forma que actualmente se cuenta con la secuencia de aminoácidos completa de aproximadamente 49 péptidos (Revisado por Possani et al., 1999b). Actualmente se cuenta con una clasificación sistemática de estas toxinas, a las que se decidió llamar toxinas alfa-K por convención (Miller 1995a; Selisko et al., 1998; Tytgat et al., 1999).

La toxina caribdotoxina, es el péptido más estudiado hasta el momento (Possani 1999b). Ha sido utilizada como herramienta molecular para determinar la topología y las dimensiones de la región formadora del poro, en los canales de K^+ (Goldstein et al., 1994; Hidalgo and MacKinnon 1995; MacKinnon 1991; MacKinnon and Miller 1988).

1.7 Mecanismo de Acción del Veneno de Alacrán.

Todos los venenos estudiados hasta el momento, actúan alterando la actividad neuronal, propiciando disparos nerviosos repetitivos y una depolarización prolongada (Miller 1995a).

Según los datos farmacológicos con los que se cuenta hasta el momento, las toxinas que inhiben canales de Na^+ , actúan uniéndose preferencialmente al estado abierto del canal (Catterall 1977; Catterall 1980; Miranda 1970). Esto quiere decir que las toxinas contra canales de Na^+ , necesitan que la célula esté depolarizada, antes de unirse a su receptor. Las toxinas alfa-K, por su parte, se unen indistintamente al estado cerrado y abierto de los canales de K^+ (MacKinnon and Miller 1988; Revisado por Miller 1995a). En palabras de Miller (1995a), las toxinas alfa-K actúan como iniciadoras del envenamiento, pues al inhibir la corriente de iones K^+ , depolarizan la membrana. Bajo estas condiciones, los canales de Na^+ se abren, permitiendo la unión de la mayoría de las toxinas presentes en el veneno, las toxinas inhibitoras de canales de Na^+ (Miller 1995a).

2.1 Síntesis Química de Polipéptidos.

Las proteínas son el producto funcional de los genes y participan como componentes activos de todos los fenómenos biológicos. Debido a esto, entender la estructura y la función de estas moléculas, es un objetivo muy importante para la investigación biomédica actual (Wilken and Kent 1998). En 1838, el químico Alemán Gerardus Mulder, le dió el nombre de proteína al componente químico principal de la materia celular (Axley 1998). La función de una proteína puede ser estructural o dinámica. Las funciones dinámicas de una proteína son : transporte, control metabólico, contracción y catálisis. Las

proteínas cuya función es estructural, confieren estructura y forma; son componentes de membrana y en organismos superiores, forman la matriz de los huesos y del tejido conectivo (Schultz and Liebman 1997).

Las enzimas y demás proteínas bioactivas, se obtienen de la naturaleza en concentraciones muy bajas; esto ha dificultado el descubrimiento y la purificación de proteínas novedosas (Misawa and Kumagai 1999). Sin embargo, los proyectos de secuenciación genómica, han permitido conocer la estructura primaria de más de 100,000 proteínas, sin tener que purificarlas. A partir de esta información, la síntesis química y/o la expresión de estas moléculas han permitido obtener cantidad suficiente de nuevas proteínas para estudiar su estructura y función (Tatusov et al., 1997; Veber 1997).

Durante mucho tiempo, la síntesis química de moléculas proteicas, ha sido objeto de interés para los científicos interesados en estudiar las bases moleculares de la función proteica (Revisado por Wilken and Kent 1998). La introducción de grupos químicos artificiales a la estructura covalente de una proteína, permite resolver preguntas inherentes a la función de estas y a la actividad enzimática (Gibney et al., 1997; Hackeng et al., 1999). Esto se ha logrado mediante dos estrategias: la síntesis química de proteínas por el método de la fase sólida (SPFS) (Merrifield 1963) y la traducción *in-vitro* con tRNA modificados (Noren et al., 1989).

Por cuestiones prácticas, la SPFS ha sido la estrategia más utilizada (Fitzgerald and Kent 1998). Hasta hace poco, la metodología de la SPFS permitía obtener péptidos de 60 aminoácidos como longitud máxima. Recientemente Dawson y colaboradores (1994), desarrollaron una estrategia de síntesis química denominada ligación química nativa (native chemical ligation), la cual permite obtener polipéptidos hasta de 200 aminoácidos. Hoy en día, se sintetizan de manera rutinaria, péptidos con un tamaño entre 3,000 y 10,000 Daltons (Hruby and Meyer 1998).

La síntesis química de péptidos comenzó en la década de los treinta con el trabajo de Emil Fischer, quien pretendía sintetizar químicamente moléculas que tuvieran propiedades de "albumosas" (proteínas) (Kent 1988). Los primeros logros en la historia de la síntesis química de proteínas, fueron la obtención de las enzimas ribonucleasa (Gutte and Merrifield

1971) e insulina (Seber et al., 1974). La era moderna en la síntesis química de péptidos y proteínas comenzó en la década de los cincuenta, cuando el descubrimiento de péptidos bioactivos de origen natural estimuló el desarrollo de nuevos métodos sintéticos (Kent 1988).

La síntesis química de péptidos tiene aplicaciones importantes en el estudio de péptidos bioactivos, ya que permite realizar estudios de caracterización química/estructural y desarrollar péptidos con potencial terapéutico modificando sistemáticamente su estructura (Kent 1988; Hruby and Meyer 1998). La síntesis química por el método de la fase sólida fue implementada por Merrifield (1963), en un esfuerzo por resolver las dificultades metodológicas que había en aquella época para sintetizar químicamente péptidos en solución. Merrifield decidió acoplar el aminoácido correspondiente al extremo carboxilo-terminal del péptido en cuestión a un polímero insoluble y hacer crecer la cadena de aminoácidos en dirección del extremo amino-terminal.

La SPFS ofrece claras ventajas en comparación con el método clásico de síntesis en solución, ya que permite automatizar el proceso (Clark-Lewis et al., 1986); elimina los problemas de solubilidad y minimiza las reacciones colaterales (Sakakibara 1999). El esquema general de SPFS se describe a continuación. Lo que abajo se escribe, es un resumen de la información más importante que se ha reportado hasta el momento. (ver las revisiones, donde se describe la metodología de la SPFS: Stewart and Young 1984; Kent 1988; Arherton and Sheppard 1989; Fields and Noble 1990; Gibney et al., 1997; Wilken and Kent 1998; Barlos and Gatos 1999).

El soporte insoluble más utilizado es un polímero sintético, poliestireno entrecruzado al 1% (copolímero de estireno con divinilbenceno al 1%) con grupos reactivos (X) funcionalizados por clorometilación de los grupos bencilo. (o bencilamida si se desea un péptido amidado) del polímero. El aminoácido correspondiente al extremo carboxilo-terminal del péptido a sintetizar se acopla (previamente activado en forma de éster o de anhídrido simétrico) a los grupos reactivos del soporte insoluble. A partir de este primer aminoácido se hace crecer la cadena polipeptídica, adicionando un aminoácido tras otro de manera secuencial. Como la cadena polipeptídica permanece anclada al soporte insoluble a lo largo de toda la reacción, los productos de reacción indeseables y los solventes

son eliminados por filtración entre cada paso de la síntesis. Finalmente, el producto deseado es liberado del soporte sólido, purificado y caracterizado químicamente.

Para dirigir la reacción, los aminoácidos utilizados en SPFS son convertidos a un derivado en el que el grupo funcional amino es protegido por un grupo selectivamente lábil (L). Este grupo es removido cada que se acopla un nuevo aminoácido, mediante una reacción de desprotección. Además, si el aminoácido tiene un grupo funcional reactivo en la cadena lateral, éste se protege también con un grupo selectivamente lábil (S), diferente a L. Los grupos protectores L y S deberán ser lábiles en condiciones distintas. Esto quiere decir que si L es lábil en condiciones básicas, los grupos S utilizados en cada aminoácido deberán ser lábiles en condiciones ácidas. El grupo protector L es removido entre el acoplamiento de un aminoácido y otro. Mientras que el grupo protector S es estable a lo largo de toda la reacción, pero lábil a las condiciones en que el péptido completo es liberado del soporte insoluble, cuando ya no es necesario proteger las cadenas laterales de los aminoácidos altamente reactivos.

Para lograr un buen rendimiento de reacción y obtener un péptido homogéneo, es necesario que las reacciones de acoplamiento y desprotección sean casi del 100% en cada paso de la síntesis y que tanto el grupo protector S de las cadenas laterales como el enlace que une el soporte sólido al péptido sean estables a las condiciones de reacción a lo largo de toda la síntesis.

En el esquema clásico propuesto por Merrifield (conocido como SPFS-*tert*-butiloxicarboxilo (Boc), el grupo protector L es Boc, lábil al ácido trifluoroacético (TFA) al 25% en diclorometano y el grupo protector S es un grupo benciloxicarbonilo, lábil al ácido fluorhídrico líquido. Esta estrategia inicial ha sido ampliamente utilizada. Debido a que los enlaces peptídicos y los grupos protectores no son del todo estables bajo las condiciones de reacción establecidas inicialmente (acidólisis), ha sido necesario buscar grupos protectores más estables y condiciones de reacción donde sean mínimas las reacciones colaterales.

Hacia el final de la década de los setenta, se logró establecer una nueva estrategia de síntesis química de péptidos basada en la premisa inicial de SPFS. En ésta nueva estrategia, denominada SPFS-9-Fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), el grupo protector L es Fmoc y la reacción de desprotección es en

condiciones básicas (utilizando piperidina al 20-50% en dimetilformamida. Aunque SPFS-Fmoc es actualmente la estrategia más utilizada para la síntesis química de péptidos, se han seguido planteando modificaciones a la propuesta inicial. Así, tratando de mejorar rendimientos de la reacción, homogeneidad del producto final y disminuir las reacciones colaterales; existen en el mercado distintos grupos protectores para cada aminoácido así como soportes sólidos con distintas propiedades

2.2 Plegamiento de Proteínas.

Las proteínas pueden considerarse gigantes semicristalinos, que se agrupan en familias por similitud de su secuencia de aminoácidos (Baldwin 1999). Actualmente se calcula que hay aproximadamente 1000 familias de proteínas y un número menor de patrones de plegamiento (Brenner et al., 1997; Chothia 1992).

Tan sólo en el genoma humano existen aproximadamente 100,000 secuencias de proteína. Antes de poseer actividad biológica, estas moléculas deben plegarse y adquirir una estructura estable (Dobson and Karplus 1999; Baldwin 1999). En las proteínas, la actividad biológica y la estabilidad conformacional dependen principalmente de interacciones no covalentes: interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y puentes salinos. En algunas proteínas existen puentes disulfuro que también participan en la estabilidad conformacional (Creighton et al., 1995; Tam et al., 1991). La información requerida para que una proteína se pliegue está distribuida a lo largo de la secuencia de aminoácidos y se traduce como un complejo de interacciones químicas diversas, cada una con su propia contribución energética (DeGrado and Summa 1999). En general, los residuos hidrofóbicos desempeñan un papel energético, actuando como fuerza motriz en la estructuración del polipéptido (Kellis Jr. et al., 1998; Bryson et al., 1995, citados por DeGrado and Summa 1999). Los aminoácidos polares por su parte, contribuyen a la especificidad conformacional, generalmente a expensas de la estabilidad termodinámica (Cordes 1996, citado por DeGrado and Summa 1999).

En cuanto una molécula de mRNA ha sido traducida, el producto (una proteína) adquiere su conformación nativa. La cual por lo general, es el estado de menor energía libre (Gibney et al., 1997). Dentro de una célula, el plegamiento de una proteína

se da dentro de un ambiente con altas concentraciones iónicas (i.e. Glutación, iones H^+ , etc) y moleculares (i.e. ATP, disulfuro isomerasa y chaperonas). Estos factores participan en el control y localización del proceso, más no proveen la información conformacional para el plegamiento adecuado (Creighton et al., 1995; Dobson and Karplus 1999). Algunas proteínas pueden plegarse en ausencia de los factores celulares mencionados arriba. Esto ha permitido estudiar *in-vitro*, el mecanismo de plegamiento de algunos polipéptidos. Una reacción de plegamiento *in-vitro*, consiste en diluir una proteína previamente desnaturalizada hasta obtener una concentración en la que el polipéptido es soluble y no se agrega (Editorial, Nat. Struct. Biol., 1999).

En 1973, Afinsen demostró que los enlaces disulfuro de la ribonucleasa A se forman espontáneamente en presencia de oxígeno y concluyó que la información conformacional se encuentra en la secuencia de aminoácidos de cada proteína. Dicho lo anterior, una proteína navega a través de un complicado "espacio energético" y como consecuencia explora varias posibilidades de conformación física antes de adquirir la estructura terciaria deseada (Wolynes et al., 1995). Una consecuencia inmediata de la afirmación anterior es que el número de conformaciones posibles para cualquier polipéptido resulta astronómicamente grande y el tiempo necesario para concluir el plegamiento resulta infinito. Levinthal sugirió esta contradicción hace 30 años, conocida ahora como "la paradoja de Levinthal" (Dobson and Karplus 1998).

Ahora está claro que la evolución encontró la manera de evadir "la paradoja de Levinthal": cada proteína sigue un mecanismo específico de plegamiento supeditado por su secuencia de aminoácidos. Antes de plegarse, una proteína transita a través de dos o más estados intermediarios estructuralmente definidos hasta completar su estructura nativa. La existencia de intermediarios específicos disminuye el espacio de secuencia ocupado por la proteína y evita la "paradoja de Levinthal" (Dobson and Karplus 1999).

Un problema importante en el estudio del plegamiento de proteínas ha sido la identificación de elementos críticos en la estructura primaria de una proteína que codifican para el plegamiento funcional (Schulma et al., 1996). Como regla general, las proteínas que se pliegan lentamente acumulan agregados de transición; mientras que las proteínas que se

pliegan rápidamente no lo hacen (Silow et al., 1997). La velocidad con que una proteína se pliega depende de la acumulación de agregados transitorios a lo largo de la reacción (Silow et al., 1997). Esto se debe a que cada agregado transitorio representa un estado termodinámico separado de los demás estados intermediarios por transiciones de fase de primer orden (Peng and Kim 1994).

Las proteínas pequeñas (< de 90 aminoácidos) suelen plegarse rápidamente mediante un mecanismo de dos estados (two-state process), sin intermediarios de por medio (Silow et al., 1997). Las proteínas grandes por su parte, siguen un mecanismo específico de reacción pasando por dos o más estados de transición. Se ha propuesto que antes de plegarse, una proteína debe pasar por un mínimo de dos estados termodinámicos: el primero, llamado glóbulo derretido (molten globule) es compacto, presenta un núcleo hidrofóbico y tiene estructura secundaria semejante a la nativa. Su estructura es flexible y carece de interacciones terciarias específicas. El segundo estado es la proteína nativa, tiene una estructuración estable e interacciones terciarias específicas (estructura funcional) (Matthews 1993; Ptitsyn 1995b). El glóbulo derretido es un intermediario cinético universal en el plegamiento de proteínas. Este intermediario es el primero en formarse en todas las proteínas y representa un estado termodinámico en equilibrio con los demás estados de transición (Ptitsyn 1995a).

2.3 Papel de los Puentes Disulfuro en el Plegamiento.

En la célula, existen enzimas encargadas de añadir grupos funcionales o de formar enlaces covalentes intra e intermoleculares en las proteínas recién expresadas. Estas modificaciones se conocen como modificaciones post-traduccionales. La más común es la formación de uno o más puente(s) disulfuro (Alberts et al., 1994). La presencia de puentes disulfuro en una proteína le confiere características topológicas intrínsecas a la molécula. La estructura topológica de una cadena polipeptídica está dada por el patrón de conexiones covalentes de la molécula (Benham et al., 1993). La formación de puentes disulfuro entre dos cisteínas es un

elemento estructural clave para proteínas y péptidos secretados. Los puentes disulfuro son abundantes en hormonas, enzimas, proteínas plasmáticas, inhibidores y toxinas. Los dominios extracelulares de algunas proteínas transmembranales presentan puentes disulfuro. Al menos para el caso de proteínas pequeñas (miniproteínas), la formación adecuada de puentes disulfuro determina la actividad biológica (Gray 1993). Cuando están presentes, los puentes disulfuro promueven el plegamiento de las proteínas y estabilizan la estructura terciaria; esto lo hacen restringiendo la flexibilidad conformacional y desestabilizando a la proteína en su estado desplegado (Creighton et al., 1995).

Es necesario aclarar que los puentes disulfuro no determinan la estructura de la proteína, simplemente estabilizan la molécula. Esto explica porque, durante el plegamiento de un polipéptido, la conformación de los intermediarios que aún no han formado el patrón correcto de puentes disulfuro, es muy semejante a la conformación de la estructura nativa. Los efectos estabilizadores no sólo son entrópicos, el efecto de un puente disulfuro en particular depende de su papel en el estado nativo de un polipéptido. (Creighton et al., 1995). Un polipéptido con más de dos cisteínas es capaz de tener varias conformaciones. Se ha visto que el arreglo correcto de puentes disulfuro está supeditado a la información codificada por la estructura primaria de un polipéptido (Tamaoki et al., 1998).

2.4 Miniproteínas.

Por duplicación genética y subsecuente evolución divergente, la naturaleza ha diseñado pequeñas proteínas, toxinas e inhibidores de proteasa disímiles en su secuencia de aminoácidos pero con topología similar y que son capaces de adoptar una estructura estable y biológicamente activa (Tamaoki et al., 1998; Froy et al., 1999). Cada una de estas moléculas tiene una estructura particular definida y se une a un receptor biológico con alta afinidad y especificidad. En todas estas moléculas existe un motivo estructural común que sirve como un andamio capaz de acomodar una secuencia específica en una conformación determinada y presentarla adecuadamente al receptor biológico (Vita et al., 1995). Estas moléculas son compactas y estructuralmente estables. Presentan un arreglo conformacional definido por alfa-hélices y/o hojas beta. Debido a esto, Heitz y

colaboradores (1999), decidieron llamarlas miniproteínas. El número de motivos estructurales distintos que presentan es muy pequeño. Existen dos explicaciones al respecto: 1) como son moléculas pequeñas, el número de arreglos conformacionales posible es mínimo (Heitz et al., 1999); y 2) independientemente de su tamaño, la preservación a lo largo de la evolución de motivos estructurales específicos en proteínas con diversas funciones y distinto origen taxonómico representa una ventaja estructural (Froy and Gurevitz 1998).

A través de la evolución se han conservado dos motivos estructurales específicos en miniproteínas, cuya función biológica y origen taxonómico son bastante disímiles (Tamaoki et al., 1998, Froy et al., 1999; Vita et al., 1995). Gama-tioninas en plantas, defensinas aisladas de insectos y toxinas aisladas del veneno de alacrán, abeja, araña, serpiente y anémona de mar; comparten las siguientes propiedades: 1) actúan modificando el potencial de membrana; 2) tienen un patrón de cisteínas común; 3) tienen una organización genómica similar (Tamaoki et al., 1998, Froy et al., 1999, Narasimham et al., 1994).

Estos polipéptidos difieren entre sí en su peso molecular, en su estructura primaria y en menor grado en su estructura terciaria (Tamaoki et al., 1998, Froy et al. 1999). Sin embargo, por comparación de su estructura primaria se han observado sólo dos tipos de orientación en el patrón de cisteínas (Froy O. et al., 1999, Narasimham L. et al., 1994): 1) "hélice estabilizada por cistinas", en inglés cystine-stabilized helix (CSH) (Tamaoki et al., 1998); y 2) "nudo de cistinas" u "hoja Beta estabilizada por cistinas", en inglés "inhibitor cystine knot" (ICK) o "cystine-stabilized Beta-sheet" (Norton and Pallaghy 1998; Heitz et al., 1999) (ver figura 1).

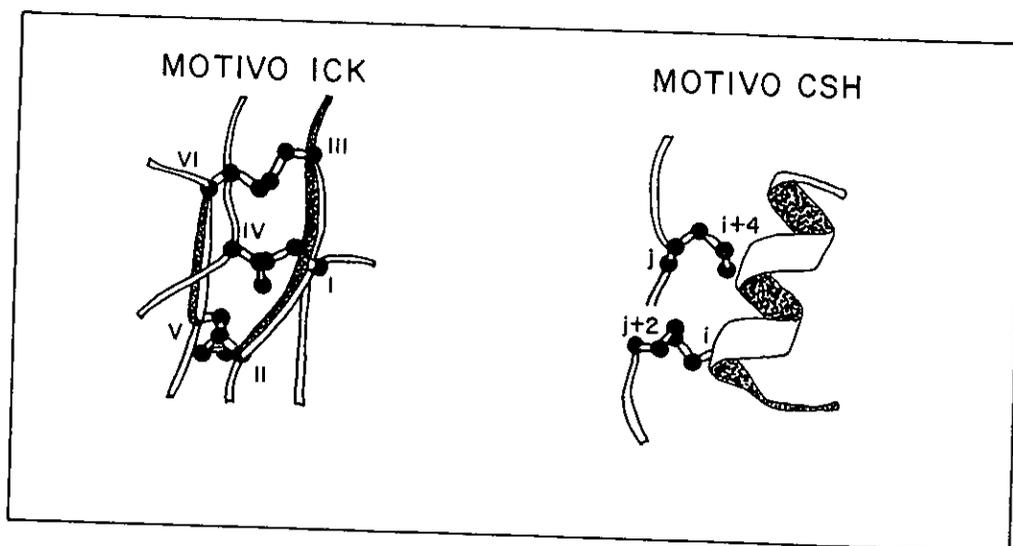
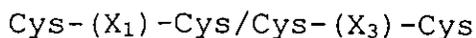


Figura 1. Motivos estructurales descritos hasta el momento para péptidos de origen natural. Como se menciona en el texto, en la figura se observa que la diferencia entre los dos motivos estructurales es el patrón de puentes disulfuro; y en menor grado, el arreglo conformacional.

2.5 Hélice Estabilizada por Cistinas.

Las miniproteínas que adoptan este motivo estructural son: Gama-tioninas en plantas, defensinas aisladas de insectos y toxinas aisladas del veneno de alacrán, abeja, serpiente y endotelinas de humano (Tamaoki et al., 1998; Froy et al., 1999; Narasimham et al., 1994). El patrón de cisteínas en la estructura primaria es el siguiente:



Donde el asa "loop" que separa las cisteínas de en medio varía entre una miniproteína y otra, X puede ser cualquier aminoácido y el subíndice indica el número de residuos. Un

segmento de alfa-hélice que atraviesa la porción de secuencia Cys-(X₃)-Cys, está conectada covalentemente por dos puentes disulfuro a la porción de secuencia Cys-(X₁)-Cys que es parte de una hoja-beta (ver figura 1). Por lo general existe un tercer o hasta un cuarto par de cisteínas, pero este puede ser reemplazado por interacciones hidrofóbicas en la molécula (Drakopoulou et al., 1998; Tamaoki et al., 1998). Froy y colaboradores (1998) han observado que cuando se compara la secuencia nucleotídica de toxinas de origen distinto pero con propiedades farmacológicas similares, la similitud en los intrones y en la región codificante es mayor que cuando la comparación es entre secuencias de toxinas con distintas propiedades farmacológicas.

2.6 Nudo de Cistinas.

Son también miniproteínas globulares ricas en cisteínas y con un origen filogenético y actividad biológica bastante diverso, las cuales se han aislado de araña, plantas, hongos, anémonas de mar y moluscos del género *Conus*. Estas miniproteínas actúan inhibiendo canales iónicos dependientes de voltaje permeables a K⁺ y Ca²⁺, enzimas proteolíticas (tripsina y carboxipeptidasa) (Pallaghy et al., 1994; Tamaoki et al., 1998). Esencialmente, el nudo de cistinas comprende un anillo formado por dos puentes disulfuro, a través del cual pasa el tercer puente disulfuro (ver figura 1). El motivo estructural ICK comprende una triple hoja-beta antiparalela estabilizada por tres puentes disulfuro. El patrón de cisteínas a lo largo de la secuencia es el siguiente:

CX₃₋₇CX₃₋₆CX₀₋₅CX₁₋₄CX₄₋₁₃C

A diferencia del motivo CSH, en el motivo ICK la similitud va más allá de una simple semejanza topológica; pues la posición de las cisteínas está supeditada al patrón de puentes hidrógeno en cada miniproteína (Norton and Pallaghy 1998; Tamaoki et al., 1998). La topología del motivo ICK es Beta-Alfa-Beta-Beta, donde el segmento Alfa sufre torsión por la presencia de helices-3₁₀.

2.7 Potencial Biotecnológico de las Miniproteínas.

La estrategia tradicional para generar *de-novo* una proteína con actividad biológica es modificar proteínas preexistentes por

mutagénesis exhaustiva (Vita 1997). Es posible generar inhibidores, antagonistas o agonistas de procesos biológicos claves y/o de interés terapéutico, mimetizando la superficie de interacción entre las proteínas participantes en el fenómeno. Estudios recientes de interacciones hormona-receptor indican que, a pesar del gran número de residuos presentes en la superficie de interacción proteína-proteína, la energía de unión está dada por pocos grupos funcionales (Vita 1998). Una manera muy atractiva de diseñar nuevas moléculas es utilizar un andamio proteico, (miniproteína) como templado y conferirle actividad *de-novo* añadiendo fragmentos de reconocimiento (Heitz et al., 1999). A partir de esta premisa, se han diseñado andamios estructurales artificiales con una estructura estable preestablecida y propiedades químicas y funcionales similares a las de las proteínas (peptidomiméticos) (Dawson and Kent 1993; Revisado por Degradó and Summa 1999; Nakanishi and Kahn 1998; Zhang and Tam 1997). Sin embargo, las miniproteínas de origen natural representan un candidato *a-priori* como andamio estructural, debido a que son ricas en cisteínas y la energía de estabilización está dada primordialmente por los puentes disulfuro. Esto permite variar la secuencia de aminoácidos a lo largo de toda la molécula, sin desestabilizar la estructura (Vita et al., 1995; Vita 1998; Zinn-Justin et al., 1996).

2.8 Canales Iónicos.

Los fisiólogos siempre han sabido que los iones desempeñan un papel importante en la excitabilidad de nervio y músculo (Hille 1992). A principios de este siglo, Julius Bernstein propuso atinadamente que las células excitables están rodeadas por una membrana permeable a iones potasio (K^+), cuando se encuentra en estado de reposo; y permeable a iones calcio (Ca^{2+}) y sodio (Na^+), cuando se encuentra en estado de excitación. Esta propuesta, conocida como la "Hipótesis de Membrana" explica que el potencial de reposo de nervio y músculo es generado por la tendencia que tienen los iones positivos a difundir hacia fuera o dentro del citoplasma siguiendo un gradiente de concentración (Hille 1992; Alberts et al., 1994).

Los canales iónicos son poros macromoleculares presentes en todas las membranas celulares; se ignora el inicio de su evolución y el papel que pudieran haber tenido en las formas de vida primigenias (Hille 1992). Desde el punto de vista funcional, los canales iónicos insertados en membranas, son

proteínas extremadamente eficientes (Heginbotham 1999). Los canales iónicos tienen un mínimo de tres estados conformacionales: abierto, cerrado e inactivado. La apertura, el cierre y la inactivación de éstas moléculas obedece señales específicas representadas por ligandos, cambios en el potencial de membrana o presión mecánica ejercida sobre la célula (Changeux and Edelstein 1998; Heginbotham 1999; Hille 1992; Tierney and Stowell 1998). Una vez abiertos, los canales iónicos son capaces de transportar selectivamente un ion específico a una velocidad que alcanza el límite de la difusión libre (10^7 iones/ s^{-1}). La corriente generada por los iones que atraviesan un canal es medible y tiene un efecto directo sobre el potencial de membrana; esto ha permitido el estudio de los canales iónicos en tiempos reales y a nivel de una sola molécula (Hille 1992; Heginbotham 1999).

El estado de excitación de una célula depende de su potencial de membrana. Esto es, de la diferencia en el potencial eléctrico dentro y fuera de la célula (Alberts 1994 et al., Hille 1992; Jan and Jan 1994). En una célula excitada, hay salida excesiva de iones K^+ hacia afuera de la célula y una entrada de iones Na^+ y Ca^{2+} al citoplasma; la célula vuelve a su estado de reposo cuando se reajustan las concentraciones iónicas dentro y fuera de la célula (Alberts et al., 1994; Hille 1992). Una célula se excita por activación de canales de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , dependientes de voltaje (CDV) (Catterall 1995); y vuelve a su estado de reposo por activación de los canales de K^+ rectificadores de la corriente entrante, CPRE (o de corriente anómala) (Nichols and Lopatin 1997) y de dos cotransportadores acoplados a la hidrólisis de ATP: bombas Na^+/K^+ ATPasa y Na^+/Ca^{2+} ATPasa (Alberts et al., 1994). Los canales iónicos dependientes de voltaje (CDV) son los responsables de generar señales eléctricas en membranas celulares de nervio y demás células excitables. (Catterall 1995; Hille 1992). Existen CDV que conducen selectivamente iones Ca^{2+} , Na^+ o K^+ . Durante el período de 1984-1988, se clonaron las primeras subunidades correspondientes a CDV. Estos primeros trabajos demostraron fundamentalmente que los CDV pertenecen a una misma superfamilia de genes y que son multímeros con un patrón estructural semejante (Revisado por Armstrong and Hille 1998). Cada miembro de esta familia de canales está construido a partir de una estructura común, con variaciones específicas determinadas por la función especializada de cada canal (Catterall 1995; Armstrong and Hille 1998). Las subunidades primarias de los CDV selectivos a Ca^{2+} y Na^+ tienen

aproximadamente 200 aminoácidos y se componen de cuatro subdominios homólogos que atraviesan la membrana plasmática seis veces cada uno y se numeran del I al VI (ver figura 2). Los CDV selectivos a K^+ son oligómeros con seis segmentos transmembranales (algunos homo-oligómeros y otros hetero-oligómeros), donde cada subunidad es homóloga a los subdominios presentes en los CDV de Ca^{2+} , Cl^- y Na^+ (Revisado por Armstrong and Hille 1998; Guy and Conti 1990) (ver figura 2). La oligomerización de éstas macromoléculas es un evento de ensamblaje particularmente complejo, pues la composición, estequiometría y posición de cada subunidad es crítica para el funcionamiento adecuado de cada CDV en particular. Una vez ensambladas, estas macromoléculas sufren además modificaciones post-traduccionales: fosforilaciones y glicosilaciones principalmente (Green and Millar 1995).

2.10 Canales de Potasio (K^+).

Los canales de K^+ representan la mayor cantidad de proteínas transmembranales en células excitables y no excitables (Hille 1992). Se encuentran en todas las células, donde contribuyen a la regulación del potencial de membrana (Tudor 1996). Participan en la regulación de múltiples funciones celulares, incluyendo la entrada y salida de sales en células renales y células guardia, la liberación de insulina por células Beta-pancreáticas, la excitabilidad eléctrica, la plasticidad sináptica de células nerviosas y la ritmicidad de los latidos cardíacos (Revisado por Jan and Jan 1994). De acuerdo a su estructura primaria, los canales de K^+ se agrupan en dos superfamilias filogenéticamente distantes: los canales de K^+ dependientes de voltaje (CPDV, mencionados anteriormente) y los canales de K^+ de rectificación entrante (CPRE), o rectificación anómala (Revisado por Jan and Jan 1994).

La actividad de los CPDV (proteínas de membrana con seis segmentos transmembranales, como ya se mencionó) depende intrínsecamente del potencial de membrana (Hille 1992). Estos canales se activan a potenciales de membrana por encima del potencial de reposo (-60 mV) y favorecen el flujo de iones K^+ hacia afuera de la célula (Catterall 1995; Jan and Jan 1994). Los CPRE por otro lado, tienen sólo dos segmentos transmembranales en cada subunidad y son sensibles a cambios en la concentración celular de iones K^+ . La clonación del primer

CPRE (abreviados en la literatura como K_{ir}) dió pauta al descubrimiento de una superfamilia de canales de K^+ con la propiedad funcional de rectificar la corriente entrante: los K_{ir} clásicos, canales de K^+ sensibles al ATP y canales de K^+ activados por receptores muscarínicos. La subsiguiente expresión y el estudio funcional de estas moléculas permitió demostrar que la activación no depende de cambios conformacionales. Sino que más bien, la rectificación anómala es causada por el bloqueo intracelular del canal por poliaminas o iones Mg^{2+} . Este bloqueo depende del voltaje (Nichols and Lopatin 1997). A través de estos canales, la corriente eléctrica fluye hacia adentro de la célula y es casi unidireccional. De esta forma, los CPRE controlan el potencial de reposo sin que haya una pérdida masiva de iones (Hille 1992; Jan and Jan 1994; Nichols and Lopatin 1997).

2.11 Canales de K^+ ERG.

En 1991, el grupo de Ganetzki clonó de *Drosophila* el gene *ether-a-go-go* (*eag*) y demostró que la deficiencia de este gene altera las corrientes de K^+ en células excitables. En presencia de éter, las moscas con este gene mutado sufren disparos nerviosos espontáneos y repetitivos en axones motores de uniones neuromusculares; dando la impresión de que estuvieran bailando a-go-go (Warmke et al., 1991).

El gene *eag* codifica para un polipéptido que comparte similitud de secuencia con varios canales de K^+ , tanto CPDV como CPRE, esta similitud indica *a-priori* que *eag* codifica para un canal de K^+ (Bruggemann et al., 1994). En 1994, Bruggemann y colaboradores expresaron el producto de *eag* y demostraron que EAG es una macromolécula transmembranal sensible al voltaje y al AMP cíclico y que cataliza el flujo de iones K^+ a través de la membrana plasmática. La clonación de análogos de *eag* en *Drosophila*, humano y ratón (*elk*, *herg* y *m-eag* respectivamente), así como el alineamiento de sus secuencias nucleotídicas definió la existencia de una familia multigénica relacionada a *eag*, en *Drosophila* y mamíferos. Los miembros de esta familia conservan un 47% de identidad en las regiones transmembranales y contienen un sitio de reconocimiento a nucleótidos cíclicos. El análisis comparativo de las secuencias indica que esta nueva familia multigénica está relacionada a los canales de K^+ dependientes de nucleótidos cíclicos en vertebrados y a canales de K^+ rectificadores de la corriente entrante en plantas (Warmke and Ganetzky 1994).

El gene identificado en humanos se denominó herg "gene humano homólogo al gene *ether-a-go-go* de *Drosophila melanogaster*" (en inglés, Human *ether-a-go-go* related gene), debido a que no es la contraparte en humanos de eag o elk, pues tiene una secuencia nucleotídica equidistante en relación a los otros tres miembros de la familia eag (47-49% de identidad en la región transmembranal); se piensa que más bien es una tercer rama en la familia (Warmke and Ganetzky 1994). El gene herg mapea en el cromosoma 7 (Itoh et al., 1998) y codifica para el componente rápido de la rectificación tardía (I_{Kr}) involucrada en la repolarización de células cardíacas (Sanguinetti et al., 1996; Miller 1996).

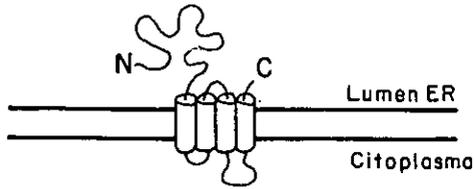
2.12 El Papel del Canal HERG como Receptor Farmacológico.

Para la industria farmacéutica, ha sido difícil identificar y seleccionar receptores biológicos, que sirvan como blanco para el desarrollo de nuevos fármacos. Un receptor farmacológico debe tener las siguientes características: 1) tener una función biológica conocida; 2) contar con un ensayo robusto de unión ligando-receptor, que permita rastrear ligandos con facilidad; y 3) ser accesible a moléculas orgánicas pequeñas, durante un ensayo *in-vivo* (Curran 1998).

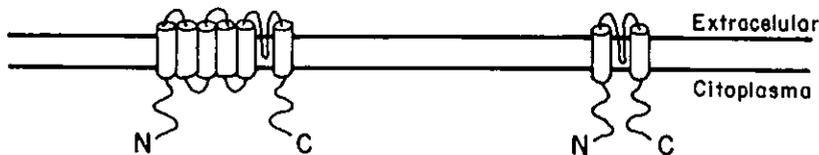
Los canales iónicos presentan estas características y pueden ser considerados receptores farmacológicos (Curran 1998). Bloqueadores específicos de estas macromoléculas, han servido como herramientas moleculares para estudiar la participación de canales de K^+ , Ca^{2+} y Cl^- , en la fisiología de linfocitos T. Estos estudios han permitido la identificación y el diseño de compuestos orgánicos, capaces de suprimir la función de linfocitos T (anti-inflamatorios) (Cahalan and Chandy 1997). Las células glioma (células cancerígenas, desarrolladas a partir de células gliales en cerebro), expresan un canal de Cl^- específico en este tipo celular. La toxina de alacrán Clorotoxina es capaz de inhibir estos canales (Ulrich and Sontheimer 1996). Este péptido, es actualmente utilizado como prueba de diagnóstico, para detectar el desarrollo de gliomas cerebrales y muy posiblemente será utilizado como molécula líder, para el desarrollo de un nuevo anticancerígeno (Soroceanu et al., 1998).

Evidencias farmacológicas indican que los canales de K^+ participan en el ciclo de proliferación celular; principalmente de células cancerígenas (Pardo et al., 1999). En particular, los canales de K^+ pertenecientes a la familia eag, participan en la división de células cancerígenas (Pardo et al., 1999). El canal de K^+ HERG, también es considerado receptor farmacológico. Las propiedades terapéuticas de los antiarrítmicos clase III y algunos fármacos psicotrópicos; así como los efectos cardiotoxicos de los antagonistas del receptor H1, se deben al bloqueo del canal de K^+ HERG por estas moléculas (Tagliatela M. et al., 1998 citado por Bianchi et al., 1998). El gene *herg*, codifica para el componente molecular, responsable de la corriente de K^+ (I_{HERG}). Este canal iónico participa en la excitabilidad cardíaca, regulando la repolarización del potencial de acción (I_{kr}). Mutaciones puntuales del gene *herg*, provocan un tipo de arritmia cardíaca congénita: el síndrome de la onda QT larga (LQT2) (Bianchi et al., 1998; Sanguinetti et al., 1995; Wang et al., 1998). Células cancerígenas de diferentes especies (i.e. humano y murino) y de distinta histogénesis (i.e. neuroblastoma, rabdomiosarcoma, adenocarcinoma, microcitoma pulmonar, tumores pituitarios, insulinoma de células Beta y leucemia monoblástica), expresan en abundancia el canal de K^+ HERG (Bianchi et al., 1996). Células normales, correspondientes a los histotipos mencionados arriba, no expresan el canal HERG; en su lugar, expresan CPRE. Las células cancerígenas en general, presentan un potencial de reposo más depolarizado que el de células normales (-40 mV). Se ha propuesto que esta característica es una prerrogativa esencial en las células destinadas a un crecimiento indefinido (Binngeli et al., 1986 citado por Bianchi et al., 1998). El potencial de membrana de células con un ciclo celular normal, esta regulado por CPRE. La presencia del canal de K^+ HERG y la ausencia de canales CRCE en células cancerígenas, demuestra que HERG es el componente molecular responsable del potencial de membrana en células cancerígenas, esencial para el crecimiento anormal de estas células (Bianchi et al., 1996). Evidentemente, el canal de K^+ HERG es un receptor farmacológico blanco para el desarrollo de anticancerígenos y antiarrítmicos.

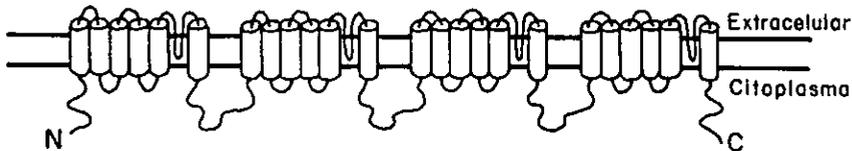
A) Selectivo a neurotransmisores



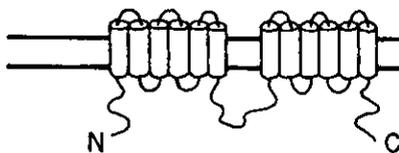
B) Selectivo a Potasio (CPDV) C) Selectivo a Potasio (CPRE)



D) Selectivo a Sodio
Selectivo a Calcio



E) Selectivo a Cloro
Regulador de la
Fibrosis Quística



F) Selectivo a Cloro
Dependiente de
Voltaje

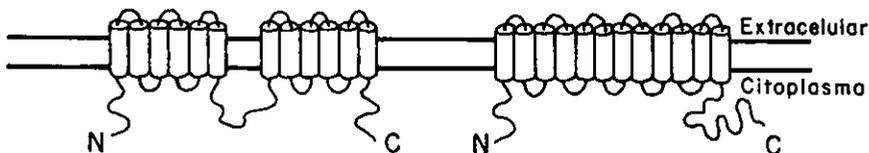


Figura 2. Canales iónicos.

Los canales iónicos pertenecen a una superfamilia de proteínas transmembranales. En la figura se muestra la topología de cada uno de estos canales.

IX.- RESULTADOS:

Los resultados reportados a continuación se dividieron para su presentación en tres incisos:

a) aislamiento y caracterización de ErgTx; b) síntesis química de ErgTx; c) plegamiento de ErgTx

Una parte importante de este trabajo fue publicada en la revista FASEB Journal, vol. 13, pp. 953-962 (1999). Bajo el título: " A toxin to nervous, cardiac and endocrine ERG K⁺ channels isolated from *Centruroides noxius* scorpion venom".

a) Aislamiento y caracterización de ErgTx.

Se demostró que el veneno del alacrán mexicano *Centruroides noxius*-Hoffmann, inhibe la actividad del canal de potasio (K⁺) HERG; posteriormente se identificó y caracterizó un ligando peptídico específico y con alta afinidad para el canal de K⁺ HERG. Las características bioquímicas y la identificación de más de una variante natural de ErgTx en el veneno de *C. noxius*, demuestran que se trata de una familia de péptidos sin precedentes en la literatura. Los ensayos electrofisiológicos se realizaron en el laboratorio del Dr. Enzo Wanke, en la Universidad de Milán, Italia.

a.1 Aislamiento y Purificación.

La estrategia de búsqueda y purificación de ErgTx y sus variantes naturales se describe a continuación.

La fracción soluble del veneno total se separó por exclusión molecular con una columna Sephadex G-50. Aproximadamente 136 mg de la fracción peptídica del veneno total (denominada fracción II) se separó por Cromatografía Líquida de Alta Precisión (CLAP), utilizando una columna FR C-18 semipreparativa y se dividió en 6 fracciones (ver figura 3).

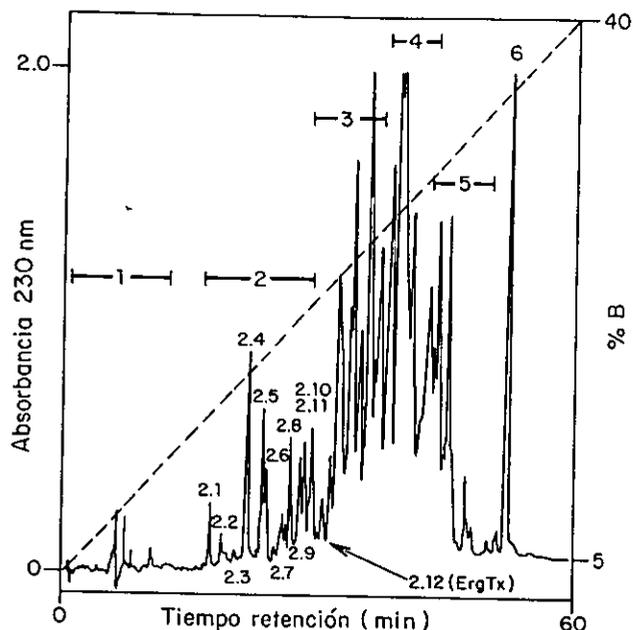


Figura 3. Separación de la Fracción peptídica del veneno por CLAP-FR e identificación de los componentes activos.

Cada fracción fue ensayada contra el canal de K^+ HERG. De las 6 fracciones ensayadas, la segunda inhibió la actividad de HERG. Esta fracción (denominada fracción II-2) se separó por CLAP, utilizando una columna FR C-18 semipreparativa y se dividió en 13 subfracciones denominadas II.(1-13) (ver figura 3). Estas fracciones fueron ensayadas contra el canal HERG. La fracción II.2.12 inhibió completamente la corriente iónica de HERG y dos fracciones, la II.2.8 y la II.2.10 inhibieron el 80% de la corriente de HERG (datos no mostrados). Con el fin de demostrar la especificidad del (los) ligando(s) encontrado (s), la fracción Cn II.2.12 (por ser la fracción más activa) se ensayó también contra los canales de K^+ con mayor parentesco filogenético a HERG: I_{RK1} , I_{KATP} , I_{Ks} y EAG; Cn II.2.12 no inhibió los demás canales de K^+ y por lo tanto es un inhibidor específico del canal HERG.

La fracción fracción II.2.12 se purificó hasta homogeneidad y una vez corroborada su actividad, se bautizó con el nombre de Ergtoxina (ErgTx) (ver figura 4). La pureza fue confirmada por CLAP, utilizando una columna FR C-18 analítica; análisis de aminoácidos y espectrometría de masas. Durante el transcurso de este trabajo, los componentes activos de las fracciones Cn II.2.8 y Cn II.2.10, se lograron purificar hasta homogeneidad. Sin embargo, su caracterización bioquímica (secuencia de aminoácidos y peso molecular) aún no se ha completado. Por razones de tiempo (el período límite de mi maestría), los

resultados que obtengamos a futuro, no podrán ser incluidos en esta presentación.

Nota :

Cuando la fracción II del veneno total es separada con una columna de carboximetilcelulosa (CMC) y un gradiente iónico, se obtiene un patrón cromatográfico con 14 fracciones (Possani 1984). En el laboratorio se demostró que bajo este protocolo, ErgTx eluye en la fracción denominada II.8. Debido a que en el laboratorio se contaba con una cantidad apreciable de fracción II del veneno total procesada por intercambio iónico, ErgTx se pudo purificar rápidamente y en cantidad suficiente, facilitando su caracterización química (figura 4).

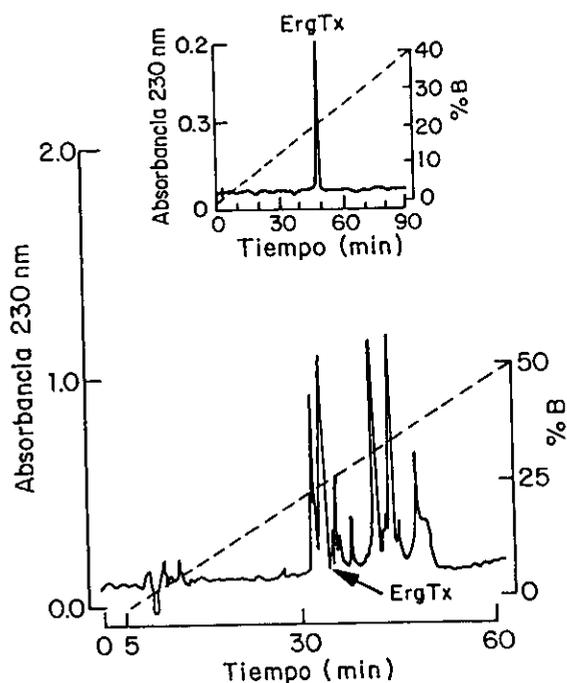


Figura 4. Obtención de ErgTx por intercambio iónico.

En la figura se muestra el esquema de purificación utilizado para caracterizar a ErgTx, una vez identificada.

a.2 Composición de Aminoácidos y Peso Molecular.

Con el fin de identificar inequívocamente la cantidad de cisteínas y su posición en la secuencia de aminoácidos, una cantidad suficiente de Ergx fué reducida y carboximetilada antes de determinar su estructura covalente (composición y secuencia

de aminoácidos). ErgTx resultó ser un péptido básico y con seis cisteínas. Tiene 42 aminoácidos y un peso molecular de 4733.3 Da de acuerdo al espectrómetro de masas. La composición de aminoácidos fue la siguiente: Cis 6, Tre 1, Asp 4, Ser 2, Glu 1, Pro 1, Gli 4, Ala 3, Val 1, Met 1, Tir 3, Phe 2, His 1, Arg 2, Lis 5, Gln 3, Asn 2.

a.3 Secuencia de Aminoácidos.

Por secuenciación directa se determinó hasta el aminoácido 30. Para determinar los 12 aminoácidos restantes, una cantidad suficiente de ErgTx previamente reducida y carboximetilada, se digirió con la proteasa V8 de Staphylococcus aureus y con bromuro de cianógeno. Para corroborar la asignación de la estructura primaria, ErgTx se digirió con la endopeptidasa Lisina C. La estrategia seguida para determinar la secuencia de aminoácidos completa de ErgTx fué la siguiente:

DRDSCVDKSRCAKYGYQQECQDCCKNAGHNGGTQMFFKCKAP

-Enzima V8

DRDSCVDKSRCAKYGYQE...
 CQDCCKNAGHNGGTQMFFKCKAP

-Bromuro de cianógeno

DRDSCVDKSRCAKYGYQQECQDCCKNAGHNGGTQM...
 FFKCKAP

-Lisina C

DRDSCVDK...
 SRCAK...
 YGYQQECQDCCK...
 NAGHNGGTQMFFK...
 CK...
 AP

NOTA: Donde los aminoácidos subrayados no pudieron ser secuenciados.

ErgTx es distinta a todas las toxinas que afectan canales de potasio aisladas hasta el momento. En la figura 5 se comparan la secuencia de aminoácidos de ErgTx y de toxinas aisladas del veneno de distintos animales ponzoñosos, representativas de los motivos estructurales reportados a la fecha: el motivo alfa

hélice estabilizado por cistinas (CSH) y el motivo hoja beta estabilizado por cistinas, también llamado nudo de cistinas (ICK). El patrón de cisteínas de ErgTx no corresponde a los que se han reportado hasta la fecha y su secuencia de aminoácidos es totalmente distinta. ErgTx tiene un patrón estructural sin precedentes en la literatura, esto podría explicar la alta afinidad y especificidad de ErgTx contra el canal de potasio HERG (ver figura 5).

Motivo CSH.

DRDSCVDKSRCAKYGY^YQECQDCCKNAGHNGGTQMFFKCKAP ErgTx

<u>C</u> SCSSLM <u>D</u> KE <u>C</u> VY <u>F</u> CHLDIIW	Endotelina Humana
<u>C</u> SKDM <u>D</u> T <u>D</u> KE <u>C</u> LY <u>F</u> CHQDVIW	Safaratoxina de Serpiente
<u>C</u> NCKAP <u>E</u> TAL <u>C</u> ARR <u>C</u> QQH Apamina de Abeja	
ATCDLLSKVNWHTA <u>C</u> AG <u>H</u> CIAKGFKGGYCNDKAV <u>C</u> VCRN	Defensina de insecto
GFGCPLNQG <u>A</u> CHR <u>H</u> CRSIRRRGGYCAGFFKOT <u>C</u> TCYRN	Defensina de Alacarán
QFTNVSC <u>T</u> TSKF <u>E</u> <u>C</u> WS <u>V</u> CQRLHNTSRGKCMNKK <u>C</u> RCYS	Toxina de Alacarán (Caribdotoxina)
MCMPD <u>F</u> TTDHQMARK <u>C</u> DD <u>C</u> CGGKGRGKCYGP <u>Q</u> CLCR	Toxina de alacarán (Clorotoxina)

Motivo ICK.

DRDSCVDKSRCAKYGY^YQECQDCCKNAGHNGGTQMFFKCKAP ErgTx

<u>K</u> KCIAKDYGR <u>C</u> KWG <u>G</u> TP <u>C</u> CRGRGCI	<u>C</u> SIMGT <u>N</u> <u>C</u> E <u>C</u> KPRLIMEGLGLA	mu-agatoxina IVA
<u>C</u> KSXGSS <u>C</u> SX <u>T</u> SY <u>N</u> <u>C</u> CRS <u>C</u> NXYTKR <u>C</u> Y		mu-conotoxina GVIA
<u>D</u> CVRFWGK <u>C</u> SQ <u>T</u> SD <u>C</u> PH <u>L</u> ACKSKWPRNIC <u>V</u> WDG <u>S</u> V		Gramotoxina
<u>E</u> CRYLFGG <u>C</u> K <u>T</u> SD <u>C</u> CKHLG <u>C</u> KFRDKY <u>C</u> AWDFTFS		Hanatoxina

Figura 5. Comparación de ErgTx con la secuencia de toxinas aisladas de diferentes organismos. En la figura se observa que ErgTx es completamente diferente a los demás péptidos mostrados.

a.4 Patrón de Puentes Disulfuro.

Como se mencionó anteriormente, la secuencia de aminoácidos de ErgTx no tiene precedentes en la literatura, una consecuencia es que el patrón de puentes disulfuro del péptido no puede determinarse por comparación con otro(s) polipéptido(s). ErgTx en su conformación nativa, se trató de digerir con varias enzimas proteolíticas, sin obtener resultados: Endopeptidasa Lisina C, proteasa V8 de *Staphylococcus aureus*, termolisina y quimiotripsina. En resumen, el patrón de puentes disulfuro no pudo ser determinado mediante las estrategias clásicas debido a

que ErgTx presenta proteólisis limitada (la estructura del péptido impide la acción de enzimas proteolíticas).

a.5 Conformación y Estructura.

Para determinar la estructura secundaria y terciaria de ErgTx, se purificaron 500 mcg de péptido y se mandaron primero a Francia con la Dra. Murielle Delepiere, para los ensayos de Resonancia Magnética Nuclear; y después con la Dra. Adela Rodríguez en la UNAM para los ensayos de dicroísmo circular. Si bien la cantidad de muestra fue insuficiente para obtener un resultado definitivo; los datos preliminares demuestran que se trata de una molécula estructurada (ver figura 6).

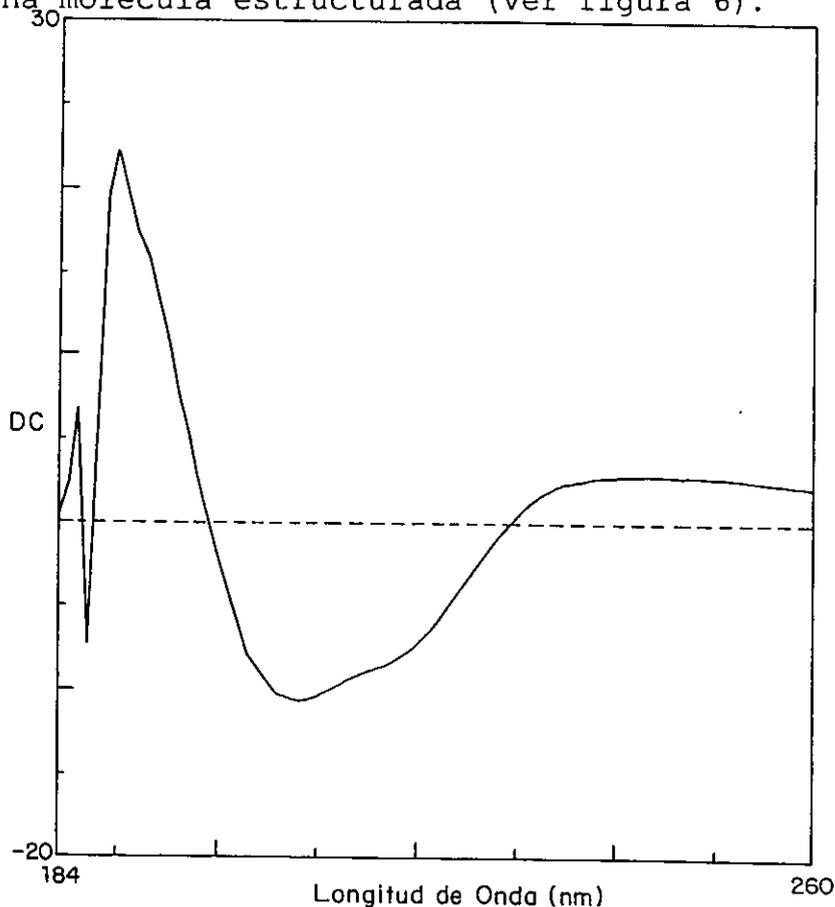


Figura 6. Dicroísmo circular de ErgTx. En la figura se observa que ErgTx es un péptido estructurado.

b) Síntesis química de ErgTx:

La amidación del extremo carboxilo en un polipéptido es una modificación post-transcripcional comúnmente observada en hormonas, toxinas y péptidos neuroactivos (Humphrey and Chamberlain 1997). Como se mencionó en la introducción, la presencia de un extremo carboxilo amidado estabiliza la molécula y en la mayoría de los casos, determina la actividad biológica del péptido o miniproteína (Humphrey and Chamberlain 1997). Del veneno de los alacranes estudiados hasta el momento, se han aislado toxinas amidadas y no amidadas, donde la actividad biológica no siempre ha dependido de esta modificación química (ver las revisiones: Possani *et al.*, 1999a; Possani *et al.*, 1999b). La estrategia más directa para determinar si un péptido presenta esta modificación es clonar el cDNA que codifica para el péptido, la presencia de una glicina en el extremo 3', seguida de aminoácidos básicos (lisina y/o arginina), indica la probabilidad de que el extremo carboxilo esté amidado. (Bougis *et al.*, 1989). Siguiendo una estrategia indirecta, la síntesis química de péptidos ofrece la oportunidad de obtener un producto con el extremo carboxilo modificado químicamente (Humphrey and Chamberlain 1997; Wilken and Kent 1998).

Para determinar si ErgTx tiene o no un extremo carboxilo amidado, se sintetizó la molécula con el extremo carboxilo libre (ErgTx-COOH) y amidado (ErgTx-NH₂). Los resultados obtenidos se presentan a continuación:

b.1 Síntesis de ErgTx-NH₂.

Para la síntesis de ErgTx con el extremo carboxilo amidado (ErgTx-NH₂) se utilizaron 75 mg de resina Rink-Amide-MBHA con una densidad de 0.62 miliequivalentes/gramo, esta densidad supone 0.0465 miliequivalentes iniciales. Partiendo de esta información y suponiendo un rendimiento del 100% se esperaban 218 mg de péptido crudo al final de la reacción. Concluido el acoplamiento del último aminoácido, el producto se desprotegió y siguiendo el protocolo descrito en la sección de materiales y métodos, se separó de la resina. El péptido crudo y liofilizado pesó 31 mg, un 14% de lo esperado. La pureza del péptido crudo se verificó por CLAP-FR y por secuenciación directa. En el cromatograma obtenido por CLAP-FR aparecen dos picos simétricos y equimolares (ver figura 7). Ambos picos se pudieron secuenciar hasta el aminoácido 36, la secuencia de aminoácidos obtenida corresponde inequívocamente a la toxina nativa.

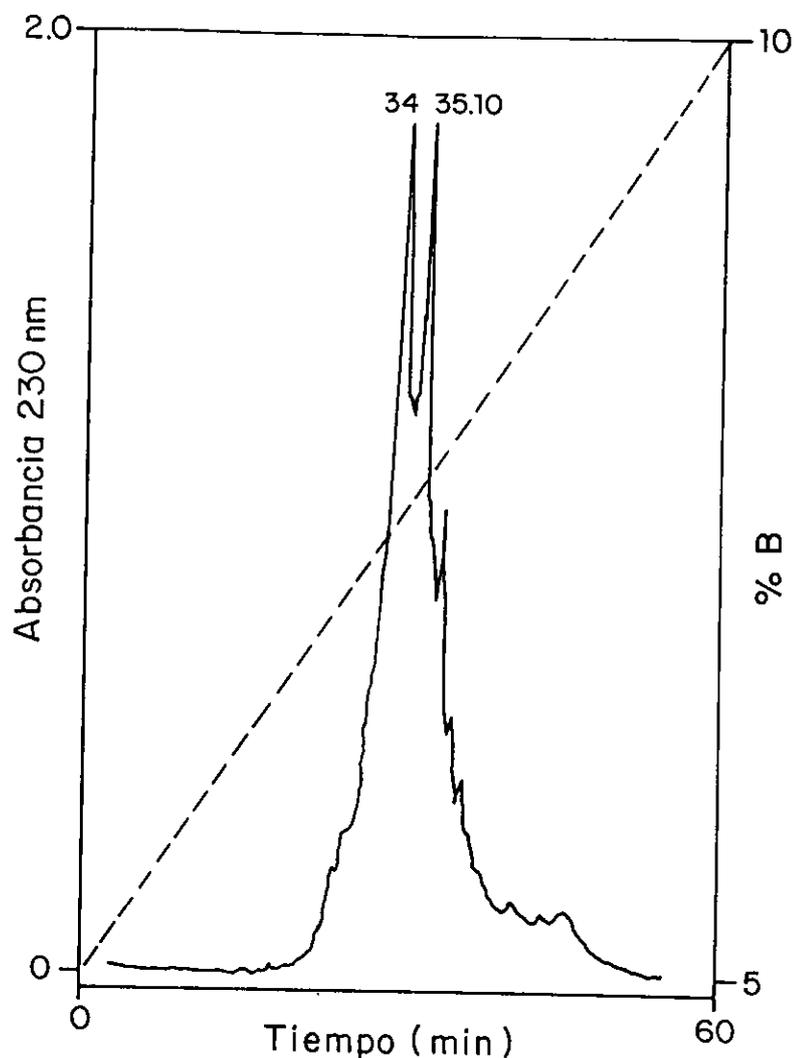


Figura 7. Producto de la síntesis química de ErgTxNH₂. En la figura se observan dos picos simétricos. Ambos picos representan la misma molécula, la diferencia en el tiempo de retención es debido a un arreglo conformacional distinto del mismo producto. Esto se debe a la presencia de cistinas y a la naturaleza hidrofóbica del péptido.

b.2 Síntesis de ErgTx-COOH.

Para la síntesis de ErgTx con el extremo carboxilo libre, se utilizaron 200 mg de resina PEG-PAL, con una densidad de 0.15 mequ/g, ésta densidad supone 0.03 mequ. iniciales. Partiendo de ésta información y suponiendo un rendimiento del 100%, se esperaban 141 mg de péptido crudo al final de la reacción. Concluido el acoplamiento del último aminoácido, el producto se desprotegió y siguiendo el protocolo descrito en la sección de

materiales y métodos se separó de la resina. El péptido crudo y liofilizado pesó 123 mg, esto significa un rendimiento del 87%. La pureza del péptido crudo se verificó por CLAP-FR y por secuenciación. El cromatograma obtenido por CLAP-FR es muy semejante al obtenido para ErgTx-NH₂ (ver figura 8). Ambos picos se pudieron secuenciar hasta el aminoácido 36 y la secuencia dió inequívocamente un sólo producto y con la misma estructura primaria.

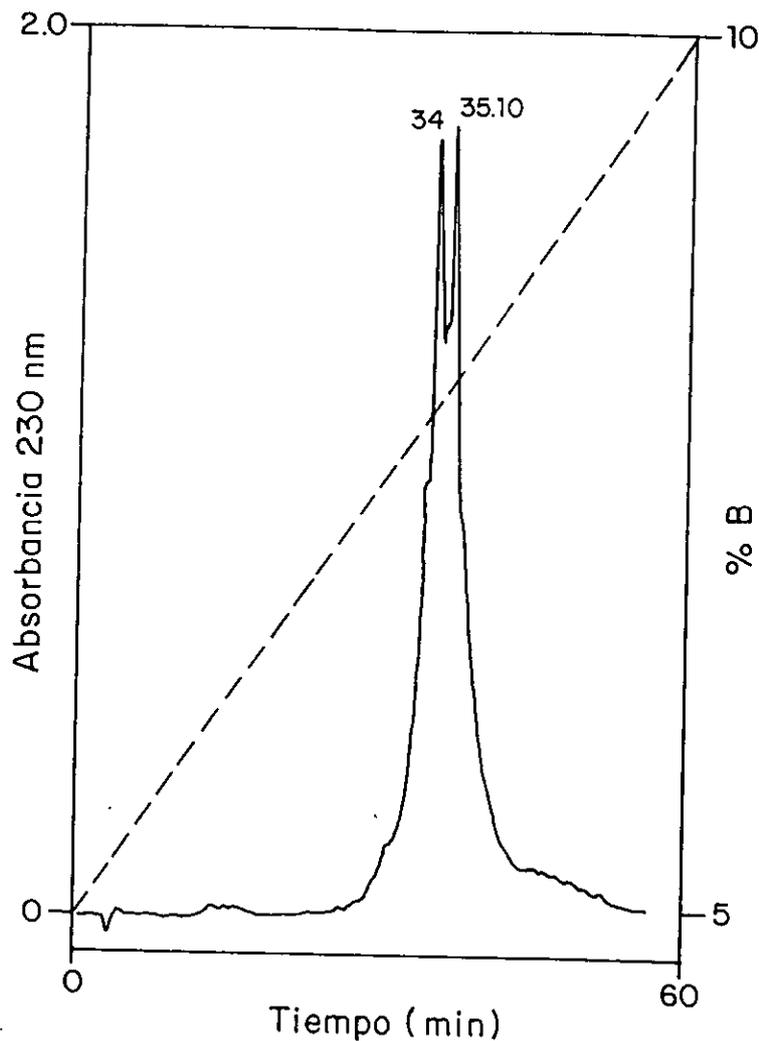


FIGURA 8. Producto de la síntesis química de ErgTxCOOH. En la figura se observan dos picos simétricos. Ambos picos representan la misma molécula, la diferencia en el tiempo de retención es debido a un arreglo conformacional distinto. Esto se demostró secuenciando ambos picos.

c) Plegamiento *in-vitro* de ErgTx:

Se logró obtener una molécula con el patrón cromatográfico y el peso molecular idénticos a la toxina nativa, pero con una actividad 10 veces menor. Después de ensayar varias condiciones de oxidación, no se logró obtener más de 1 mcg de péptido plegado por mg de péptido crudo.

Todas las toxinas de alacrán reportadas y que han sido sintetizadas químicamente hasta el momento se pliegan fácilmente (Daly et al., 1999). Partiendo de esta premisa, 1 mg del producto crudo de ErgTx-NH₂ se disolvió en 2 ml de agua tetradesilada y se incubó a temperatura ambiente y agitación suave durante 24 horas. La reacción se monitoreó por CLAP-FR al cabo de 1 hora y concluidas las 24 horas. Se observó siempre un pico esbelto y simétrico, pero con un tiempo de retención que no corresponde a la toxina nativa (ver figura 9).

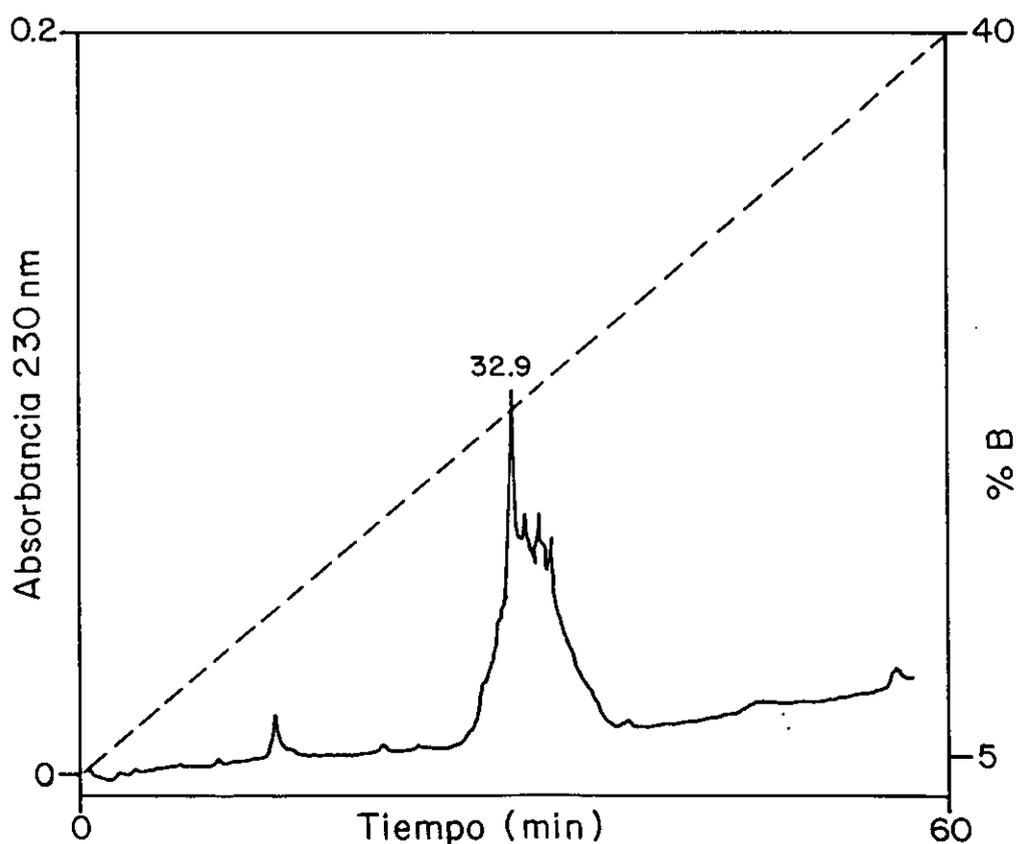


Figura 9. Oxidación de ErgTxNH₂ en presencia de O₂. En el cromatograma se observa que el producto principal de la reacción es un pico definido pero con un tiempo de retención menor al de ErgTx

En otro intento, se volvió a utilizar 1 mg de ErgTx-NH₂, pero ahora se disolvió en 10 ml de una mezcla de GSH 5 mM, GSSG 0.5 mM, fosfato de sodio dibásico 20 mM, cloruro de sodio 0.1 M y pH 7.8. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente y en agitación lenta durante 4 horas. Concluido el tiempo, la reacción se llevó a pH 3 con ácido fosfórico 20 mM y se separó por CLAP-FR (ver figura 10). En el cromatograma se observa una mezcla de productos, de los cuales el pico mayor tuvo el tiempo de retención de la toxina nativa. Este pico se colectó en un solo tubo y se purificó hasta homogeneidad por CLAP-FR. La pureza y características químicas de la molécula se verificaron por CLAP-FR y espectrometría de masas, la actividad biológica fué probada en el Laboratorio del Dr. Enzo Wanke en Italia. El péptido no tuvo actividad biológica.

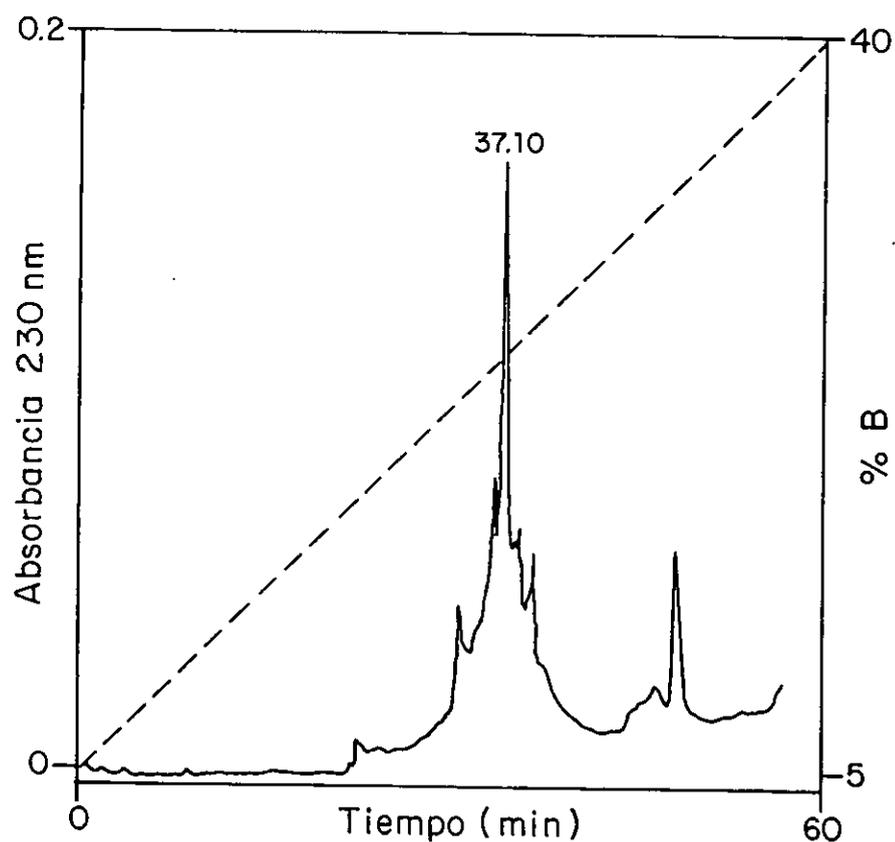


Figura 10. Plegamiento de ErgTxNH₂, en presencia de glutatión reducido y oxidado. En el cromatograma se observa un producto principal bastante definido y con el tiempo de retención correspondiente a ErgTx.

Cuando ErgTx-NH₂ se pasó por CLAP-FR bajo las condiciones adecuadas, se observó un pico simétrico y con el tiempo de retención correspondiente al de la toxina nativa (ver figura 11). ErgTxNH₂ dió un peso molecular de 4733 Da, prácticamente idéntico al de la molécula nativa. Cuando se pasó por CLAP-FR una mezcla de ErgTx nativa y ErgTx-NH₂, aparecieron dos picos con una diferencia de segundos en su tiempo de retención (ver figura 12). Además, cuando el péptido se probó contra el canal de K⁺, no tuvo actividad biológica (datos no mostrados). Los resultados anteriores nos llevaron a especular que ErgTx no está amidada y que la identidad del aminoácido en el extremo carboxilo (prolina) es fundamental para la actividad biológica.

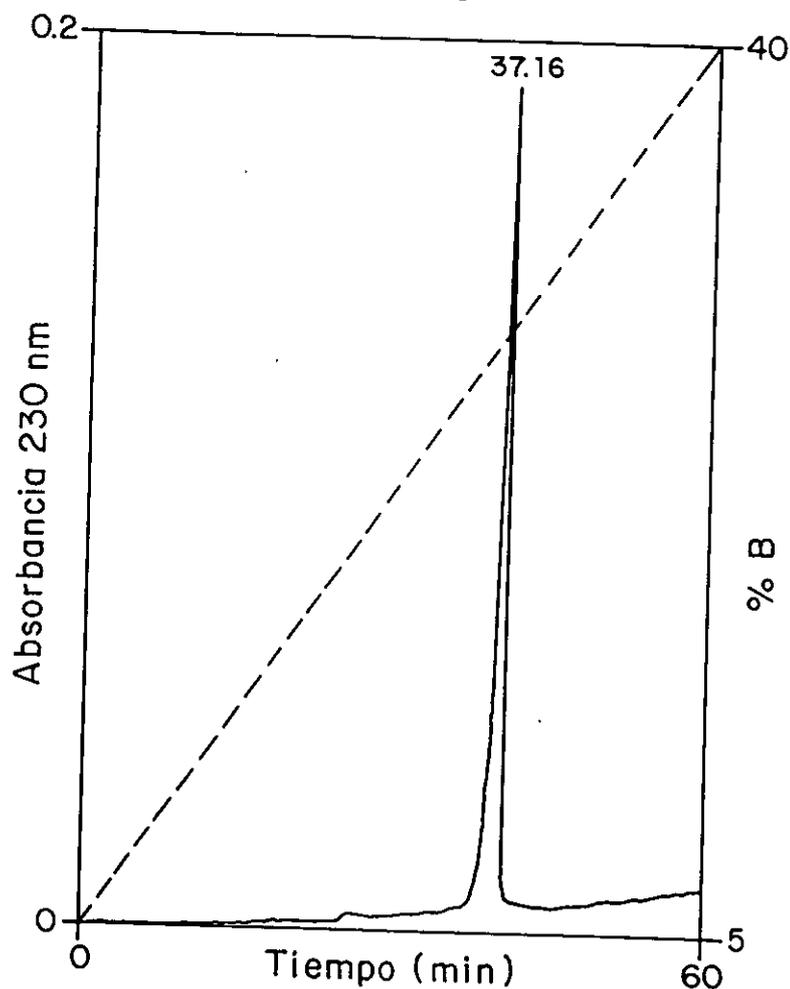


Figura 11. Recromatografía de ErgTxNH₂. En el cromatograma se observa un pico estable y simétrico. Con el tiempo de retención correspondiente al de ErgTx.

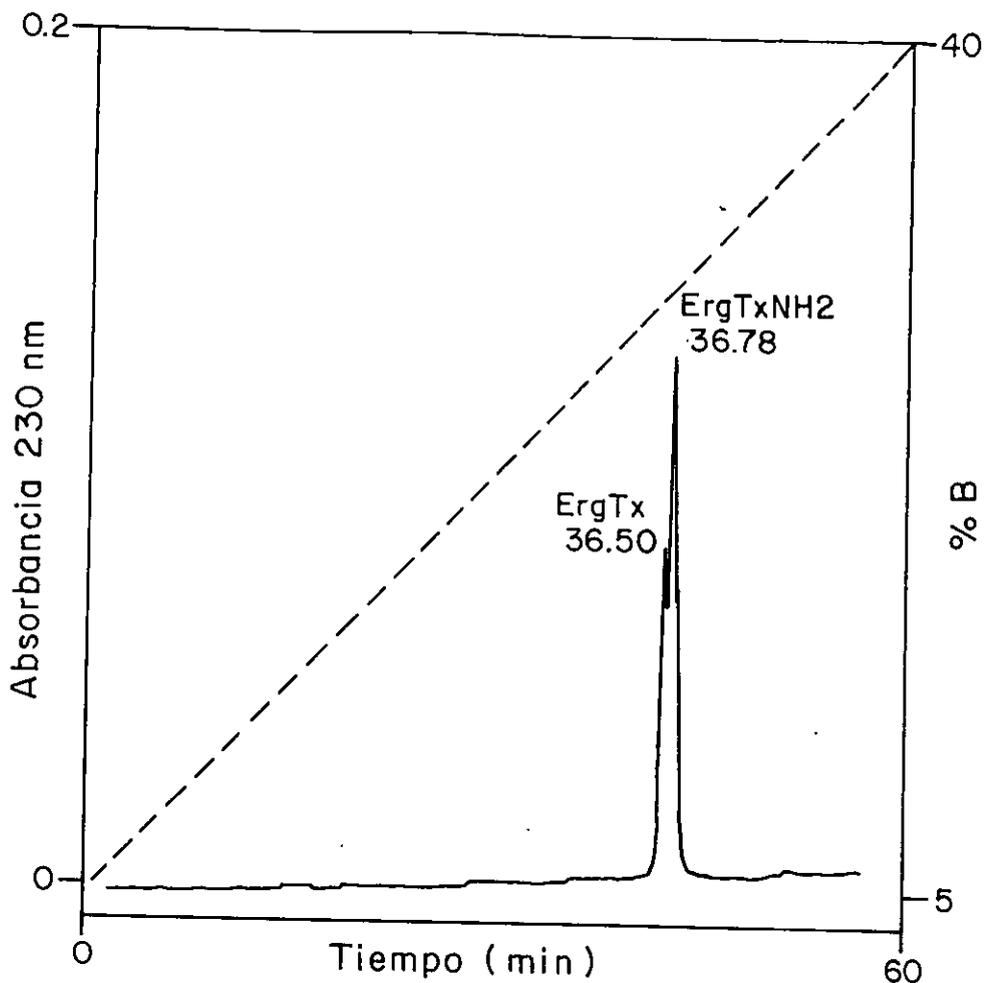


Figura 12. Mezcla de ErgTx + ErgTxNH₂. En el cromatograma se observan dos picos esbeltos, separados por segundos. Este patrón cromatográfico es clásico para toxinas que difieren en la amidación del extremo carboxilo.

Para demostrar lo anterior se intentó plegar la ErgTx con el extremo carboxilo libre (ErgTx-COOH). Repitiendo el protocolo de plegamiento utilizado con ErgTxNH₂, 1 mg de ErgTxCOOH se disolvió en 10 ml de la mezcla de reacción con GSH y GSSG en una proporción 1/10, en buffer de fosfatos y pH 7.8. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente y agitación suave durante 4 horas (previamente se demostró que la reacción alcanza el equilibrio a las 4 horas, razón por la cual no se incubó más tiempo). Concluido el tiempo, la reacción se llevó a pH 3 con ácido fosfórico 20 mM y se separó por CLAP-FR (datos no mostrados). En el cromatograma se observa una mezcla de productos muy similar a lo obtenido con ErgTxNH₂, de los cuales el pico mayor nuevamente tuvo el tiempo de retención de la toxina nativa. Este pico se colectó en un solo tubo y se purificó hasta homogeneidad por CLAP-FR. La pureza y

características químicas de la molécula se verificaron por CLAP-FR y espectrometría de masas. Cuando ErgTx-COOH se pasó por CLAP-FR bajo las condiciones adecuadas se observa, igual que para ErgTxNH₂, un pico simétrico y con el tiempo de retención correspondiente a la toxina nativa (datos no mostrados). Una mezcla de ErgTx nativa y ErgTx-COOH da un sólo pico y con el tiempo de retención correspondiente a la toxina nativa (ver figura 13). Nuevamente, al igual que para ErgTx-NH₂, ErgTx-COOH dió un peso molecular de 4733 Da, prácticamente idéntico al de la molécula nativa. Finalmente, ErgTx-COOH se probó contra el canal de K₊ HERG y tampoco presentó actividad biológica.

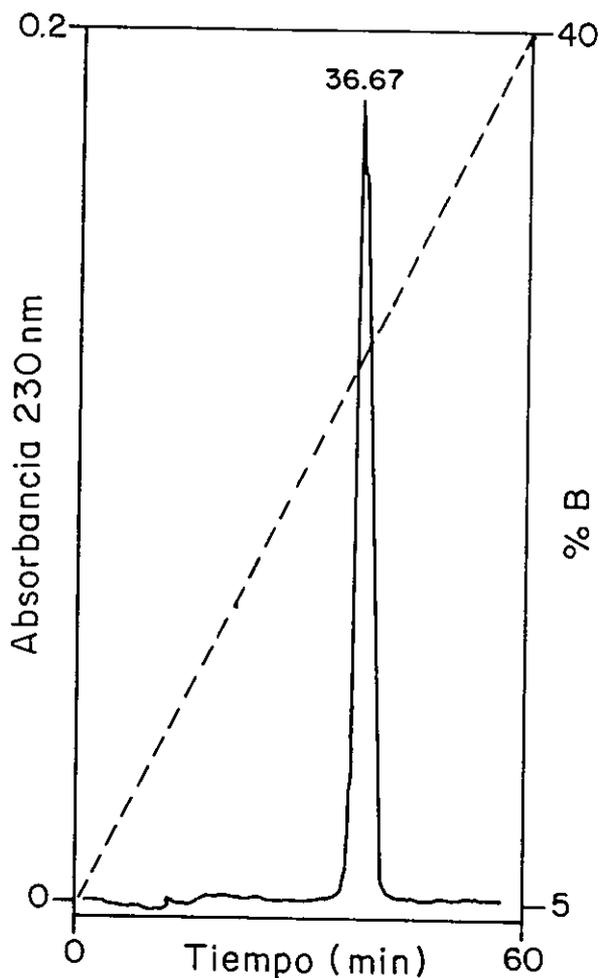


Figura 13. Mezcla de ErgTxCOOH + ErgTx. En el cromatograma se observa un pico simétrico aunque un poco ancho de la base. El tiempo de retención es idéntico al de ErgTx.

Tratando de resolver el problema, se ensayaron varias condiciones de plegamiento, sin obtener resultados satisfactorios (ver tabla I): a 4° C y con la mezcla de reacción descrita arriba, no se obtiene un producto principal definido. A pH 6 y con DMSO 20% el resultado es muy similar al obtenido cuando se oxida la toxina en presencia de GSH/GSSG. Esta última reacción se repitió, pero ahora se dejó incubando más de 12 horas. El resultado fue un solo pico que aunque ancho de la base, tiene el tiempo de retención correspondiente a ErgTX (ver figura 14).

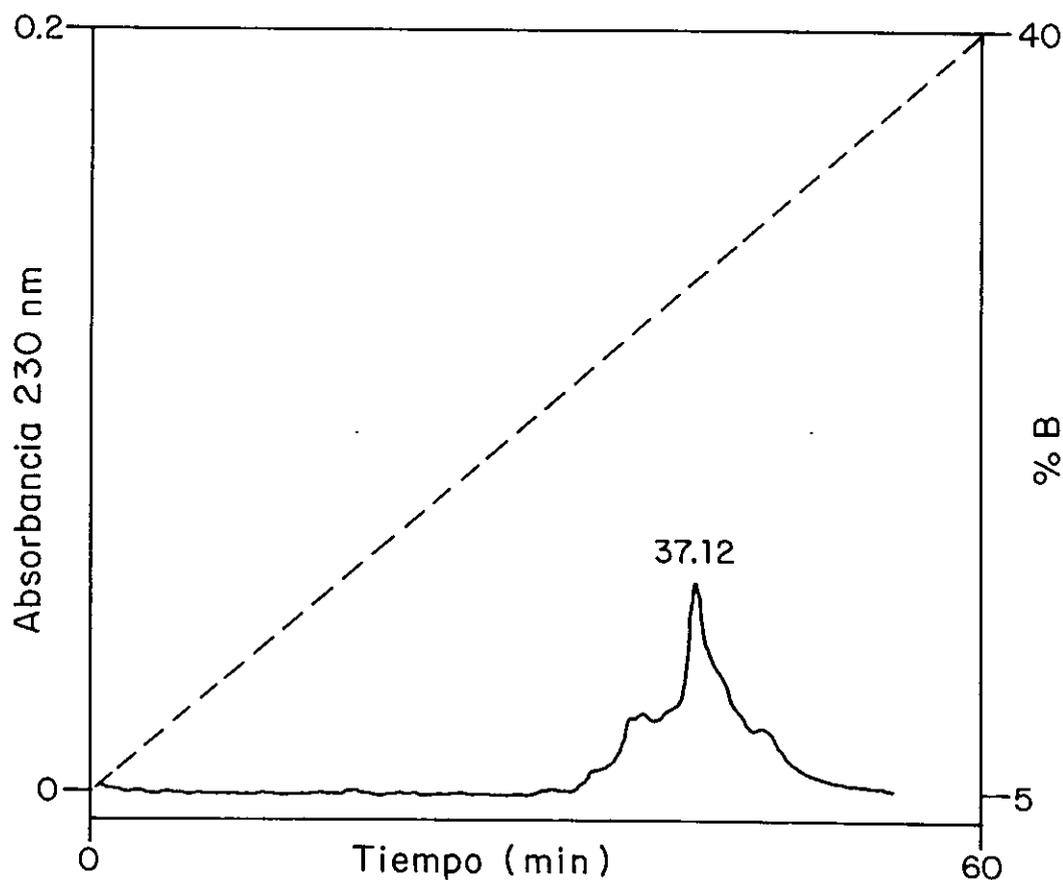


Figura 14. Oxidación de ErgTxCOOH en presencia de DMSO 20%, cuando la reacción se lleva al equilibrio. El objetivo de este experimento fue averiguar el tiempo necesario para que la reacción llegara al equilibrio y demostrar la influencia del pH en el plegamiento de ErgTx. Se realizó también para demostrar que el producto obtenido después de 4 horas de reacción no era un producto intermediario inestable.

Buscando en la literatura ejemplos de polipéptidos que no se pliegan fácilmente, nos encontramos con que Wei Ch. y colaboradores (1999), demuestran que la proquimosina (un zimógeno de la enzima quimosina, importante en la producción de lácteos) tiene un mecanismo de plegamiento que comprende dos fases: durante la primer fase de oxidación, la proquimosina comienza a plegarse y forma un intermediario que aunque ya tiene estructura y es estable, aún no se ha compactado (presenta estabilidad conformacional pero aún carece de actividad biológica). Es en una segunda fase del plegamiento, cuando la molécula se empaqueta y adquiere la conformación nativa (adquiere actividad biológica).

Siguiendo éste ejemplo ensayamos una reacción de plegamiento bajo las condiciones propuestas por Creighton (1995) para polipéptidos que no se pliegan fácilmente:

Un mg de ErgTxCOOH, se disolvió en 2 ml de ditioneol (DTT) 16 mM y se incubó a temperatura ambiente durante 4 horas con agitación suave. Concluido el tiempo fijado, la mezcla de reacción se diluyó en una proporción 1/20 con una mezcla de GSH 5mM, GSSG 0.5 mM, EDTA 1mM, Tris.HCl 0.1 M y pH 7. La mezcla se incubó durante 4-18 horas y el producto principal se purificó hasta homogeneidad por CLAP-FR y colectado en un sólo tubo como se describe anteriormente (ver figura 15). El patrón cromatográfico del producto principal obtenido fué muy similar al obtenido en los ensayos anteriores. Esta muestra se sometió a un segundo proceso de oxidación siguiendo las mismas condiciones de plegamiento. El producto de ésta segunda reacción se purificó hasta homogeneidad por CLAP (ver figura 16) y se mandó a Italia para verificar su actividad biológica. Resultó tener una actividad 10 veces menor a la toxina nativa (datos no mostrados).

Para poder asegurar que contabamos con una molécula correctamente estructurada, se hizo un barrido de UV-VIS haciendo uso de un espectrofotómetro Beckman DU-50. El patrón fué muy similar entre el producto sintético activo y la molécula nativa, pero distinto entre el producto sintético inactivo y la ErgTx nativa. Antes de asegurar contundentemente que en realidad tenemos un péptido sintético correctamente plegado, es necesario hacer ensayos de dicroísmo circular y quizás también de resonancia magnética nuclear. Esto no ha sido posible debido a

los rendimientos tan pobres obtenidos en la reacción de plegamiento.

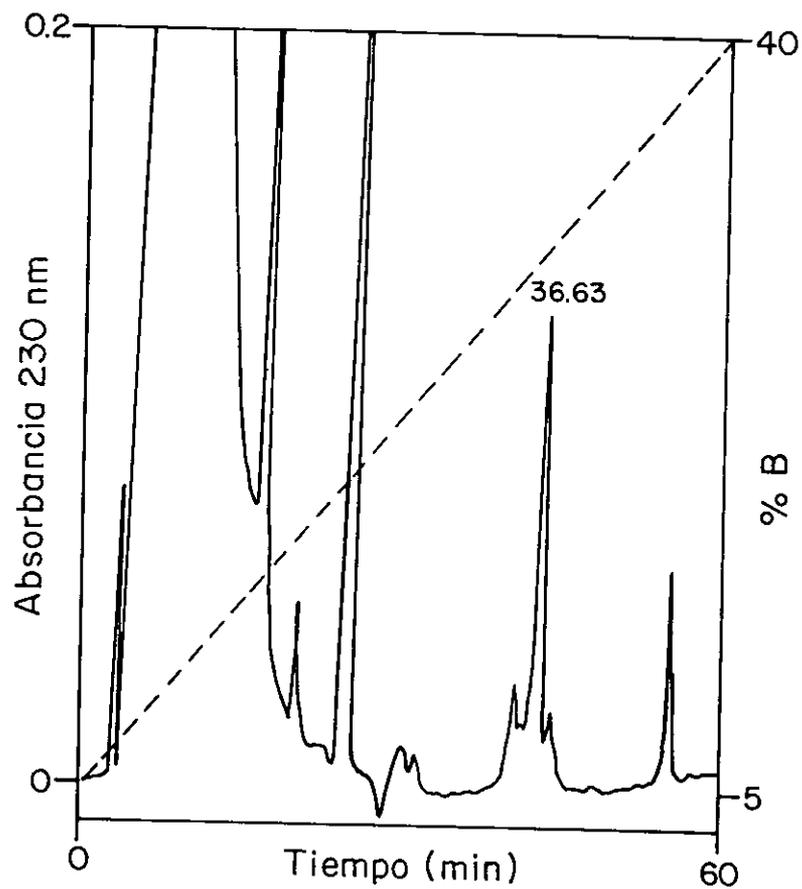


Figura 15. Plegamiento de ErgTxCOOH en presencia de glutatión reducido y oxidado + cloruro de guanidinio 1M. Se obtuvo un producto principal esbelto y estable, pero sin actividad biológica.

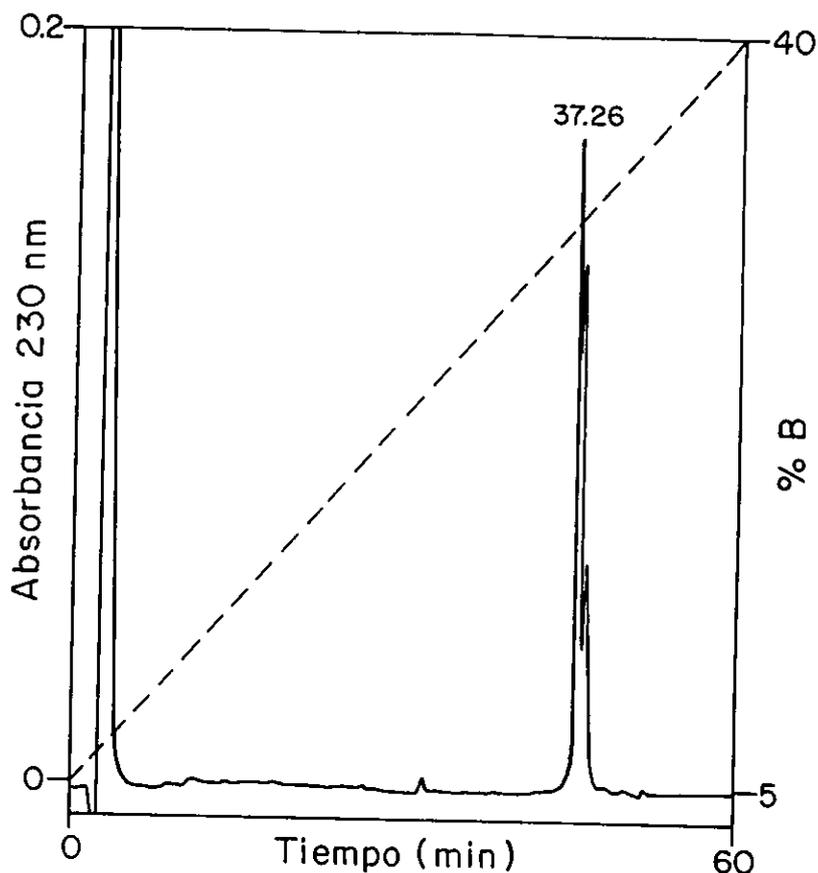


Figura 16. Plegamiento de ErgTxCOOH previamente plegada. El plegamiento del producto principal obtenido en la primer reacción de plegamiento generó dos picos bastante esbeltos. Uno de ellos, el segundo presentó actividad biológica.

X.- DISCUSION:

El origen de este trabajo fue la identificación de ErgTx, un componente del veneno del alacrán *Centruroides noxius*, antagonista del canal de K^+ ERG. El trabajo que estoy presentando es un estudio preliminar de una molécula compleja y sin precedentes en la literatura. Como se menciona en la sección de resultados, ErgTx es un péptido básico de 42 aminoácidos, con una estructura y propiedades farmacológicas novedosas. Por la manera en que se une a su receptor y por sus características estructurales preliminares, ErgTx pertenece a una nueva clase de moduladores peptídicos del potencial de membrana. Antes de

iniciar la discusión, quisiera enfatizar los principales puntos a discutir, y a partir de estos, desarrollar esta sección :1) ErgTx se une al estado cerrado de su receptor, de manera espontánea y reversible; 2) la estructura primaria y el patrón de cisteínas de ErgTx carecen de precedentes en la literatura ; 3) ErgTx es un péptido difícil de sintetizar químicamente; 4) varios ensayos de plegamiento con ErgTx sintética, demuestran que la molécula oxidada es más hidrofóbica que la reducida (contrario a lo que se observa normalmente); 5) Ensayos preliminares de dicroísmo circular y resonancia magnética nuclear sugieren que ErgTx es una molécula estructurada.

Estos datos representan una evidencia preliminar de que ErgTx es un péptido estructurado (miniproteína), con una estructura covalente (secuencia de aminoácidos y patrón de cisteínas) diferente a las reportadas hasta el momento. Intentando ser claro y conciso, decidí discutir los resultados en dos partes: en la primer parte (1), discutiré el aislamiento, la caracterización bioquímica y las propiedades farmacológicas de ErgTx. En la segunda parte (2), discutiré la síntesis química y los ensayos de oxidación (plegamiento) *in-vitro* realizados con el producto de síntesis.

1.- Aislamiento, Caracterización Bioquímica y Farmacología de ErgTx:

1.a Características Bioquímicas.

A la fecha, se cuenta con la estructura primaria completa de 49 toxinas aisladas de alacrán, que bloquean canales de K^+ (Tytgat et al., 1999). En 1995a, Miller clasificó por primera vez a este grupo de péptidos en tres subfamilias y decidió denominarlo familia de "toxinas alfa-K" (Miller 1995b). Como el número de toxinas alfa-K ha crecido considerablemente, Selisko y colaboradores (1998) propusieron extender la clasificación a 12 subfamilias. Recientemente, Tytgat y colaboradores (1999) desarrollaron un sistema de clasificación y nomenclatura unificada. A diferencia de las demás toxinas alfa-K, ErgTx es específica contra un solo receptor (canal de K^+ HERG). La secuencia de aminoácidos de ErgTx es totalmente distinta; cuando se compara contra los miembros de esta familia, su patrón de cisteínas no corresponde al patrón de cisteínas CSH, altamente conservado en las toxinas alfa-K.

Debido a que las toxinas alfa-K actúan con poca especificidad contra un número variable de canales de K^+ , la clasificación hecha por Miller (1995b) y la propuesta de Selisko y colaboradores (1998), se basa principalmente en las secuencias de aminoácidos y estructuras tridimensionales determinadas hasta el momento. A partir de los datos presentados en este trabajo, Tytgat y colaboradores (1999), proponen que ErgTx es el primer miembro de las toxinas gama-K, una nueva subfamilia de toxinas de alacrán inhibitoras de canales de K^+ .

Hasta el momento se han descrito 4 categorías de péptidos inhibidores de canales de K^+ . Esta clasificación se basa en la comparación de la estructura primaria y terciaria entre los péptidos y en cierta forma refleja el animal del cual se aisló cada uno (abeja, alacrán, araña o serpiente) (García et al., 1997). Cuando se compara la secuencia de aminoácidos de ErgTx con la de péptidos representativos de las 4 categorías existentes, es imposible un alineamiento satisfactorio. La estructura primaria y el patrón de las cisteínas son totalmente distintos a los reportados hasta el momento (Gurrola et al., 1999).

Se cree que todas las miniproteínas que modulan el potencial de membrana evolucionaron a partir de uno o hasta dos ancestros comunes, por duplicación génica y subsecuente variación divergente. Conservando sólo el patrón de cisteínas y el arreglo conformacional, fueron adquiriendo diversas funciones (Froy and Gurevitz 1998).

Tomando los argumentos anteriores como premisa, Froy y colaboradores (1999) demostraron que las toxinas aisladas de alacrán pertenecen a una sola familia multigénica. Cada toxina con farmacología única pertenece a una familia de genes. Las características de ErgTx no concuerdan con la propuesta de Froy y colaboradores. Es posible que ErgTx no tenga un vínculo evolutivo con las toxinas alfa-K y mucho menos con las demás toxinas reportadas hasta el momento. Antes de adoptar una postura al respecto, es necesario caracterizar la estructura del gen que codifica para ErgTx y determinar la estructura tridimensional del péptido, así como el patrón de puentes disulfuro.

Cuando se intentaron determinar los puentes disulfuro de ErgTx, el péptido resistió la acción de las siguientes proteasas: endopeptidasa Lisina C, endopeptidada V8, termolisina

y quimi tripsina. Las proteínas y miniproteínas ricas en cisteínas son moléculas bastante estructuradas y como consecuencia sufren proteólisis limitada en presencia de enzimas proteolíticas. Los resultados anteriores, así como datos preliminares de dicroísmo circular, demuestran inequívocamente que ErgTx es un péptido estructurado.

1.b Características Farmacológicas.

Los ensayos electrofisiológicos (realizados por el grupo del Dr. Enzo Wanke en Italia en colaboración con nuestro grupo) demostraron que ErgTx se une reversiblemente y con alta afinidad al canal de K^+ HERG, preferentemente cuando el canal tiene el poro cerrado; y que no actúa sobre los canales de K^+ filogenéticamente relacionados a HERG (Gurrola et al., 1999). Las toxinas de alacrán que inhiben canales de K^+ reportadas hasta la fecha, bloquean el poro del canal sin importar su estado conformacional (abierto o cerrado) (Park and Miller, 1992). Recientemente se demostró que lo mismo es cierto para las toxinas de araña que inhiben canales de K^+ (García et al., 1999). Si recordamos, las toxinas aisladas del veneno de arañas son representantes del motivo estructural ICK (Narasimhan et al., 1994; Norton and Pallaghy, 1998; Pallaghy et al., 1994) y las toxinas alfa-K de alacranes, representan al motivo estructural CSH (Tamaoki et al., 1998). Este dato es importante, pues implica que todas las toxinas que bloquean canales de K^+ , sin importar su arreglo conformacional, lo hacen mediante un mecanismo similar; ErgTx tampoco cumple con esta regla. Si bien el mecanismo de unión de ErgTx al canal de K^+ HERG, aún no está claro (este trabajo es la tesis doctoral de Liliana Pardo en nuestro laboratorio); es evidente que ErgTx actúa de manera distinta a las demás toxinas.

2) Síntesis Química y Plegamiento in-vitro de ErgTx.

2.a Síntesis Química de ErgTx.

En la segunda parte de este trabajo, se demostró que ErgTx es un péptido con una secuencia de aminoácidos difícil de sintetizar químicamente; y con un mecanismo de plegamiento aparentemente complejo. La secuencia tiende agregarse, aumentando los tiempos de reacción de acoplamiento y desprotección.

estable y con un perfil cromatográfico muy similar al del péptido funcional, pero sin actividad biológica. Estos resultados indican que en condiciones *in-vitro*, la estructura funcional de ErgTx no es el producto favorable de la reacción. Esto implica que, a pesar de que ErgTx es un polipéptido pequeño, su mecanismo de plegamiento es complejo.

Antes de interpretar estos resultados, es necesario identificar la naturaleza del producto principal obtenido. Existen al menos dos posibilidades: a) el producto principal es un intermediario compacto (glóbulo derretido) con el arreglo conformacional adecuado, pero sin las interacciones terciarias específicas, necesarias para la actividad biológica; b) el producto principal tiene la estructura adecuada pero sus puentes disulfuro no son los correctos. Para ambos casos, el producto principal de la reacción es aquel con la menor energía libre de formación.

En general, se considera que durante el plegamiento de un polipéptido, los aminoácidos hidrofóbicos desplazan al agua y ocupan el interior de la molécula. Una consecuencia es que en un cromatograma de CLAP-FR, los tiempos de retención de los productos plegados (oxidados) son menores al tiempo de retención del péptido reducido (Daly et al., 1999). A partir de esta premisa, nuestros resultados indican que ErgTx en su conformación nativa, tiene aminoácidos hidrofóbicos en su superficie, y por eso el producto de oxidación tiene un tiempo de retención mayor al del péptido desnaturalizado y que los subproductos de la reacción (intermediarios cinéticos).

Recientemente Daly y colaboradores (1999), demostraron que Kalata B1, una toxina aislada de plantas, también es un péptido cuya estructura funcional es más hidrofóbica que la molécula desanturalizada. La toxina Kalata B1 es un péptido pequeño (29 aminoácidos de longitud; y sin embargo, manifiesta un mecanismo de plegamiento complejo (Daly et al., 1999). Estos datos sugieren que lo mismo está ocurriendo para la toxina ErgTx.

XI.- CONCLUSIONES:

En este trabajo hemos purificado, caracterizado y sintetizado químicamente, un péptido de origen natural con elementos estructurales novedosos y potencial biotecnológico. La identificación y aislamiento de ErgTx demuestran que en el

veneno del alacrán *Centruroides noxius*-Hoffmann, existe un componente capaz de alterar la fisiología del corazón.

Las conclusiones son las siguientes:

- ErgTx tiene una estructura primaria y probablemente un arreglo conformacional sin precedentes en la literatura; su patrón de cisteínas no corresponde a los que se han reportado hasta el momento.
- ErgTx resiste la actividad enzimática de varias proteasas. Este dato, así como ensayos preliminares de dicroísmo circular, demuestran que ErgTx es un péptido estructurado (miniproteína).
- ErgTx bloquea de manera específica el poro del canal de K^+ HERG, y lo hace preferentemente cuando el canal está cerrado.
- Existen evidencias de que el canal de K^+ HERG participa en la proliferación de células cancerígenas (Bianchi *et al.*, 1998). ErgTx es un inhibidor peptídico específico de HERG y posiblemente un inhibidor de células cancerígenas.
- Mediante la síntesis química de ErgTx, se pudo demostrar que ErgTx tiene un extremo carboxilo libre y que carece de modificaciones post-traduccionales.
- Los ensayos de plegamiento *in-vitro* demostraron que ErgTX es un péptido difícil de plegar. Esto se debe probablemente, a que la molécula en su conformación funcional, tiene una superficie externa más hidrofóbica que la de el péptido en su estado desnaturalizado.

XII .- PERSPECTIVAS:

Antes de adoptar una postura respecto al arreglo conformacional de ErgTx y al mecanismo de su plegamiento *in-vitro*, es necesario determinar la estructura tridimensional del péptido y realizar un estudio cinético de la reacción de plegamiento *in-vitro*. Es posible que esta toxina se pliegue sólo en presencia de un propéptido y/o en condiciones celulares. Debido a esto, se ha decidido expresar la toxina en bacteria.

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

XIII.- BIBLIOGRAFÍA:

- **Alberts, B., Ray, D., Lewis, J., Ralf, M., Roberts, K. and Watson, J.D.** (1994) *Molecular Biology of the Cell* 3rd. edit. Garland Publishing.
- **Afinsen, C.B.** (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science*. 181, 223-230.
- **Armstrong, C. M. and Hille, B.** (1998) Voltage-Gated Ion Channels and Electrical Excitability. *Neuron*. 20, 371-380.
- **Atherton, E. and Sheppard, R.C.** (1989) *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. Oxford University Press. Inc., Oxford.
- **Axley, M.J.** (1998) Introduction to Peptides and Proteins. In *Bioorganic Chemistry : Peptides and Proteins* (Hecht, S.M., ed). Chapter 1. pp. 1-26, Oxford University Press, Inc. New York.
- **Baldwin, L.R.** (1999) Protein folding from 1961 to 1982. *Nat. Struct. Biol.* 6(9), 814-817.
- **Barlos, K. and Gatos, D.** (1999) 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl/tButyl-Based Convergent Protein Synthesis. *Biopolymers*. 51, 266-278.
- **Baxter, D.A.** (1997) Synthesis utilizing insoluble polymers: new reactions and small molecules. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1, 79-85.
- **Benham, C.J. and Jafri M.S.** (1993) Disulfide bonding patterns and protein topologies. *Protein Sci.* 2, 41-54.
- **Bianchi, L., Wible, B., Arcangeli, A., Taglialatela, M., Morra, F., Castaldo, P., Crociani, O., Rosati, B., Faravelli, L., Olivotto, L. and Wanke, E.** (1998) *herg* Encodes a K⁺ Current Highly Conserved in Tumors of Different Histogenesis : A Selective Advantage for Cancer Cells?. *Cancer Research*. 58, 815-822.
- **Bontems, F., Roumestand, C., Gilquin, B., Ménez, A. and Toma, F.** (1991) Refined structure of charybdotoxin: common motifs in scorpion toxins and insect defensins. *Science*. 254, 1521-1523.

- **Bougis, P.E., Rochat, H. and Smith, L.A.** (1989) Precursors of *Androctonus australis* scorpion neurotoxins. *J. Biol. Chem.* 264, 19259-19265.
- **Blundell, L.T.** (1996) Structure-based drug design. *Nature SUPP.* 384, 23-26.
- **Brenner, S.E., Chothia, C. and Hubbard T.J.P.** (1997) Population statistics of protein structures: Lessons from structural classifications. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 369-376.
- **Bruggemann, A., Pardo, A.L., Stuhmer, W. and Pongs, O.** (1993) Ether-á-go-go encodes a voltage-gated channel permeable to K⁺ and Ca²⁺ and modulated by cAMP. *Nature* 365, 445-448.
- **Cahalan, D.M. and Chandy, K.G.** (1997) Ion channels in the immune system as targets for immunosuppression. *Curr. Opin. Biotech.* 8, 749-756.
- **Carbone, E., Wanke, E., Prestipino, G., Possani, L.D. and Maelicke, A.** (1982) Selective blockage of voltage-dependent K⁺ channels by a novel scorpion toxin. *Nature* 296, 90-91.
- **Catterall, W.A.** (1977) Membrane potential-dependent binding of scorpion toxin to the action potential of Na⁺ ionophore. Studies with a toxin derivative prepared by lactoperoxidase-catalysed iodination. *J. Biol. Chem.* 252, 8660-8668.
- **Catterall, W.A.** (1980) Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20, 15-43.
- **Catterall, W.A.** (1995) Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 493-531.
- **Changeux, J.P. and Edelstein, S.J.** (1998) Allosteric Receptors after 30 Years. *Neuron.* 21, 959-980.
- **Chothia, C.** (1992) One thousand families for the molecular biologist. *Nature.* 357, 543-544.

- **Clark-Lewis, I., Aebersold, R., Ziltener, H., Schrader, J.W., Hood, L.E. and Kent, S.B.H.** (1986) Automated Chemical Synthesis of a Protein Growth Factor for Hemopoietic Cells, Interleukin-3. *Science*. 231, 134-139.
- **Creighton, E.T., Zapun A. and Darby J.N.** (1995) Evolution of Animal Toxins. Conservation of a diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structures. *J. Biol. Chem.* 272, 4302-4309.
- **Curran, M. E.** (1998) Potassium ion channels and human disease: phenotypes to drug targets?. *Curr. Opin. Biotech.* 9, 565-572.
- **Daly, L.N., Love, S., Alewood, F.P. and Craik, D.** (1999) Chemical Synthesis and Folding of Large Cyclic Polypeptides: Studies of the Cystine Knot Polypeptide Kalata B1. *Biochemistry*. 38, 10606-10614.
- **Dauplais, M., Lecoq, A., Song, J., Cotton, J., Jamin, N., Gilquin, B., Roumestand, C., Vita, C., de Madeiros, L.C., Rowan, G.E., Harvey, L.A. and Ménez, A.** (1997) On the Convergent Evolution of Animal Toxins. *J. Biol. Chem.* 272(7) 4302-4309.
- **Davidson, B.S.** (1993) *Chem. Rev.* 93, 1771.
- **Dawson, P. and Kent, S.B.H.** (1993) Convenient total synthesis of a 4-Helix TASP molecule by chemoselective ligation. *J. Amer. Chem. Soc.* 115, 7263-7266.
- **Dawson, P., Muir, T.W., Clark-Lewis, I., Kent, S.B.H.** (1994) Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science*. 266, 776-779.
- **Debin, J.A., Maggio, J.E. and Strichartz, G.R.** (1993) Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *Am. J. Phys.* 264(33), C361-C369.
- **DeGrado, F.W. and Summa, M.C.** (1999) De Novo Design and Structural Characterization of Proteins and Metalloproteins. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 779-819.
- **Dobson, M.C. and Karplus, M.** (1999) The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 92-101.

- **Drakoupolou, E., Zinn-Justin, S., Guenneugues, M., Gilquin, M., Ménez, A. and Vita, C.** (1996) Changing the Structural Context of a Functional Beta-Hairpin. Synthesis and characterization of a chimera containing the curaremimetic loop of a snake toxin in the scorpion alfa/beta scaffold. *J. Biol. Chem.* 271(20), 11979-11987.
- **Drakoupolou, E., Vizzavona, J., Neyton, J., Aniort, V., Bouet, F., Virelizier, H., Ménez, A. and Vita, C.** (1998) Consequence of the Removal of Evolutionary Conserved Disulfide Bridges on the Structure and Function of Charybdotoxin and Evidence that Particular Cystein Spacings Govern Specific Disulfide Bond Formation. *Biochemistry.* 37, 1292-1301.
- **Duda F. T. Jr. y Palumbi R. S.** (1999) Molecular genetics of ecological diversification: Duplication and rapid evolution of toxin genes of the venomous gastropod *Conus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 6820-6823
- **Durell, S.R., Hao, Y. and Guy, H.R.** (1998) Structural Models of the Transmembrane Region of Voltage-Gated and other K⁺ Channels in Open, Closed and Inactivated Conformations. *J. Biol. Chem.* 121, 263-284.
- **Editorial** (1999) Integrative approaches to protein folding. *Nat. Struct. Biol.* 6(12), 1079-1080.
- **Fields, G.B. and Noble, R.L.** (1990) Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Pept. Prot. Res.* 35, 161-214.
- **Fitzgerald, M.C. and Kent, S.B.H.** (1998) Total Chemical Synthesis of Proteins. In *Bioorganic Chemistry: Peptides and Proteins.* (Hecht, S.M., ed) Chapter 3, pp. 65-99. Oxford University Press, Inc., New York.
- **Froy, O. and Gurevitz, M.** (1998) Membrane potential modulators: a thread of scarlet from plants to humans. *The FASEB J.* 12, 1793-1796.
- **Fusetani, N. and Matsunaga, S.** (1993) *Chem. Rev.* 93, 1793.
- **Froy O., Sagiv T., Poreh M., Urbach D., Zilberberg N., Gurevitz M.** (1999) Dynamic Diversification of a Putative Common

Ancestor of Scorpion Toxins Affecting Sodium, Potassium, and Chloride Channels. *J. Mol. Evol.* 48, 187-196.

- **García, M.L., Hanner, M., Knaus, H.G., Schmalhofer, W., Slaughter, S.R. and Kaczorowski, J.G.** (1997) Pharmacology of potassium channels. *Advances in Pharmacology.* 39, 425-470.

- **García, M.L., Hanner, M., Knaus, H.G., Slaughter, R. and Kaczorowski, G.J.** (1999) Scorpion toxins as tools for studying potassium channels. *Methods in Enzymology.* 294, 624-639.

- **García, E., Scanlon, M. and Naranjo D.** (1999) A Marine Snail Neurotoxin Shares with Scorpion Toxins a Convergent Mechanism of Blockade on the Pore of Voltage-gated K^+ Channels. *J. Gen. Physiol.* 114, 141-157.

- **Gendeh, G.S., Young, L.C., de Medeiros, C.L.C., Jeyaseelan, K., Harvey, A.L. and Chung, M.C.M.** (1997) A new Potassium Channel Toxin from the Sea Anemone *Heteractis magnifica*: Isolation, cDNA Cloning, and Functional Expression. *Biochemistry.* 36, 11461-11471.

- **Gibney, R.B., Rabanal, F. and Dutton L.P.** (1997) Synthesis of novel proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.*

- **Goldstein, S.A.N., Pheasant, D.J. and Miller, C.** (1994) The charybdotoxin receptor of a Shaker K^+ channel: peptide and channel residues mediating molecular recognition. *Neuron.* 12, 1377-1388.

- **Gray, W.R.** (1993) Disulfide structures of highly bridged peptides: A new strategy for analysis. *Protein Sci.* 2, 1732-1748.

- **Green, W.N. and Millar, N.S.** (1995) Ion-channel assembly. *Trends in Neurosciences.* 18(6), 280-285.

- **Gurrola B.G., Rosati B., Rocchetti M., Pimienta G., Zaza A., Arcangeli A., Olivetto M., Possani L.D. y Wanke E.** (1999) A toxin to nervous, cardiac, and endocrine ERG K^+ channels isolated from *Centruroides noxius* scorpion venom. *The FASEB J.* 13, 953-962.

- **Gutte, B. and Merrifield, R.B.** (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 1922-1941.

- **Guy, H.R. and Conti, F.** (1990) Pursuing the structure and function of voltage-gated channels. Trends in Neurosciences. 13(6), 201-206.
- **Hackeng, T.M., Griffin, J.H. and Dawson, P.E.** (1999) Protein synthesis by native chemical ligation: Expanded scope by using straightforward methodology. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96, 10068-10073.
- **Harvey, A.L., and Anderson, A.J.** (1991) In Snake Toxins (Harvey, A.L., pp. 131-164), Pergamon, New York.
- **Hassani, O.** (1999) Aah VI, a novel, N-glycosylated anti-insect toxin from *Androctonus australis hector* scorpion venom: isolation, characterization, and glycan structure determination. FEBS Lett. 443(2), 175-180.
- **Heitz A., Le-Nguyen D. and Chiche L.** (1999) Min-21 and Min 23, the Smallest peptides that Fold like Cystine-Stabilized Beta-Sheet Motif: Design, Solution Structure, and Thermal Stability. Biochemistry. 38, 10615-10625.
- **Heginbotham, L.** (1999) Growing momentum in the molecular study of ion channels. Nat. Struct. Biol. 6(9), 811-813.
- **Hidalgo, P. and MacKinnon, R.** (1995) Revealing the architecture of a K⁺ channel pore through mutant cycles with a peptide inhibitor. Science. 268, 307-310.
- **Hille, B.** (1992) Ion channels of excitable membranes. 2nd ed. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- **Hogan Jr., C.J.** (1996) Directed combinatorial chemistry. Nature SUPP. 384, 17-19.
- **Hruby, V.J. and Meyer, J.P.** (1998) Chemical Synthesis of Peptides. In Bioorganic Chemistry: Peptides and Proteins. (Hecht, S.M., ed) Chapter 2, pp. 27-64. Oxford University Press, Inc, New York.
- **Hubbard, E. R.** (1997) Can drugs be designed? Curr. Opin. In Biotech. 8, 696-700.

- **Humphrey, J.M. and Chamberlain, A.R.** (1997) Chemical Synthesis of Natural Product Peptides: Coupling Methods for the Incorporation of Noncoded Amino Acids into Peptides.
- **Itoh, T., Tanaka, T., Nagai, R., Kamiya, T., Sawayama, T., Nakayama, T., Tomoike, H., Sakurada, H., Yazaki, Y. and Nakamura, Y.** (1998) Genomic organization and mutational analysis of HERG, a gene responsible for familial long QT syndrome. *Hum. Gen.* 102, 435-439.
- **Jan, L.Y. and Jan, Y.N.** (1994) Potassium channels and their evolving gates. *Nature.* 371, 119-122.
- **Kent S.B.H.** (1988) Chemical synthesis of peptides and proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 57, 957-989.
- **Kharrat, R., Mansuelle P., Sampieri F., Crest M., Oughideni R., Rietschoten V. J., Martin-Euclaire M. F., Rochat H., El Ayeb M.** (1997) Maurotoxin, a four disulfide bridge toxin from *Scorpio maurus* venom: purification, structure and action on potassium channels. *FEBS Letters* 406, 284-290.
- **Leeson, D.P. and Rees C.D.** (1999) Next generation therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3, 369-372.
- **Li, H., Zhao, T., Jin, L., Wang, M., Zhang, Y. and Wang, D.** (1998) A series of bioactivity-variant neurotoxins from scorpion *Buthus martensii* Karsch: purification, crystallization and crystallographic analysis. *Acta Crystallographica.* D55, 341-344.
- **MacKinnon, R.** (1991) Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature.* 500, 232-235.
- **MacKinnon, R. and Miller, C.** (1988) Mechanism of charybdotoxin block of Ca^{2+} -activated K^+ channels. *J. Gen. Physiol.* 91, 335-349.
- **MacKinnon, R., Reinhart, P.H. and White M.M.** (1988) Charybdotoxin block of Shaker K^+ channels suggests that different types of K^+ channels share common structural features. *Neuron.* 1, 997-1001.
- **Matthews, C.R.** (1993) Pathway of protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 653-683.

- Ménez, A., Bontems, F., Roumestand, C., Gilquin, B. and Toma, F. (1992) Structural basis for functional diversity of animal toxins. Proceedings of the Royal Society of Edinburg. 99B(1/2), 83-103.
- Merrifield, R.B. (1963) J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149-2154.
- McIntosh, J.M., Santos, A.D. and Olivera B.M. (1999) Conus peptides targeted to specific nicotinic acetylcholine receptor subtypes. Annu. Rev. Biochem. 68, 59-88.
- Miller, C. (1985a) The Charybdotoxin Family of K⁺ Channel-Blocking Peptides. Neuron. 15, 5-10.
- Miller, C. (1996) The inconstancy of the human heart. Nature. 379(6568), 767-768.
- Miller, C., Moczydlowski, E., Latorre, R. and Phillips, M. (1985b) Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca²⁺-activated K⁺ channels from mammalian skeletal muscle. Nature. 313, 316-318.
- Milton, de L. R.C., Milton, F.C. S. y Adams, A. P. (1990) J. Am. Chem. Soc. 112, 6046-6051.
- Miranda, F., Kopeyan, C., Rochat, C. and Lissitzky, S. (1970) Purification of animal neurotoxins. Isolation and characterisation of eleven neurotoxins from the venom of the scorpions *Androctonus australis Hector*, *Buthus occitanicus tunetanus* and *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. Eur. J. Biochem. 16, 514-523.
- Misawa, S. and Kumagai, I. (1999) Refolding of Therapeutic Proteins Produced in *Escherichia coli* as Inclusion Bodies. Biopolymers. 51, 297-307.
- Nakanishi, H. and Kahn M. (1998) Peptide Mimetics in : Bioorganic Chemistry : Peptides and Proteins (Hecht, S.M., ed.) Oxford University Press Inc. Chapter 12, 395-420.
- Narasimhan, L., Singh, J., Humblet, C., Guruprasad, K. and Blundell L.T. (1994) Snail and spider toxins share a similar tertiary structure and "cystine motif". Nat. Struct. Biol. 1(12), 850-852.

- **Nichols, G.C. and Lopatin, N.A.** (1997) Inward rectifier potassium channels. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 171-191.
- **Nisbet, J.S. and Moore, M.** (1997) Will natural products remain an important source of drug research for future?. *Curr. Opin. Biotech.* 8, 708-712.
- **Noren, C.J., Anthony-Cahill, S.J., Griffith, M.C. and Schultz, P.G.** (1989) *Science.* 244, 182-188.
- **Norton, S. N. and Pallaghy, K. P.** (1998) The cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptides. *Toxicon.* 36, 1573-1583.
- **Oren, A. D., Froy, O., Amit, E., Kleinberger-Doron, N., Gurevitz, M. and Shaanan B.** (1998) An excitatory scorpion toxin with a distinctive feature: an additional alfa-helix at the C terminus and its implications for interaction with insect sodium channels. *Structure.* 6, 1095-1103.
- **Pallaghy, K.P., Nielsen, J.K., Craik J.D. and Norton S.R.** (1994) A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple-stranded Beta-sheet in toxic and inhibitory polypeptides. *Protein Sci.* 3, 1833-1839.
- **Pardo, A.L., del Camino, D., Sánchez, A., Alves, F., Bruggemann, A., Beckh, S. and Stuhmer, W.** (1999). Oncogenic potential of EAG K⁺ channels. *The EMBO J.* 18(20), 5540-5547.
- **Park, C.S., and Miller, C.** (1992) Intreraction of charybdotoxin with permeant ions inside the pore of a K⁺ channel. *Neuron* 9, 307-313.
- **Peng, Z. and Kim, P.S.** (1994) A protein dissection study of molten globule. *Biochemistry.* 33, 2131-2141.
- **Petsko, A.G.** (1996) For medicinal purposes. *Nature SUPP.* 384, 7-9.
- **Ptitsyn, B.O.** (1995a) Structures of folding intermediates. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 74-78.
- **Ptitsyn, B.O.** (1995b) Molten globule and protein folding. *Adv. Prot. Chem.* 47, 35-43.

- **Possani, L.D.** (1984) Insect poisons, allergens, and other invertebrate venoms. Handbook of Natural Toxins (Tu, A.T., ed.) Marcel Dekker, Inc. pp.513-550.
- **Possani, L. D., Becerril, B., Delepierre, M. and Tytgat, J.** (1999a) Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. Eur. J. Biochem. 264, 287-300.
- **Possani, L. D., Martin, B., and Svensen, I.** (1992) The primary structure of Noxiustoxin: a K⁺ channel blocking peptide from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. Carlsberg Res. Comm. 47, 285-289.
- **Possani, L.D., Selisko, B. y Gurrola, B.G.** (1999b) Structure and function of scorpion toxins affecting K⁺-channels. Perspectives in Drug Discovery and Design. 15/16, 15-40.
- **Rasmusson, L. R., Morales, J.M., Wang, S., Liu, S., Campbell, L.D., Brahmajothi, V. M., Strauss, C.H.** (1998) Inactivation of Voltage-Gated Cardiac K⁺ Channels Circ Res. 82, 739-750.
- **Rigby, A.C., Lucas-Meunier, E., Kalume, D.E., Czerwiec, E., Hambe, B., Dahlqvist, I., Fossier, P., Baux, G., Roepstorff, P., Baleja, J.D., Furie, B.C., Furie, B. and Stenflo, J.** (1999) A conotoxin from *Conus textile* with unusual posttranslational modifications reduces presynaptic Ca²⁺ influx. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96, 5758-5763.
- **Sakakibara, S.** (1999) Chemical Synthesis of Proteins in Solution. Biopolymers. 51, 279-296.
- **Sanguinetti, M. C., Jiang, C., Curran, M.E. and Keating, M.T.** (1995) A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I_{Kr} potassium current. Cell. 81(2), 299-307.
- **Sanguinetti, M.C., Curran, M.E., Spector, P.S. and Keating, M. T.** (1996) Spectrum of HERG K⁺ channel dysfunction in an inherited cardiac arrhythmia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93, 2208-2212.
- **Scanlon, M.J., Naranjo, D., Thomas, L., Alewood, P.F., Lewis, J. and Craik, D.** (1997) Solution structure and proposed binding

mechanism of a novel potassium channel toxin kappa-conotoxin PVIIA. Structure. 5, 1585-1597.

- **Schulman, A. B and Kim, S.P.** (1996) Proline sacnning mutagenesis of a molten globule reveals non-cooperative formation of a protein's overall topology. Nat. Struct. Biol. 3, 682-687.

- **Schultz, R.M. and Liebman, M.N.** (1997) Proteins I : Composition and Structure. In Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations (Devlin, T.M., ed) 4th ed. pp. 23-85. Wiley-Liss, Inc., New York.

- **Seiber, P., Kamber, B., Hartmann, A., Johl, A., Riniker, B., Rittel, W.** (1974) Total synthese von human insulin unter gezielter bildung der dislfidbindugen. Helv. Chem. Acta. 57, 2617-2621.

- **Selisko, B., García, C., Becerril, B., Gómez-Lagunas, F., Garay, C. and Possani L.D.** (1998) Cobatoxins 1, and 2 from Centruroides noxius Hoffmann constitute a subfamily of channel-blocking scorpion toxins. Eur. J. Biochem. 24, 468-479.

- **Silow, M., and Oliveberg, M.** (1997) Transient aggregates in protein folding are easily mistaken for folding intermediates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94, 6084-6086.

- **Soroceanu, L. Manning, T.J. and Sontheimer, H.** (1999) Modulation of glioma cell migration and invation using Cl⁻ and Na⁺ ion channel blockers. J. Neuroscience 19, 5942-5954.

- **Stewart, J.M. and Young, J.D.** (1984) Solid Phase Chemical Synthesis , 2nd Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, IL.

- **Tam, J.P., Wu, C.-R., Liu, W. and Zhang, J.W.** (1991) Disulfide Bond Formation in Peptides by Dimethyl Sulfoxide. Scope and Applications. J. Am. Chem. Soc. 113, 6657-6662.

- **Tamaoki, H., Miura, R., Kusunoki, M., Kyogoku, Y., Kobayashi Y. and Moroder, L.** (1998) Folding motifs induced and stabilized by distinct cystine frameworks. Protein Engineering, 11(8), 649-659.

- **Tatusov, R.L., Koonin, E.V. and Lipman, D.J.** (1997) A genomic perspective on protein families. In *Genome Issue: Building Gene Families*. Science. 278, 631-637.
- **Terlau, H., Shon, K.J., Grilley, M., Stocker, M., Stuhmer, W. and Olivera, B.M.** (1996) Strategy for rapid immobilization of prey by a fish-hunting marine snail. *Nature*. 381, 148-151.
- **Tierney, M.L. and Stowell, M.H.B.** (1998) The functional significance of multimerization in ion channels. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 186-188.
- **Trémeau, O., Lemaire, C., Drevet, P., Pinkasfeld, S., Duncancel, F., Boulain, J. and Ménez, A.** (1995) Genetic Engineering of Snake Toxins. *J. Biol. Chem.* 270(16), 9362-9369.
- **Tudor, J.E., Pallaghy, P.K., Pennington, M.W. and Norton, R.S.** (1996) Solution structure of ShK toxin, a novel potassium channel inhibitor from a sea anemone.
- **Tytgat, J., Chandy, G., García, M.L., Gutman, A.G., Martin-Eauclaire, M.F., van der Walt, J.J. and Possani, L.D.** (1999) A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alka-KTx molecular subfamilies. *Trends in Pharmacological Sciences*. 20, 444-447.
- **Ulrich, N. and Asontheimer, H.** (1998) Biophysical and pharmacological characterization of chloride currents in human astrocytoma cells. *Am. J. Physiol.* 270, C1511-1521.
- **Veber, F.D., Drake, H.F. and Gowen, M.** (1997) The new partnership of genomics and chemistry for accelerated drug development. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1, 151-156.
- **Verdine, L.G.** (1996) The combinatorial chemistry of nature. *Nature SUPP.* 384, 11-13.
- **Vita, C.** (1997) Engineering novel proteins by transfer of active sites to natural scaffolds. *Curr. Opin. Biotech.* 8, 429-434
- **Vita, C., Roumestand, C., Toma, F. and Ménez, A.** (1995) Scorpion toxins as natural scaffolds for protein engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 6404-6408.

- Vita, C., J., Drakopoulou, E., Zinn-Justin, S., Gilquin, B. and Ménez, A. (1998) Novel Miniproteins Engineered by the Transfer of Active Sites to Small Natural Scaffolds. *Biopolymers*. 47, 93-100.
- Vita, C., Drakopoulou, E., Vizzanova, J., Rochette, S., Martin, L., Ménez, A., Roumestand, C., Yang, Y., Ylisastigui, L., Benjouad, A. and Gluckman, J.C. (1999) Rational engineering of a miniprotein that reproduces the core of the CD4 site interacting with HIV-1 envelope glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96(23), 13091-13096.
- Wang, Q., Bowles, E. and Towbin, J. A. (1998) The molecular basis of long QT syndrome and prospects for therapy. *Mol Med Today*. 4, 382-388.
- Warmke, J.F. and Ganetsky, B. (1994) A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91, 3438-3442.
- Wei, C., Tang, B., Zhang, Y. and Yang, K. (1999) Oxidative refolding of recombinant prochymosin. *Biochem. J.* 340, 345-351.
- Wilken, J. and Kent, S.B.H. (1998) Chemical Protein Synthesis. *Curr. Opin. Biotech.* 9, 412-426.
- Wolynes, P.G., Onuchic, N. J. and Thirumalai, D. (1995) Navigating the Folding Routes. *Science*. 267, 1619-1620.
- Wymore, S.R., Gintant, A.G., Wymore, T.R., Dixon E. J., McKinnon, D. and Cohen, S. I. (1997) Tissue and Species Distribution of mRNA for the Ikr-like K⁺ Channel, erg. *Circ Res*. 80, 261-268.
- Zhang, L. and Tam, J.P. (1997) Synthesis and application of unprotected cyclic peptides as building blocks for peptide dendrimers. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 2363-2370.
- Zin-Justin, S., Guennegues, M., Drakopoulou, E., Gilquin, B., Vita, C. and Ménez, A. (1996) Transfer of a Beta-Hairpin from the Functional Site of Snake Curare-mimetic Toxins to the alpha/beta Scaffold of Scorpion Toxins: Three-Dimensional Solution Structure of the Chimeric Protein. *Biochemistry*. 35, 8535-8543.