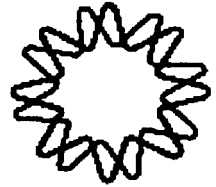


00591
7



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

IBT/UNAM

**ESTUDIO DE LA INTERACCION DE TOXINAS
DE ALACRANES MEXICANOS SOBRE EL
MAXICANAL DE POTASIO
ACTIVADO POR CALCIO**

T E S I S
Que para obtener el grado de:
DOCTOR EN CIENCIAS
P r e s e n t a
JOSE DE JESUS GARCIA VALDES

Febrero del 2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS:

A mi tutor y amigo Dr. Lourival D. Possani Postay, por todo su apoyo ofrecido, por su empuje, por creer en mí, y por su gran paciencia para conmigo (sobre todo en la etapa final de esta tesis).

A la Dra Ligia Toro de Stefani, por la oportunidad que me brindó de aprender las técnicas electrofisiológicas empleadas.

A los miembros del Comité Tutorial, por guiar este trabajo durante todo el trayecto.

A los miembros del Jurado, por sus observaciones y comentarios que hicieron que este trabajo se enriqueciera. En forma especial agradezco al Dr Ricardo Félix Grijalva.

A Martha: por su verdadera amistad , ayuda y atinadas observaciones para mejorar el contenido de este trabajo.

A Genaro, Georgina y Adriana, por su ayuda en la purificación de los venenos y péptidos usados. A Fernando y César por su cooperación en la determinación de la secuencia de las toxinas estudiadas.

A los demás compañeros y amigos del laboratorio, que de manera indirecta también contribuyeron: Consuelo, Liliana, Linda, María, Marisol, Alfonso, Alfredo, Baltazar, Cipriano, Freddy, Renaud, Ricardo y Timo.

Dedico este trabajo a:

Mi esposa Maria del Carmen.

Mis hijos: Vania Gabriela, Mariana y José Eduardo

Mis padres: Inocencia y Eduardo

Mis Hermanos: Cristina, Rebeca, Gabriel, Antonio, Jaime, Eduardo,
Verónica y Fabiola.

Mis amigos de siempre: Fernando, Martha, Sandra, Victor y Ciro

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

Tesis Doctoral:

“Estudio de la interacción de toxinas de alacranes mexicanos sobre el maxicanal de potasio
activado por calcio”

que para obtener el grado de Doctor en Ciencias presenta
José de Jesús García Valdés.

Lugar donde se desarrolló el tema:

Laboratorio del Dr. Lourival D. Possani Postay, del Departamento de Reconocimiento Molecular y Bioestructura del Instituto de Biotecnología/UNAM. Cuernavaca, Morelos.

El Comité Tutorial que evaluó el avance del proyecto de investigación estuvo integrado por los Drs. Claudia Lydia Treviño Santacruz, Ligia Toro de Stefani, Froylán Miguel Gómez Lagunas y Lourival D. Possani Postay

El Jurado de la réplica oral de este trabajo estuvo formado por los Drs. Baltazar Becerril Luján, Alejandra Bravo de la Parra, Joel Osuna Quintero, Omar Homero Pantoja Ayala, Lourival D. Possani Postay, Jose Luis Puente García y Adela Rodríguez Romero.

Este trabajo fue financiado en parte por los donativos: CONACYT 31691N y Z-005, DGAPA-IN216900 y Howard Hughes Medical Institute 55000574. El Estudiante recibió el apoyo económico del CONACYT (# registro 36932) y de la DGEP-UNAM.

Índice

	LISTAS DE:	
	ABREVIATURAS	4
	FIGURAS	6
	TABLAS	6
	RESÚMEN	7
	SUMMARY	8
1	INTRODUCCIÓN	9
1.1	Canales iónicos	9
1.1.1	Canales selectivos a potasio	9
1.1.2	Canales de potasio activados por calcio	12
1.1.3	Subunidades reguladoras beta	15
1.2	Toxinas de alacrán	19
1.2.1	α K-Toxinas	19
1.2.2	Relación estructura-función	21
1.2.3	Toxinas bloqueadoras del MaxiK	23
1.3	Antecedentes	25
1.3.1	Justificación	26
1.4	Objetivos	27
1.4.1	Objetivo General	27
1.4.2	Objetivos Particulares	27
2	MATERIALES Y MÉTODOS	28
2.1	Soluciones para registro electrofisiológico	28
2.2	Obtención de los ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	28
2.3	Expresión de canales de potasio en ovocitos	29
2.4	Caracterización del MaxiK	30
2.5	Aislamiento y separación de toxinas de alacrán	32
2.6	Secuencia aminoacídica de péptidos puros	33
2.7	Bloqueo del MaxiK por fracciones y veneno total de alacrán	33
2.8	Determinación de las constantes de asociación, k_{on} ; disociación, k_{off} ; y de afinidad K_d de péptidos puros.	34
2.9	Obtención de estructuras tridimensionales y potenciales electrostáticos de toxinas y canales	37
3	RESULTADOS	38
3.1	Resultados publicados	38

3.1.1	Aislamiento y caracterización del veneno de <i>C. noxius</i>	38
3.1.2	Secuencia primaria de la fracción II.2.22	39
3.1.3	Afinidad de la toxina α KTx1.11 por el MaxiK	41
3.1.4	Modulación de la interacción de SloTx-MaxiK por subunidades beta (β)	43
3.1.5	Especificidad de la SloTx sobre el MaxiK	44
3.2	Resultados no publicados	45
3.2.1	<i>Anuroctonus phaiodactilus</i>	46
3.2.2	<i>Centruroides exilicandu</i>	47
3.2.3	<i>Centruroides sculpturatus</i>	50
3.2.4	<i>Hadrurus gertschi</i>	52
4	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	54
	BIBLIOGRAFÍA	64
	APÉNDICES 1-7	75

ABREVIATURAS

A	amperios
Å	Angstrongs
aa	aminoácido(s)
BSA	álbumina de suero bovina
Ca ²⁺	ión calcio
Cl ⁻	ión cloruro
CLAR	cromatografía líquida de alta resolución
Da	Dalton
E _m	potencial de membrana
EM	espectrometría de masas
G	Giga (10 ⁹)
g	conductancia
HEDTA	ácido N-(2hidroxietil)etiléndiaminotriacético
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1piperazinetasulfónico
H _p	potencial de mantenimiento
I	corriente
I _L	corriente de fuga
I ₀	corriente inicial
I _{eq}	corriente en el estado de equilibrio
K ⁺	ión potasio
k	kilo (10 ³)
K _d	constante de disociación
<i>k_{off}</i>	constante cinética de disociación
<i>k_{on}</i>	constante cinética de asociación
M	concentración molar, mega (10 ⁶)
Mg	ión magnesio
m	metro, mili (10 ⁻³)
MES	metanosulfonato
n	nano (10 ⁻⁹)
Na	ión sodio
p	pico (10 ⁻¹²)
RMN	resonancia magnética nuclear
S	Siemens, Segmento
TFA	ácido trifluoroacético

TEA	tetraetilamonio
V	Voltio
α	alfa
β	beta
μ	micro (10^{-6})
Ω	Ohmio

Alacranes:

<i>A. p.</i>	<i>Anuroctonus phaiodactilus</i>
<i>C. n.</i>	<i>Centruroides noxius</i>
<i>C. e.</i>	<i>Centruroides exilicauda</i>
<i>C.s.</i>	<i>Centruroides sculpturatus</i>
<i>H.g.</i>	<i>Hadrurus gertschi</i>

Toxinas:

ChTx	Caribdotoxina
IbTx	Iberiotoxina
SloTx	Slotoxina
KTx	Kaliotoxina
AgTx	Agitoxina
LbTx	Limbatustoxina

Canales de potasio:

BK	de alta conductancia activado por calcio
<i>herg</i>	gene relacionado al canal éter <i>a-go-go</i> humano
IRK	recificador entrante
Kv	dependientes de voltaje
MaxiK	de alta conductancia activado por calcio
<i>Sh-IR</i>	<i>Shaker</i> sin la bola de inactivación
SK	de baja conductancia activado por calcio
<i>slo</i>	de alta conductancia activado por calcio

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1.	Canales de potasio en organismos superiores.	10
Figura 2.	Modelo de plegamiento membranal para canales de potasio dependientes de voltaje.	12
Figura 3.	Modelo de la disposición transmembranal del MaxiK.	14
Figura 4.	Alineamiento de las cuatro subunidades reguladoras β del MaxiK.	16
Figura 5.	Coexpresión de subunidades $\alpha+\beta$ del MaxiK.	17
Figura 6.	Representación esquemática de la subunidad β_1 de músculo liso de aorta de bovino.	18
Figura 7.	Interacciones canal-toxina.	24
Figura 8.	Corrientes salientes del hsls en ovocitos de <i>Xenopus</i> .	32
Figura 9.	Curso temporal de corriente normalizada para la unión y lavado de toxina sobre canales de potasio.	36
Figura 10.	Separación del veneno de <i>C. noxius</i> y espectro de masas del péptido inhibidor	40
Figura 11.	Secuencia primaria de α KTx1.11	41
Figura 12.	Inhibición de corrientes del MaxiK por SloTx (α KTx1.11).	42
Figura 13.	Bloqueo de corrientes del MaxiK formado por complejos $\alpha+\beta_1$ ó $\alpha+\beta_4$.	44
Figura 14.	Separación del veneno de <i>Anuroctonus phaiodactilus</i> .	46
Figura 15.	Separación del veneno total de <i>C. exilicauda</i> y ensayo de algunos de sus componentes sobre corrientes macroscópicas del MaxiK.	48
Figura 16.	Curso temporal de corriente normalizada para experimentos de inhibición del MaxiK por CeTx.	49
Figura 17.	Secuencia primaria de la toxina CeTx.	50
Figura 18.	Separación del veneno total de <i>C. sculpturatus</i> .	51
Figura 19.	Separación del veneno de <i>H. gertschi</i> por tamaño molecular y ensayos funcionales sobre el MaxiK.	52
Figura 20.	Caricatura de la disposición tridimensional del MaxiK y las subunidades β .	56
Figura 21.	Alineamiento de SloTx, BmTx, BeKm-1 y ErgTx.	59

LISTA DE TABLAS.

Tabla 1.	Estructuras tridimensionales reportadas de las toxinas α KTx.	22
Tabla 2.	Enzimas usadas para linearizar el cDNA y para la obtención del cRNA.	30
Tabla 3.	Especificidad de la toxina α KTx1.11	45

RESÚMEN

En este trabajo se probó la actividad del veneno, y fracciones de éste, de cinco especies de alacranes mexicanos sobre la función del MaxiK expresado en ovocitos de *X. laevis*. Los venenos de *C. noxius* y *C. exilicauda* bloquearon al MaxiK de manera importante no así los de *C. sculpturatus* y *A. phaiodactilus* que son prácticamente inocuos. Por otra parte, el de *H. gertschi* provoca lisis de la membrana. Al final de varios pasos de separación se aisló un péptido de 37 residuos del veneno de *C. noxius* que bloquea al MaxiK con alta afinidad y selectividad. Por su actividad sobre los canales *slo* y semejanza con la secuencia consenso de la subfamilia α KTx1 se le llamó Slotoxina (SloTx : α KTx1.11). Esta toxina presenta identidad del 75% y 54% con IbTx y ChTx respectivamente. Mediante la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (configuración lo de afuera hacia afuera) se obtuvieron las constantes de asociación, disociación, y de afinidad sobre el MaxiK ($K_d \sim 1.5$ nM). Se investigó si SloTx bloquea a la subunidad α coexpresada con subunidades β (β_1 ó β_4). La asociación de SloTx con complejos $\alpha+\beta$ es 10 veces más lenta comparada con aquella para IbTx y ChTx. Esto permitiría considerarla como una mejor herramienta para discriminar entre complejos $\alpha+\beta$. La actividad de SloTx se ensayó en varios canales: *dslo* (*Drosophila* MaxiK), *herg*, IRK, Kv1.1, Sh-IR, SK1, SK2 y SK3. Se encontró que no bloquea a ninguno de ellos a concentraciones de hasta 300-500 nM. Por ello se considera que al igual que IbTx, la SloTx es altamente selectiva sobre el MaxiK. Por último se trató de explicar esta selectividad en base a propiedades estructurales y electrostáticas de varias toxinas y canales. Para ello se obtuvieron las estructuras mediante modelaje por homología. Se presume que la interacción electrostática y orientación son claves para estabilizar o desestabilizar la interacción canal-toxina.

SUMMARY

In this thesis, the activity of five mexican scorpion venoms was tested on MaxiK channels expressed in *X. laevis* oocytes. Venoms from *C. noxius* and *C. exilicauda* were active, however, those from *C. sculpturatus* and *A. phaiodactilus* were innocuous. *H. gertschi* venom showed litic properties on oocyte membrane. We isolated a blocking peptide (37 residues long) from *C. noxius* scorpion venom. Its sequence is similar to the consensus sequence for the Charybdotoxin (ChTx) sub-family. Thus, was named Slotoxin (SloTx: α KTx1.11). It has 75% sequence identity with Iberiotoxin (IbTx) and 54% with ChTx. Patch clamp experiments were assassed to calculate association, dissociation and affinity constants. SloTx blocks the MaxiK α subunit reversibly ($K_d \sim 1.5$ nM). Slotoxin association with $\alpha + \beta$ (β_1 or β_4) channels was approximately 10 times slower than those for IbTx and ChTx, leading to a lack of effect on $\alpha + \beta_4$ when tested at 100 nM for 5 min. Thus, Slotoxin is a better tool to distinguish MaxiK $\alpha + \beta$ complexes.

SloTx was tested in different types of potassium chanel: *dslo* (*Drosophila* MaxiK), *herg*, IRK, Kv1.1, *Sh-IR*, SK1, SK2 y SK3. Similar to IbTx, SloTx is quite selective. We got some approximate structures by homology modelling. We discussed about the structural and electrostatic determinants that could play an important rol in the channel-toxin interaction.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 *Canales iónicos*

Los canales iónicos son proteínas de membrana que permiten el flujo de iones a través de ésta y están involucrados en muchas funciones biológicas importantes como la señalización en el sistema nervioso, procesos osmóticos, regulación metabólica, secreción hormonal y tono vascular entre otros (Hille, 2001). Los canales son poros acuosos estrechos bien definidos que para funcionar adecuadamente deben convertirse en excelentes agentes químicos: 1) para sentir diferentes señales biológicas en el ambiente y responder rápidamente cambiando del estado cerrado al abierto, y viceversa; 2) en la adaptación del estado abierto conductor para discriminar entre diferentes iones inorgánicos con el fin conducir al ión correcto (Miller, 2000b). En el proceso de permeación se llevan a cabo interacciones específicas entre el acarreador de carga (ión duro: alcalino, alcalino-térreo o halógeno) y la proteína. Este proceso debe ser lo suficientemente ágil y rápido para enfrentar el reto químico presentado por los iones mediante la adecuada orientación de grupos carbonilo, éter, amido, amonio (Miller, 1993) hidroxilo o bien de tipo electrostáticas (Dutzler et al., 2002). Los iones permeantes fluyen a través de los canales a favor del gradiente electroquímico de manera muy rápida ($>10^6$ iones/s) y eficiente (error $\approx 0.1\%$). Existen cuatro familias de canales agrupadas de acuerdo a la selectividad iónica que presentan: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- .

1.1.1 *Canales selectivos a potasio*

Los canales selectivos a potasio son el grupo de canales iónicos que presentan la mayor diversidad en cuanto a mecanismo de compuerta, farmacología y propiedades conductoras. Son prácticamente ubicuos y su aparición en el universo biológico sugiere que son proteínas que aparecieron más temprano en la evolución (Miller, 2000a) y que tal vez de ellas se derivaron los canales de calcio y sodio (Anderson y Greenberg, 2001).

Los canales de potasio se pueden clasificar de acuerdo a la topología de segmentos transmembranales (TM) que presenta la subunidad α formadora del poro. En organismos superiores se propone que existen dos grandes sub-familias de dos y seis segmentos, véase

figura 1. Existen tambien arreglos sucesivos de éstos: dos y dos segmentos (4TM) (Hille, 2001), seis y dos segmentos (8TM) (Ishibashi et al., 2000).

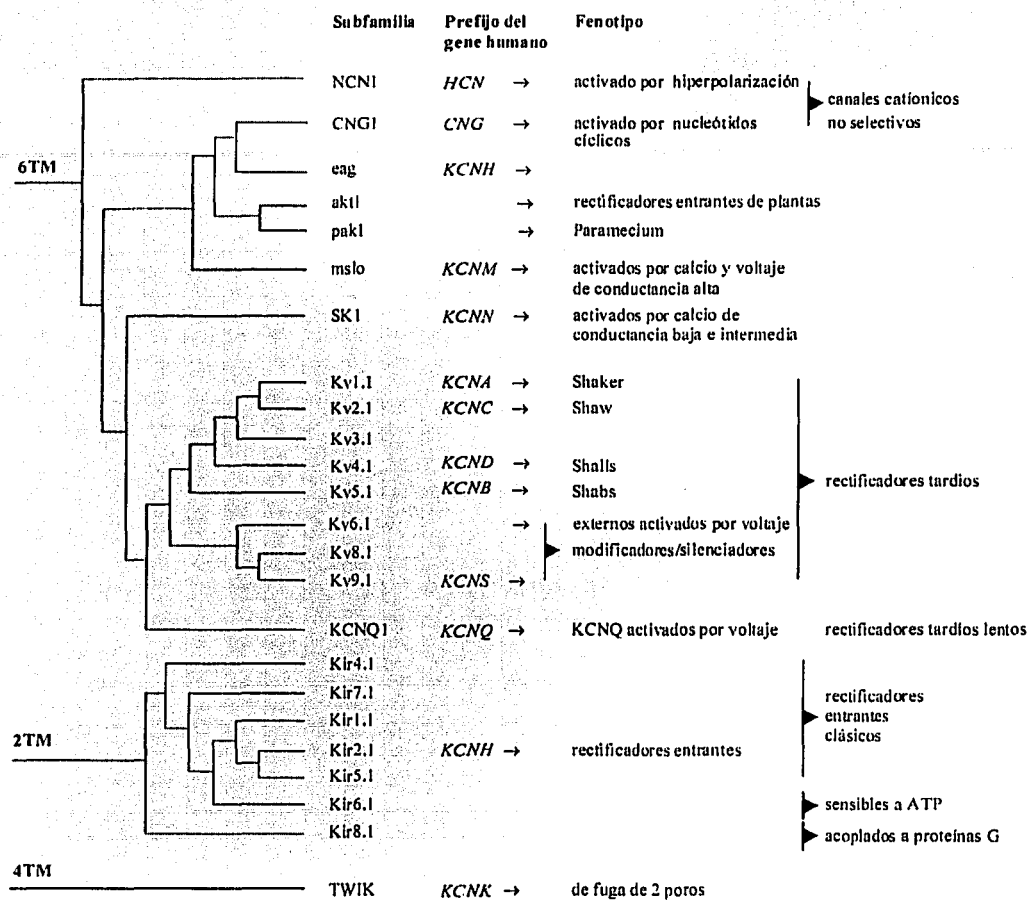


Figura 1: *Canales de potasio en organismos superiores. Los canales de potasio se han agrupado de manera gruesa de acuerdo a la similitud de secuencia primaria y a la topología que presentan en la membrana (2TM, 4TM y 6TM). Este diagrama fué realizado con 89 secuencias de canales. Tomado de Hille (2001).*

La sub-familia más estudiada presenta un núcleo de seis segmentos transmembranales (S1-S6). Los segmentos S1-S3 forman la interfase entre la membrana lipídica y el poro acuoso. El segmento cargado S4 es, al parecer, la parte más importante del sensor de voltaje. Los segmentos S5 y S6 junto con el asa que los une, forman el poro y constituyen los elementos que confieren la selectividad al canal y el sitio receptor de toxinas. En la figura 2a se muestran los segmentos transmembranales con las asas que los unen y la posible estructura helicoidal de estas últimas. Tanto el extremo N-terminal como el C-terminal son citoplasmáticos. La figura 2b muestra el arreglo espacial alrededor del eje de simetría que forma el poro según lo propone Li-Smerin et al. (2000). Existen otros arreglos propuestos por Monks et al. (1999), así como Kerr y Sansom (1995), los cuales difieren con respecto a la figura 2b por la disposición de los segmentos S5 y S6 alrededor del eje de simetría.

Otros canales como los activados por nucleótidos cíclicos o calcio se cree adquirieron esta cualidad mediante la adición de dominios propios para esta función (Anderson y Greenberg, 2001) o por el acoplamiento de otras proteínas como es el caso de la calmodulina en los canales de potasio activados por calcio de baja conductancia SK (Schumacher et al., 2001; Wissmann et al., 2001).

Los canales de potasio poseen una alta simetría dada por un ensamblaje tetramérico que podría ser crítica para el proceso de selección iónica (Doyle et al., 1998; Anderson y Greenberg, 2001). En los canales de calcio y sodio, formados por cuatro dominios de seis segmentos, esta simetría es imperfecta (Catterall, 2001). Al parecer, los canales de potasio se adaptan para estabilizar los iones K^+ y así compensarlos de la pérdida de la capa de solvatación. Lo opuesto también podría ocurrir, la presencia de potasio en el filtro de selectividad estabilizaría la conformación del estado conductor. Ahí los grupos carbonilo del esqueleto apuntan uno hacia otro y así de esta manera interactúan con el ión, en lugar de participar en puentes de hidrógeno con el disolvente o con otros grupos proteicos (Yellen, 2001).

Con la determinación de las estructuras cristalinas, alta resolución, de canales de potasio (Doyle et al., 1998; Morais-Cabral et al., 2001; Zhou et al., 2001) y cloro (Dutzler et al., 2002); además de las estructuras tridimensionales, baja resolución, de los canales *Shaker* (Sokolova et al., 2001) y de sodio (Sato et al., 2001), se han corroborado muchas de las aseveraciones que

años atrás se habían propuesto por estudios electrofisiológicos, bioquímicos y farmacológicos. A pesar de ello aún siguen varias preguntas pendientes por aclarar.

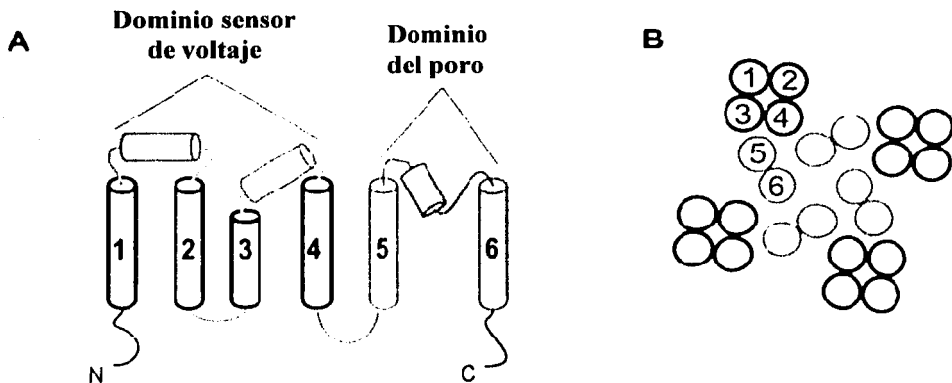


Figura 2. A) *Modelo de plegamiento membranar para canales de potasio dependientes de voltaje.* Se muestran los seis segmentos transmembranales (azul y negro), la hélice corta del poro (azul) y dos posibles hélices pequeñas (azul) que forman las asas extracelulares. Las hélices en color negro y gris forman el dominio sensor de voltaje; mientras que la región azul, el dominio del poro. B) *Possible arreglo transmembranar tetramérico de las hélices en canales voltaje-dependientes.* Tomado de Li-Smering et al (2000).

1.1.2 Canales de potasio activados por calcio

En la sub-familia de los canales de potasio 6TM están incluidos los dependientes de calcio. Existen tres tipos de estos canales de acuerdo a su conductancia unitaria: baja, SK ($g \sim 10-20$ pS); intermedia, IK ($g \sim 25-135$ pS); y alta, BK ($g \sim 150-300$ pS). Los últimos son conocidos también como MaxiK o *slo* (Atkinson et al., 1991; Latorre, 1994). En este trabajo se usarán de manera preferente los términos MaxiK o *hslo* (canal *slo* de origen humano).

El MaxiK juega un importante papel fisiológico ya que es capaz de acoplar la excitabilidad en la membrana con el estado metabólico de la célula. Esta dualidad funcional se realiza por su capacidad de sentir cambios en el voltaje transmembranar y la concentración de calcio intracelular. Por esto son considerados como los canales que traducen directamente las señales

eléctricas en señales químicas y viceversa. Se encuentran en una amplia variedad de tejidos, donde regulan su excitabilidad celular a través de un mecanismo de retroalimentación negativa.

El MaxiK puede estar formado exclusivamente por subunidades α formadoras del poro (Atkinson et al., 1991; Butler et al., 1993) o en combinación con diferentes subunidades reguladoras $\beta_{1,4}$ (Knaus et al., 1994; Wallner et al., 1999; Uebele et al., 2000; Meera et al., 2000).

Subunidad α formadora del poro.

Hasta ahora se conoce un solo gen (*slowpoke*, *slo* o KCNMA1), que codifica para la subunidad α formadora del poro. Sin embargo, se ha observado una gran diversidad en cuanto a localización, propiedades funcionales (Schreiber et al., 1998; Yuan et al., 1999; Yuan et al., 2000), farmacológicas y grado de fosforilación (Pérez et al., 1994; Alioua et al., 1998; Tian et al., 2001) del MaxiK como consecuencia de procesamiento alternativo (Adelman et al., 1992; Shipston, 2001). Además se conoce que puede formar un canal funcional mediante ensamblaje heteromérico con subunidades α de IK: *slo/slack* (Joiner et al., 1998).

El monómero (subunidad α) está formado por tres regiones distintas: el núcleo "core", la cola "tail" y una región intermedia "linker". En la figura 3 se muestra la organización del MaxiK, única entre los canales dependientes de voltaje por el número de segmentos y su organización transmembranal (Schreiber y Salkoff, 1997; Schreiber et al., 1999). Este arreglo del MaxiK es semejante, en parte, al de otros canales de potasio dependientes de voltaje (Kv) sin embargo cuenta con algunos elementos adicionales. El núcleo está formado por un N-terminal corto y extracelular seguido de nueve segmentos: siete transmembranales (S0-S6) (Meera et al., 1997) y dos citoplásmicos (S7-S8) (Jiang et al., 2001b). El segmento S0 es un segmento adicional, único en el MaxiK, que interacciona con la subunidad reguladora β_1 (Wallner et al., 1996; Toro et al., 1997). Los segmentos S1-S6 contienen las regiones características de los otros canales dependientes de voltaje: segmentos periféricos (S1-S3), sensor de voltaje (S4) y poro (S5-S6). Por otra parte, los segmentos S7-S8 forman el dominio RCK (Jiang et al., 2001a), mientras que el asa 7 (L7) es parte fundamental del dominio de tetramerización en el MaxiK (BKT1) (Quirk y Reinhart, 2001). Un sector del asa 8 (L8) se cree forma parte de lo que podría ser el transductor de la sensibilidad a calcio.

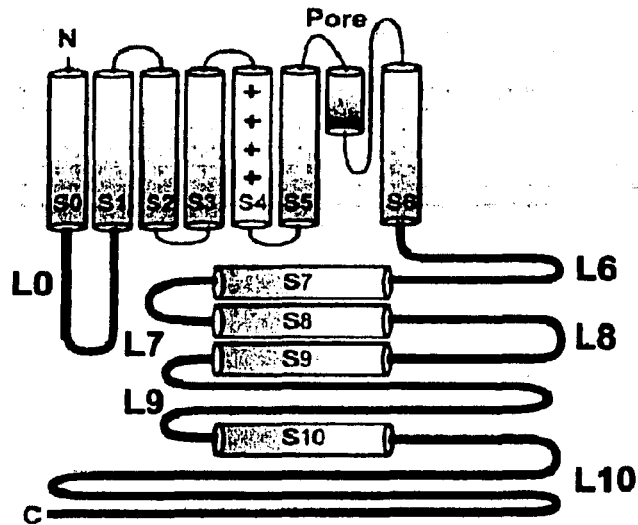


Figura 3. Modelo de la disposición transmembranal del MaxiK. El núcleo comprende los segmentos S0-S8 y las asas que los unen L0-L7. La región intermedia forma la mayor parte del asa nueve (L9). La cola está formada a partir del segmento final del asa nueve (L9), los segmentos S9 y S10 y el carboxilo terminal (L10). Tomado de Sokolova et al., (2001).

La cola, formada por los segmentos S9-S10, contiene a los elementos más importantes que le confieren sensibilidad y dependencia a calcio: una región altamente ácida denominada por Wei et al en 1994 como "tazón de calcio" (*calcium bowl*), y un motivo estructural "mano EF" (EF Hand) imperfecto (Braun y Sy, 2001). Se sabe que un fragmento de 280 aa del C-terminal del canal de *Drosophila* expresado en *E coli* une calcio de manera específica (Bian et al., 2001). Por último, la región intermedia parece ser el dominio que ayuda también al ensamblaje funcional del canal (Schreiber et al., 1999). Todos estos elementos le confieren al MaxiK funcionalidad única. Aún faltan por establecer las bases estructurales y moleculares que le confieren al MaxiK la habilidad para conducir 10 veces más rápido que otros canales de potasio sin menoscabo de su selectividad.

1.1.3 Subunidades reguladoras beta.

Knaus et al., (1994) clonaron la primera subunidad reguladora del MaxiK (β_1), a partir de experimentos de entrecruzamiento del canal y $^{125}\text{IChTx}$ con el reactivo bifuncional disuccimidil suberato (DSS). A la fecha se conocen cuatro subunidades β , todas ellas contienen dos segmentos transmembranales unidos por una gran asa extracelular con dos sitios de fosforilación, uno de ellos consenso en las cuatro familias. En la figura 4 se muestra el alineamiento de las subunidades β , y de manera particular, los cuatro productos de procesamiento alternativo de β_3 . Se muestran las cisteínas (letra c): conservadas, mayúscula y color rojo; transmembranales, minúscula y color rojo; las restantes, minúscula y color negro. Las subunidades β_2 y β_3 confieren inactivación a la subunidad alfa. En la figura 4, se observa que en el alineamiento de β el N-terminal para β_2 y β_3 presenta mayor longitud y una pequeña zona altamente cargada. Al estudiarse este fragmento de β_2 por RMN se determinó que posee una estructura compuesta por una α hélice, que trabaja como la “cadena”, y una región altamente flexible que forma la “bola” (Bentrop et al. 2001). No se conoce la estructura de ninguna otra región de las subunidades β , aunque se piensa que la estructura secundaria del asa extracelular en β_1 forma una espiral enrollada “coiled coil” (Jiang et al., 1999).

La coexpresión de α y β modifica las cinéticas de activación, desactivación e inactivación, la dependencia a Ca y voltaje, así como su farmacología (Dworetzky et al., 1996; Brenner et al., 2000; Wallner et al., 1999). La presencia de β permite que el MaxiK aumente su probabilidad de apertura a potenciales menos depolarizantes y modifica la afinidad y cinética con que las toxinas de alacrán se unen al poro (Ding et al., 1998; Wallner et al., 1995; Meera et al., 2000) como se muestra en la figura 5. Las subunidades reguladoras se expresan de manera preferencial en diferentes tejidos: β_1 , en músculo liso; β_2 , en riñón de feto (humano y ratón); β_3 , en órganos reproductores; y finalmente β_4 , en cerebro.

	1		□	o	∇		50					
β1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---MGKKLVM 7					
β2	-----	~MFIWTSGR	TSSSYRHDEK	RNIYQKIRDH	DLDDKRRKTVI	-----	38					
β3a	~MOPFSIPV	QITLGGERRR	QGRFAFPASG	KKRETDYSDG	DPLDVHKRLP	-----	48					
β3b	-----	-----	~MTAFPASG	KKRETDYSDG	DPLDVHKRLP	-----	28					
β3c	~MFPFLY	ELTAVSPSPF	PQRTAFPASG	KKRETDYSDG	DPLDVHKRLP	-----	46					
β3d	MDFSPSSSELG	FHFVAFILLT	RHRTAFPASG	KKRETDYSDG	DPLDVHKRLP	-----	50					
β4	-----	-----	-----	-----	-----	~MAKLRVAYE	9					
	51	c	c			Δ	Δ	100				
β1	AQRGGETRAL	CLGVAMVVA	VISYYILSTT	VLPLYKQVW	LE	CHLIE	-----	57				
β2	ALKAGEDRAI	LLGLAMMVC	IMMYFLLI	LLRYM	VW	TEEC	CLLA	88				
β3	S.SGQEDRAV	MLGFAMM	VLMEFLLI	ILKPFMLI	REEC	CEAIH	-----	97				
β4	Y.TEAEKSI	RLGLFLII	VVLFIFDFC	WLDPAL	DLA	EA	GLVLE	58				
	101	cΔ	c	c**	c	Δ	** **	150				
β1	TNIRDCLEELEKKR	VPLYPCLVW	VNYGV	ERWA	VLYH	EDRD	98				
β2	ASITET.FNC	SFNC	IPDCWK	LQYPCLEVY	VLLTR	SEKL	LLYH	EEETIK	137			
β3	TDIMDDWLDC	AFPC	VHCH	PKYPCLVF	VLLTR	PKA	LLHY	EEAVS	147			
β4	VQOIGEVFEFC	FFC	ADCR	YPCV	VY	VNN	EDRA	LLH	DEHLL	108		
	151	c	c			Δ	c	Δ	200			
β1	QNHCCYIP	LDY	VARA	DVEKVRARFH	E...	HDFEC	FETRE	EESS	145			
β2	INQKCYIPK	CKK	FEE	MLVGVME	FRK...	YGFHC	YADPE	HNKS	184			
β3	INPKCFYIPK	CH	DRE	LLV	ALDIKEFFD	HK	PL	PC	FPY	PA	DED	196
β4	TNPKCFYIPP	CKRE	KLE	LVMAW	RYWK	DEI	PL	PC	YF	HER	PPD	158
	201		c	c		c	c	o	250			
β1	VLYRRLYCP	ELLE	LEWPE	FLLE	GLLII	VMVKIN	QSL	LAAQR	----	191		
β2	VILEKLYCP	VLFH	LEWPE	CMMAG	VAIV	AMVKLT	QYLS	LLCER	IORIN	234		
β3	VILIKKYDGM	AIFH	CLEWPE	LLE	GLALIV	GMVRL	TOHLS	LLCEK	241		
β4	VLLHRTHDEI	VLLH	CLWPL	VGFV	VLIV	VLTIC	AKSLA	VKAE	AMKKRK	208		
	251			c					286			
β2	R-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	277		
β3	YSTVVRDEVG	GKVPYIE	CHQ	EKLCIMRRSK	GRAEKS	-----	-----	-----	-----	210		
β4	FS-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	210		

□, procesamiento alternativo; o, PKA; ∇, TK; Δ, Glicosilación;
 *, aa ChTx
 Polares sin carga Polares positivos Polares negativos
 Hidrofóbicos Aromáticos

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 4. Alineamiento de las cuatro subunidades del MaxiK (β). El alineamiento se realizó con el programa Pileup de GCG y posteriormente se realizó un reordenamiento a mano lo cual mejoró significativamente el alineamiento en las regiones de fosforilación, glicosilación y residuos importantes para la interacción con Caribdotoxina (ChTx).

La subunidad β₁ está formada por 191 aminoácidos y actualmente se ha clonado de diferentes organismos: humano (Wallner et al., 1995), conejo (Giangiacomo et al., 2000), rata, ratón (Jiang et al., 1999), perro y codorniz (Oberst et al., 1997; Ramanathan et al., 1999; Ramanathan et al. 2000). Se conoce por estudios de unión específica con ChTx que los

residuos L90, Y91, T93 y E94 podrían ser importantes en la interacción de las subunidades α y β_1 (Hanner et al., 1998; Munujos et al., 1995; Giangiacomo et al., 2000). El residuo K69 forma entrecruzamiento con la Caribdotoxina (ChTx) mediante disuccimidil-suberato. En la figura 6 se muestra la representación de esta subunidad así como los residuos que se han mutado para examinar su interacción con ChTx.

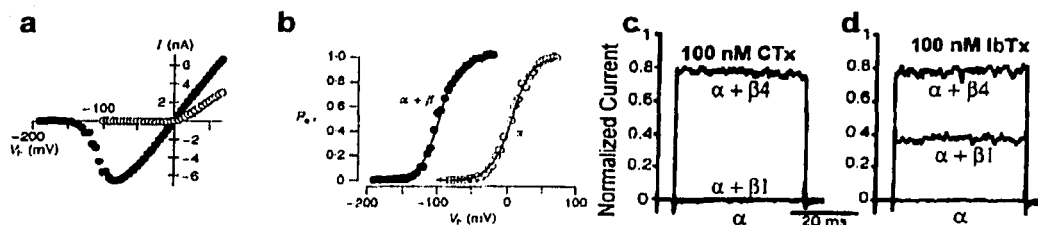


Figura 5. Coexpresión de subunidades $\alpha + \beta$ del MaxiK. a) Curvas I-V y b) Probabilidad de apertura para α y $\alpha + \beta_1$. Se observa en ambos casos el desplazamiento de $\alpha + \beta_1$ hacia potenciales más negativos, tomado de Tanaka et al., (1997). Círculos vacíos, expresión de α ; círculos llenos, expresión de $\alpha + \beta_1$. Modificación de la interacción canal-toxinas de alacrán. La unión y disociación de c) ChTx y d) IbTx, se entretienen cuando se coexpresa β_1 ó β_4 . Tomado de Meera et al., (2000).

La subunidad β_2 presenta una región N-terminal más larga y varios residuos cargados, que mimetizan al péptido bola del canal Shaker, e induce inactivación en la corriente (Wallner et al., 1999). Por otro lado β_3 presenta procesamiento alternativo en la región N-terminal y produce al menos cuatro clonas diferentes (3a-d) (Uebele et al., 2000). Esta región es inclusive más larga que la región equivalente en la subunidad β_2 , y también modifica los procesos cinéticos del canal y le confiere diferentes grados de inactivación en algunos de sus transcritos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

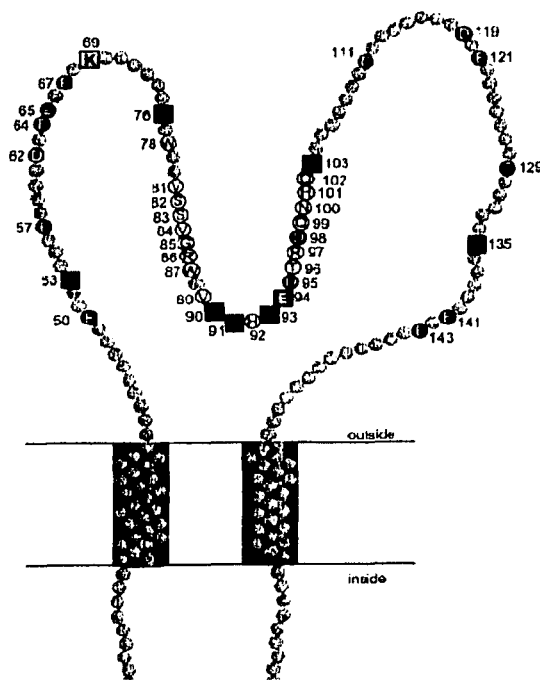


Figura 6. Representación esquemática de la subunidad β_1 de músculo liso de aorta de bovino. La subunidad β_1 esta formada por dos segmentos transmembranales y un asa extracelular larga. Se indican todos los residuos mutados en los estudios de interacción funcional con la subunidad α . Encerrados en un círculo aquellos que no son críticos, y en cuadro los que si lo son. Se marca también la lisina 69 (K69) que forma entrecruzamiento entre el canal y la ChTx con disuccimilsuberato (DSS). Tomado de Hanner et al., (1998).

La coexpresión de β_4 prácticamente produce los mismos efectos que β_1 , pero enlentece aún más los procesos de activación, deactivación e inactivación (Brenner et al., 2000) además de modificar las propiedades farmacológicas de α (Meera et al., 2000).

TRABAJE CON
FALLA DE ORIGEN

Se conoce que los complejos $\alpha+\beta_1$ pueden interaccionar con una tercer molécula de tipo planar rígida, esteroideal o no, para activar al canal. Los primeros estudios se realizaron en una planta medicinal africana donde se aisló una familia de saponinas, el miembro con mayor afinidad es la dehidrosoyasaponina (DHS) (McManus et al., 1993). Ahora también se sabe que el 17 β -estradiol (Valverde et al., 1999), los ácidos biliares (Dopico et al., 2002), el tamoxifén (Dick et al., 2001) y otros [xeno]estrogenos (Dick y Sanders 2001) lo hacen de manera similar. Al parecer el 17 β -estradiol también activa a la subunidad α en presencia de β_4 , (Behrens et al., 2000).

1.2 Toxinas de alacrán

Los animales venenosos están distribuidos en todo el mundo y pertenecen a diferente phyla, incluyendo celenterados, equinodermos, moluscos, artrópodos y cordados. Su veneno contiene un gran número de componentes tóxicos que inmovilizan a diferentes tipos de animales que incluyen artrópodos, peces, anfibios y mamíferos (Menez et al., 1992). El veneno es empleado por los animales que lo poseen como un mecanismo de defensa y/o de sometimiento de sus presas. Los alacranes son animales esencialmente nocturnos que viven en regiones tropicales y subtropicales y su distribución geográfica mundial es bastante extensa. Puesto que el hombre a menudo comparte el mismo hábitat con los alacranes, también se ve expuesto a la picadura de éstos. En México existen cerca de 220 especies diferentes, incluyendo subespecies de diferentes géneros, siendo el más peligroso el género *Centruroides* (Dehesa-Davila y Possani, 1994) y del cual se conocen seis especies consideradas peligrosas para el hombre. En nuestro país el envenenamiento por picadura de alacrán o escorpionismo representa un problema de salud pública ya que en 1996 se estimaba que alrededor de 200,000 personas eran afectadas anualmente (Possani et al., 1996); aunque con los casos no reportados esta cifra debe incrementarse. Por lo tanto, los alacranes representan un riesgo potencial hacia el ser humano.

1.2.1 α K-Toxinas

El veneno de alacrán es un líquido blanquecino lechoso formado por diferentes tipo de moléculas: proteínas (enzimas), péptidos, aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos, lípidos y sales. Los venenos de alacrán contienen una gran variedad de sustancias tóxicas

(neuropéptidos) y uno de sus efectos es modificar el flujo de iones a través de proteínas membranales (canales iónicos). Las neurotoxinas son péptidos globulares de bajo peso molecular (3-8 kDa) generalmente de una sola cadena de 23-70 aa, básica y muy estable. De acuerdo a la longitud de cadena se puede inferir el tipo de canal que bloquean: cortas 23-42 aa, modifican la función predominantemente de canales de potasio (Possani et al., 1999; Garcia et al., 1999), aunque existen aquellas que hacen lo propio con canales de calcio (Zamudio et al., 1997 a, b) y cloro (DeBin et al., 1993); largas 60-70aa bloquean canales de sodio (Possani et al., 1999). Es importante mencionar que cada especie de alacrán podría contener una batería propia de toxinas para bloquear los diferentes tipos de canales.

De acuerdo a numerosas estructuras tridimensionales reportadas (véase tabla 1), los péptidos inhibidores de canales de potasio presentan prácticamente el mismo plegamiento tridimensional llamado motivo alfa-beta estabilizado por cisteínas (Cornet et al. 1995) Este plegamiento se observa también en la toxina más pequeña conocida de 23 aa (Batista et al., 2000) y de la que ya se conoce su estructura tridimensional (Wang et al., 2002). Este motivo estructural consta de una pequeña hélice α o combinación con hélice_{3/10} de aproximadamente dos vueltas y una hoja β plegada de dos o tres segmentos (de diferente longitud) estabilizados mediante tres o cuatro puentes disulfuro en posición altamente conservada (Giangiacomo et al., 1999; Darbon et al., 1999). Se pueden observar estos motivos estructurales en los diferentes modelos tridimensionales presentados en los Anexos 2-6. Los dos puentes disulfuro más importantes son los que conectan el segmento conservado -C-X-X-X-C- de la hélice α con el segundo segmento β , que contiene la secuencia -C-x-C- (Song et al., 1997), y que forman un motivo estructural conservado aún en las toxinas con cuatro puentes disulfuro, también encontrado en defensinas (Possani et al., 1999; Bontems et al., 1991).

La primera toxina específica bloqueadora de canales de potasio, descrita en 1982, es la Noxiustoxina (NTx) (Carbone et al., 1982), aunque la más ampliamente estudiada es la Caribdotoxina (ChTx) descrita en 1985 (Miller et al., 1985). El número de toxinas ha aumentado de tal manera que se hizo necesaria su clasificación (Miller, 1995). Se les han llamado α KTx toxinas y se han agrupado en 12 familias (Tytgat et al., 1999) de acuerdo a su alineamiento de secuencia primaria. Al parecer ha aumentado el número a 14 (Batista et al.,

2000; Zeng et al., 2001) y además se han incluido otros miembros en diferentes subfamilias: como la α KTx1.11 (García-Valdes et al., 2001), α KTx4.4 (Pisciotta et al., 2000) y α KTx4.5 (Vacher et al., 2001) entre otras. Estos péptidos se han constituido como valiosas herramientas para evaluar tanto diferencias estructurales (Krezel et al., 1995; Stampe et al., 1994; Thompson y Begenisich, 2000; Myers y Stampe, 2000) como mecanismos de acción entre los distintos tipos de canales (Rauer et al., 2000; Giangiacomo et al., 2000). Mediante el uso de toxinas de alacrán se ha logrado establecer de manera aproximada la topología y las dimensiones del poro de los canales de potasio. Ahora con la estructura cristalina del canal bacteriano *KcsA* se han podido realizar mutaciones en las toxinas de manera guiada para construir ligandos sintéticos más específicos (Rauer et al., 2000; Shakkottai et al., 2001).

1.2.2 Relación estructura-función

Estudios llevados a cabo durante más de una década identifican a las toxinas de potasio como bloqueadoras del poro. Se unen con gran afinidad al vestíbulo externo del poro del canal y bloquean la conducción iónica mediante una oclusión física sin afectar la cinética (Anderson et al., 1988; Miller, 1988; MacKinnon y Miller 1988; MacKinnon y Miller 1989; Giangiacomo et al., 1992). La unión ocurre a través de una reacción bimolecular reversible favorecida tanto por interacciones electrostáticas de largo y corto alcance (Stocker y Miller, 1994) como por interacciones hidrofóbicas. Para establecer los residuos que son importantes en la unión toxina-canal se realizaron estudios de mutaciones entre varias toxinas y canales. Una serie de mutaciones en toxinas (Park y Miller 1992; Park y Miller, 1992; Goldstein y Miller 1993; Goldstein et al., 1994; Stampe et al., 1994); en canales de potasio clonados (Escobar et al., 1993; Goldstein y Miller, 1993; Gross et al., 1994; Gross y MacKinnon, 1996; Lu y Miller, 1995) o en ambos (Aiyar et al., 1995; Aiyar, Rizzi, et al. 1996; Hidalgo y MacKinnon, 1995; Naranjo y Miller 1996; Ranganathan et al., 1996) (Stocker y Miller, 1994; Pardo-Lopez et al., 2002a,b). Estudios realizados recientemente en nuestro laboratorio sugieren a la E_{rg}Tx como una toxina que ocluye parcialmente el poro del canal *herg* (Pardo-Lopez et al., 2002a; Pardo-Lopez et al., 2002b).

Tabla 1. Estructuras tridimensionales reportadas de las toxinas α KTx.

Toxina	Sub-Familia	PDB	Referencia
ChTx ChabII	1.1 **	2CRD	(Bontems et al., 1991) (Song et al., 1997)
Lq2	1.2	1LIR	(Renisio et al., 1999)
IbTx IbTx-Ntx	1.3 **	-	(Johnson y Sugg, 1992) (Ferrat et al., 2001)
BmTx1	1.5	1BIG	(Blanc et al., 1998)
BmTx2	1.6	2BMT	(Blanc et al., 1998)
NTx	2.1	1SXM	(Dauplais et al., 1995)
MgTx	2.2	-	(Johnson et al., 1994)
KTx	3.1	1KTX	(Fernandez et al., 1994)
AgTx2	3.2	1AGT	(Krezel et al., 1995)
AgTx	3.4	-	(Aiyar et al., 1995)
BmKTx	3.6	1BKT	Renisio no publicada
OsK1	3.7	1SCO	(Jaravine et al., 1997)
TsTx α	4.1	1HP2	(Ellis et al., 2001)
Tsk	4.2	1TSK	(Blanc et al., 1997)
LTx1	5.1	1SCY	(Martins et al., 1995)
PO5	5.2	1PNH	(Meunier et al., 1993)
Pi1	6.1	2PTA	(Tenenholz et al., 1997)
MTx	6.2	1MTX	(Blanc et al., 1997)
HsTx1	6.3	1DUZ	(Savarin et al., 1999)
Pi7	6.5	1QKY	(Delepierre et al., 1999)
Pi2	7.1	1C49	(Klenk et al., 2000)
Pi3	7.2	1C49	(Klenk et al., 2000)
PO1	8.1	1ACW	(Blanc et al., 1996)
Tcl	13.1	1JLZ	(Wanget al., 2002)

Tabla 1: Las toxinas se enlistan de acuerdo a la familia a la que pertenecen además de su clasificación, el número de acceso en la base de datos de proteínas PDB y la referencia en la que se publicó dicha estructura. ** significa: estructuras con mutaciones puntuales, deleciones o bien construcciones quiméricas.

Recientemente se han realizado estudios por dinámica molecular para tratar de conocer aún más acerca de las toxinas (Canto et al., 1999) y de la interacción toxina-canal (Cui et al., 2001). En

la figura 7 se muestra el modelo por dinámica molecular de la interacción de la toxina Lq2 con el canal *KcsA*. El canal se ha sensibilizado mediante tres mutaciones en el poro que incrementan su afinidad hacia las toxinas de alacrán. La figura 7 muestra la orientación de la molécula peptídica y de su receptor. Los residuos críticos en esta relación se señalan de manera explícita.

1.2.3 Toxinas bloqueadoras del MaxiK

Las toxinas que bloquean con gran afinidad a algunos tipos de MaxiK (*dslo*, *mslo* y *rslo*) son: Caribdotoxina (ChTx, α KTx1.1) (Miller et al., 1985) Iberiotoxina (IbTx, α KTx1.3) (Galvez et al., 1990; Candia et al., 1992) y Limbatustoxina (LbTx, α KTx1.4) (Galvez et al., 1990). Estas tres toxinas forman parte de la subfamilia α KTx1. Existen otras toxinas de diferente subfamilia que bloquean al MaxiK aunque con menor afinidad: Kaliotoxina (KTx, α KTx3.1) (Crest y Gola, 1993) y Noxiustoxina (NTx, α KTx2.1) (Valdivia et al., 1988). Del veneno del alacrán chino *Buthus martensi* se aislaron dos nuevas toxinas: BmTx1 y BmTx2. Mediante experimentos de competencia con ChTx, en membranas de sarcolema de aorta bovina, se determinó el valor de $IC_{50} = 0.3-0.6$ nM (Romi-Lebrun et al., 1997).

Hasta antes de este trabajo la IbTx se consideraba la toxina más potente ($K_d \approx 1$ nM) y específica hacia el MaxiK, sin embargo la Slotoxina se asemeja a ella en ambas cualidades (García-Valdes et al., 2001).

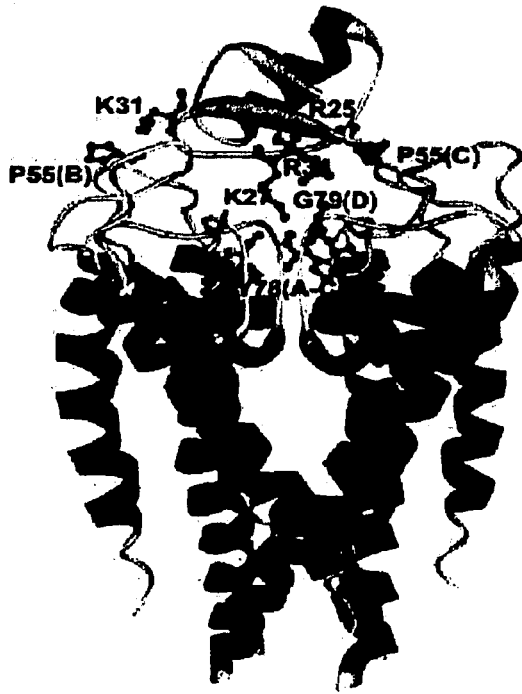


Figura 7. Interacciones canal-toxina. Las dos moléculas están representadas por estructuras de listón. Los contactos más cercanos y probables son los que se establecen entre Toxina-K27 : Canal-Y78 (A-C), Toxina-R25 : Canal-P55 (C) y Toxina-R34 : Canal-G79. La orientación coincide con los reportados previamente para AgTx2 y el Shaker.

V
 DE ORIGEN

1.3 Antecedentes

El MaxiK es un canal prácticamente ubicuo, pero la combinación con subunidades β es esencialmente tejido-específica. La ChTx e IbTx son las dos toxinas más potentes que se conocen sobre el MaxiK formado por α , sin embargo la segunda es la única toxina específica sobre este canal. La coexpresión de la subunidad β vuelve al canal resistente hacia el bloqueo de estas dos toxinas como se reporta en Meera et al., (1999). De esta manera, el encontrar ligandos específicos para diseccionar al MaxiK en cualquiera de sus posibles arreglos funcionales es de particular importancia.

El estudiar los venenos de alacrán, de manera sistemática y bien dirigida, por el sólo interés médico que representa la picadura de alacrán es ya de por sí un motivo bien fundamentado para llevar a cabo este trabajo. Un aliciente más, es la esperanza de encontrar ligandos específicos que actúen sobre un canal particular para emplearlos con fines terapéuticos en el futuro. Así pues, con este marco de referencia, nos dirigimos hacia la búsqueda de nuevos ligandos específicos para el MaxiK.

El único antecedente directo de neurotoxinas aisladas de alacranes mexicanos que bloquearan al MaxiK, que se tenía al empezar este trabajo, era el artículo publicado por Valdivia y colaboradores (1988). En ese trabajo, realizado con membranas de músculo esquelético incorporadas a bicapas lipídicas, se calculó una constante de afinidad para la Noxiustoxina (NTx) de 450nM. Se observó que la disociación de la NTx era más rápida comparada con la de ChTx y se pensó que el sitio receptor del canal podría ser diferente, sin embargo ahora se sabe que no es así. Por otra parte, trabajos realizados en nuestro laboratorio han mostrado la existencia de "mutantes naturales" en el veneno del alacrán *Pandinus imperator* que con un sólo aminoácido diferente presentan cambios importantes en afinidad sobre el mismo canal receptor *Shaker* B (Olamendi-Portugal et al., 1998; Gomez-Lagunas et al., 1996). Se sabe, además, que en el veneno de *Centruroides noxius* (*C.n.*) existen por lo menos dos toxinas que inhiben el canal *herg* (Gurrola et al., 1999; Scaloni et al., 2000) y, recientemente, se han encontrado en el veneno de otra especie (*C. limpidus*) toxinas similares con alta afinidad hacia este mismo canal (resultados no publicados). Lo anterior es muy factible ya que se encontró una misma toxina (PO1) en tres diferentes especies de alacranes (Zerrouk et al., 1996).

1.3.1 Justificación:

Dada la importancia que tiene este canal para la fisiología celular, el estudio de diferentes venenos para encontrar nuevos y más potentes inhibidores es una tarea de gran relevancia. En este trabajo se estudió el veneno de varios alacranes que habitan en territorio mexicano (*C. noxius*, *C. sculpturatus*, *C. exilicauda*, *Hadrurus gertschi*, y *Anuroctonus phalodactylus*) con el objeto de encontrar péptidos que modifiquen la actividad del MaxiK.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General:

Ensayar el veneno de diferentes especies de alacranes mexicanos para encontrar péptidos con actividad hacia el MaxiK.

1.4.2 Objetivos particulares

-Implementar el sistema de expresión heteróloga, en ovocitos de *Xenopus*, del canal *hsl*o de miometrio humano.

-Montar el sistema de registro usando la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos TEV.

-Ensayar en el MaxiK la actividad de veneno total y fracciones parciales de varias especies de alacranes que habitan en la República Mexicana.

-Caracterizar el (los) peptido (s) de interés.

Verificar si la afinidad de esta toxina se modifica al coexpresar α con la subunidades reguladoras β_1 ó β_4 .

-Estudiar la especificidad de la toxina con mayor afinidad en otros canales de potasio.

-Por último, tratar de explicar la falta de actividad de esta toxina en otros canales usando modelos tridimensionales aproximados.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Soluciones para registro electrofisiológico

En todas las mediciones electrofisiológicas se utilizaron reactivos grado analítico disueltos en agua desionizada (MilliQ) y posteriormente percolados a través de filtros: Millex-GP, 0.22µm o Nalgene Filterware 0.2 µm (250 ml). Para los canales Kv1.1, *Shaker-IR*, *hslo*, *IRK* y *herg*, en la técnica fijación de voltaje con dos electrodos TEV, se utilizaron como soluciones de baño: ND96, ([mM]: 100, NaCl; 2, KCl; 1.8, CaCl₂; 1, MgCl₂; 5, HEPES pH=7.0_{NaOH}) o ND96_{modificado}. En los experimentos con canales SK1, SK2, SK3, *dslo* y *hslo*, en la técnica de patch clamp (célula unida, cell attached; lo de dentro hacia afuera, inside-out; y lo de fuera hacia afuera outside-out), los medios usados fueron KMES ([mM]: 110, KMES; 5, KCl; 5, HEDTA; 10, HEPES, pH=7.0) o KMES_{modificado}. Las soluciones de ND96-Ca_{fijo} se prepararon por adición de cantidades variables de CaCl₂ según el programa Chelator (Schoenmakers et al., 1992). Se trazó una curva de calibración usando un electrodo selectivo a calcio y soluciones standard a pCa= 8, 7, 6, 5, 4 y 3 (CALBUF-1, World Precision Instruments). En ND96-K_{variable} se sustituyeron cantidades equimolares de sodio por potasio.

2.2 Obtención de los ovocitos de *Xenopus laevis*.

Fundamentalmente se utilizó la técnica descrita por Diaz et al., (1996) y Shih et al., (1998). Las ranas se anestesiaron por inmersión durante 20-40 minutos en una solución de tricaina 0.15-0.17% pH=7.0_(NaOH) a 4°C. Se recostaron en una "cama de hielo" y se cubrieron con el mismo a excepción del abdomen. Se les hizo una pequeña incisión (~1cm) y se extrajeron uno o dos lóbulos ováricos. A partir de este paso todo el procedimiento restante se realizó a una temperatura de 18°C. Los lóbulos se disgregaron mecánicamente con pinzas de disección (Dumont #55, Fine Science Tools) hasta pequeños cúmulos de 4-6 ovocitos. Los ovocitos se enjuagaron 4-6 veces en solución estéril OR-2 "libre de calcio" ([mM]: 82.5, NaCl; 2, KCl; 1, MgCl₂; 5, HEPES, pH=7.0_{NaOH}). Se incubaron en una solución de colagenasa (tipo IA) 2mg/ml (Sigma) durante 15-20 minutos y después se enjuagaron varias veces con medio OR-2. Se colocaron en una solución compuesta por ND96/OR-2 (1:4) durante una hora y posteriormente se incubaron con la misma mezcla, pero en una relación 1:3, durante 30 minutos y agitación constante. Finalmente, se enjuagaron y se mantuvieron en solución ND96 con gentamicina (50

$\mu\text{g/ml}$). Los ovocitos defoliculados más saludables en etapa IV o V (de desarrollo) se seleccionaron e inyectaron en el polo animal. Los ovocitos se inyectaron el mismo día por lo menos 2 horas después de haberse preparado o al día siguiente. El medio se cambió diariamente.

2.3 Expresión de canales de potasio en ovocitos.

Los reactivos, material y agua usada en la obtención y manejo del RNA se trataron de acuerdo a los protocolos básicos para trabajar en condiciones libres de RNAsa reportados en Sambrook et al., (1989).

Los plásmidos que contenían cada uno de los diferentes cDNA's fueron amablemente donados por investigadores de diferentes universidades de Estados Unidos: Ligia Toro de la Universidad de California en Los Angeles, *hslo*, *dslo* y *Shaker-IR*; Gail Robertson de la Universidad de Madison, *herg*; Mauricio Montal de la Universidad de California en San Diego, *Kv1.1*; Rolf Joho de la Universidad de Texas, *IRK*; y por John Adelman del Instituto Vollum, Oregon *SK1*, *SK2* y *SK3*.

Bacterias de la cepa BL21 se transformaron mediante electroporación. Las bacterias transformantes se recuperaron y crecieron durante 40-60 minutos en medio SOC. Se cultivaron en medio luria sólido con ampicilina (200 $\mu\text{g/ml}$) durante toda la noche. Dos colonias se seleccionaron y se cultivaron en medio luria líquido con ampicilina (50 $\mu\text{g/ml}$) durante toda la noche. Finalmente, el DNA se recuperó mediante "Plasmid MiniKit" o "Endo free plasmid MaxiKit" de Qiagen.

Tres miligramos de cDNA para cada uno de los canales se linearizaron utilizando diferentes enzimas de restricción (véase tabla 2) de acuerdo a lo especificado por el fabricante o según los protocolos básicos de biología molecular (Sambrook et al., 1989). Las reacciones se evaluaron mediante el corrimiento de una alícuota en geles de agarosa al 1%. El DNA linearizado se extrajo con la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) en medio acetato de amonio 0.3M, pH 7.0. Los restos fenólicos se re-extrajeron de la fase acuosa con cloformo y los remanentes del mismo se eliminaron con éter etílico. Al final, el DNA se precipitó con

etanol al 100%. El precipitado se lavó con etanol al 70%. En el caso de los canales SK, este procedimiento de purificación inhibía la reacción de transcripción y por ello fue necesaria la purificación del DNA mediante corrimiento en gel de la mezcla de reacción y se recuperó la banda de interés usando "QIAEXII gel extraction kit" de Qiagen. La cuantificación de los DNA's linearizados puros se efectuó por medición de la absorbancia a 260 nm.

La transcripción de las diferentes subunidades se llevó a cabo siguiendo los lineamientos sugeridos en el estuche "Ambion Message Machine". 50 nl de RNA mensajero de subunidad α (1-2 ng) se inyectaron a los ovocitos seleccionados. Para el MaxiK, el RNA de las subunidades β_1 ó β_4 se mezclaron con el de la subunidad α en una relación molar de 20:1. Los ovocitos se incubaron hasta su uso en ND96 con gentamicina (50 $\mu\text{g/ml}$).

Tabla 2. Enzimas usadas para linearizar el cDNA y para la obtención del cRNA.

CDNA	Enzima de restricción	RNA Polimerasa
<i>Hslo</i>	HindIII	T7
<i>Dslo</i>	NotI	T7
<i>Kv1.1</i>	NheI	T7
<i>ShIR</i>	NotI	T7
<i>herg</i>	HindIII	T7
<i>SK1</i>	MluI	SP6
<i>SK2</i>	PvuI	SP6
<i>SK3</i>	MluI	SP6

2.4 Caracterización del MaxiK

En los ovocitos control, aún la más cuidadosa inserción de los electrodos provocaban un incremento transitorio de Ca intracelular que se disipaba en 3-5 minutos. La viabilidad de las células después de la inserción se dedujo por el valor del potencial de membrana E_m y la corriente de fuga I_L que presentaron. Valores de $-30 \text{ mV} \geq E_m \geq -50 \text{ mV}$ y de $-50 \text{ nA} \geq I_L \geq -150 \text{ nA}$ (a potencial de mantenimiento, $H_p = -60 \text{ mV}$) se consideraron adecuados. En ovocitos control se registraron corrientes endógenas a potenciales muy hiperpolarizados $E < -120 \text{ mV}$ y depolarizados $E \geq 80 \text{ mV}$. Las corrientes registradas a $E \geq 80 \text{ mV}$ se cree eran corrientes

salientes a través de canales de cloro activados por calcio (I_{ClCa}) y concuerdan con lo reportado previamente (Stuhmer, 1992).

Las corrientes macroscópicas del MaxiK se caracterizaron usando diferentes medios, en presencia de activadores y bloqueadores mediante la técnica de TEV. Los ovocitos que expresan el MaxiK presentaron corrientes salientes sin inactivación a partir de $E \geq 0$ mV y se asemejan a lo reportado en Ottolia y Toro, (1994). En ovocitos cuya expresión es elevada, el cociente de corrientes: $I_{endógenas}/I_{MaxiK}$ fue variable en el intervalo de 0-80 mV. En este trabajo sólo se usaron ovocitos que presentaban cocientes adecuados en el intervalo $0 \text{ mV} < E < +80$ mV. Se comprobó que no hay debilitamiento de la señal o lavado de las corrientes run down, mediante la aplicación de protocolos de prueba repetitivos cada 30 segundos hasta por 45 minutos. Este espacio temporal fue mayor al utilizado en cualquiera de los experimentos que se realizaron por esta técnica.

Las corrientes macroscópicas del MaxiK son dependientes de la concentración de calcio en el baño y se incrementan con la presencia de fenamatos. A potenciales despolarizantes, la entrada de calcio a través de canales endógenos provoca incremento transitorio de su concentración, elevando así la probabilidad de apertura (P_o) del MaxiK y por consiguiente la corriente saliente de potasio. Al reducir o eliminar el calcio extracelular se observa disminución de las corrientes. Se registraron corrientes a través del MaxiK en medio ND 96 libre de calcio, 1 mM y 10 mM y se comprobó esta dependencia al calcio extracelular. Si se inyecta calcio a los ovocitos mediante una tercera pipeta, las corrientes dependientes de calcio se incrementan de manera dramática. En medio KMES la concentración de cloruro se redujo hasta 10 mM ya que se substituyó por el ión metanosulfonato. En estas condiciones los canales endógenos de cloro no se activaban; sin embargo, la fijación del potencial en el sistema parecía no ser lo suficientemente rápida y se descartó este medio.

Los fenamatos activan al MaxiK. A diferencia de la activación por calcio, el ácido flufenámico y niflúmico presentan una doble función: activan al MaxiK y bloquean las corrientes de cloro endógenas mejorando el cociente de corrientes. En la figura 8 se muestran los trazos para el MaxiK en medio ND96 (a), ND96+ 300 μ M de ácido niflúmico (b) y ND96 + 300 μ M de ácido flufenámico (c). Se observa el incremento en la corriente del MaxiK por adición de ácido

niflúmico, ácido flufenámico 300 μ M a los 5 minutos de aplicación de los fenamatos. La perfusión de bloqueadores externos confirmaron la naturaleza de las corrientes observadas. No se observó cambio alguno con la adición de 1mM de aminopiridina, bloqueador de canales de potasio dependientes de voltaje. La adición de TEA (2 mM) y Cesio (10 mM) produjo bloqueo reversible de la corriente.

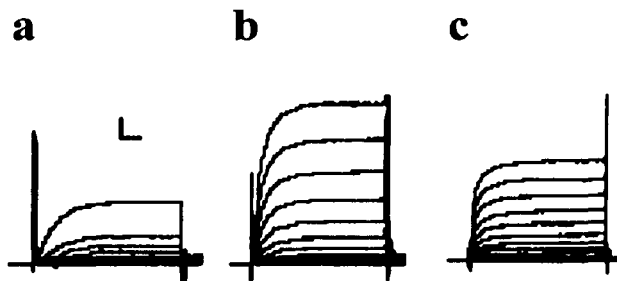


Figura 8: *Corrientes salientes del hsló en ovocitos de Xenopus. Corrientes macroscópicas normalizadas con respecto al trazo inicial obtenido a $E = +80$ mV (tiempo cero). a) Trazo control realizado en medio ND96. b) ND96 + 300 μ M de ácido niflúmico y c) ND96 + 300 μ M de ácido flufenámico después de 5 minutos de incubación (diferentes ovocitos). Protocolo de pulsos: $H_p = -60$ mV, pulsos depolarizantes sucesivos desde -60 mV hasta $+80$ mV cada 10 mV durante 20 ms. Escala de 0.3 y 2.0 ms.*

2.5 Aislamiento de toxinas de alacrán

El veneno de las diferentes especies de alacrán se extrajo por estimulación eléctrica, se resuspendió en agua bidestilada y se centrifugó durante 15 minutos a 10,000 x g. El sobrenadante se recuperó, liofilizó y almacenó a -20°C hasta su uso posterior. El primer paso de purificación se realizó por cromatografía mediante exclusión molecular (excepto para *C. exilicauda*, y *C. sculpturatus*, ver mas adelante) en columnas de 0.9 x 190 cm empacadas con Sephadex G50 medio. En el segundo paso se utilizó cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) mediante el mecanismo de fase reversa a través de columna C_{18} semipreparativa. La repurificación final de SloTx y CeTx se realizó en columna C_{18} analítica. En el caso de *C.*

exilicauda y *C. sculpturatus*, 1.5 mg de veneno total liofilizado se cargaron directamente al cromatógrafo. Detalles de las diferentes separaciones se enuncian en los pies de figura correspondientes .

Para los estudios de actividad hacia el MaxiK, las toxinas se disolvieron en solución externa de registro (ND96 o KMES) que contenía 0.001% de albúmina de suero bovina BSA. Para despegar las toxinas del sitio de unión se perfundió la solución externa con BSA al 0.001%.

2.6 Secuencia aminoacídica de péptidos puros.

Una vez que se aislaron y detectaron los péptidos puros que poseen actividad inhibitoria sobre el MaxiK se procedió a descifrar su secuencia. Para la Slotoxina SloTx, se obtuvo la secuencia parcial mediante la reacción de degradación de Edman en un secuenciador automático (LF3000 Protein Sequencer, Beckman). Muestras de aproximadamente 1nmol tanto de toxina nativa como de toxina reducida y alquilada se aplicaron al secuenciador. Por otra parte se realizó una digestión del péptido con bromuro de cianógeno (CNBr), previo bloqueo del amino terminal, y se secuenció parte del C-terminal. El último residuo se dedujo mediante análisis de Espectrometría de Masas (EM) en un instrumento equipado con radiación laser a 337 nm (Voyager DE-PRO, PerSeptive Biosystems). La secuenciación directa del péptido CeTx produjo una secuencia parcial de 25 residuos (24 de ellos inequívocos). La cantidad de péptido es, hasta el momento, insuficiente para completarla.

2.7 Bloqueo del MaxiK por fracciones y veneno total de alacrán.

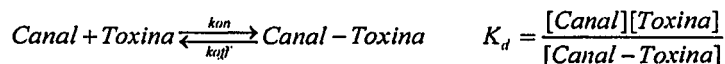
Los ensayos de actividad bloqueadora se realizaron sobre canales dependientes de voltaje, incluyendo al MaxiK, usando la técnica de TEV. En cada uno de los pasos de purificación se determinó la actividad de las fracciones. Las tres fracciones principales (I, II y III) de la separación del veneno de *C. noxius* por Sephadex G50 se aplicaron a concentración de 30 µg/ml. Cada uno de los 22 componentes de la fracción II.2 se evaluaron a 20 µg/ml. Finalmente la fracción II.2.22 se purificó en columna analítica C₁₈ (microbore) y el componente principal se probó a 10 µg/ml.

2.8 Determinación de las constantes de asociación k_{on} , disociación k_{off} y de afinidad K_d de péptidos puros.

Las constantes cinéticas se calcularon a partir de los experimentos realizados mediante la técnica de outside-out patch. Las pipetas de tamaño y geometría adecuada presentaron resistencia de 2-4 M Ω al llenarse con la solución de trabajo. Para que el MaxiK estuviera prácticamente abierto todo el tiempo (probabilidad de apertura, $P_o \approx 1$) se utilizó como solución interna KMES a $Ca = 84 \mu M$. Sólo se seleccionaron los parches que presentaron corrientes estables mayores de 2nA y corriente mínima de fuga. La estabilidad de las corrientes se verificó por la aplicación de pulsos repetitivos de prueba durante 30 minutos ($H_p = 0$ mV, pulso depolarizante de 40 mV, cada 2 segundos). La magnitud de las corrientes de fuga se determinó mediante la adición de TEA 10 mM. En caso de la coexpresión de las subunidades reguladoras β_1 ó β_4 una tercera condición fue necesaria: la evidencia del desplazamiento de la curva I vs E hacia potenciales menores. El volúmen agregado de la fracción tóxica fue por lo menos diez veces el volúmen total de la celda de registro. El tiempo para llegar al estado de equilibrio varió de 2 a 25 minutos según se tratara de canales formados por α o por $\alpha + \beta$. El tiempo para la disociación fue mayor a 30 minutos. En todos los casos, las corrientes se promediaron en los últimos diez milisegundos de cada pulso de prueba y se trazaron gráficas en función del tiempo transcurrido desde el inicio de la aplicación o lavado de la toxina. El valor de la corriente durante todo el experimento se normalizó en función del promedio de la corriente inicial (I_0). En la figura 9 se muestra un experimento para el bloqueo y lavado de toxina. Se observan cuatro zonas diferentes: II y III, dependientes del tiempo; I y IV, prácticamente independientes de tiempo. Para caracterizar completamente el experimento se aplicaron diferentes ecuaciones para las zonas II, III y IV. Para la zona I ninguna ecuación se dedujo ya que en ella se encuentran los trazos "control".

En la zona III se ha alcanzado el equilibrio y por consecuencia esta representado por la ecuación termodinámica de disociación K_d .

En el equilibrio tenemos la expresión:



rearreglando la expresión queda:

$$\frac{K_d}{[Toxina]} = \frac{[Canal]}{[Canal - Toxina]} = \frac{\text{canales "nobloqueados"}}{\text{canales "bloqueados"}}$$

Considerando que $P_0 \sim 1$, las dos únicas configuraciones para los canales en presencia de toxina son: abiertos (canales conductores) o abiertos bloqueados (no conductores). En las ecuaciones: *Canal*, representa al canal abierto (conductor); *Canal-Toxina*, al canal abierto y bloqueado (no conductor); y *Canal_{total}*, es la suma de los dos términos anteriores. Si se representan estas dos configuraciones como concentraciones:

$$\frac{K_d}{[Toxina]} = \frac{\text{"canales conductores"}}{\text{"canales no conductores"}} ; \quad [Canal] + [Canal - Toxina] = [Canal]_{total}$$

si además:

x = fracción de canales conductores

y = fracción de canales no conductores

Tenemos:

$$\frac{K_d}{[Toxina]} = \frac{[Canal]}{[Canal - Toxina]} = \frac{x}{y}$$

De la figura 9, tomando los valores de corriente inicial I_0 y al equilibrio I_{eq}

$$y = \frac{I_0 - I_{eq}}{i_0}, \quad x = \frac{I_{eq}}{I_0}$$

Finalmente tenemos la expresión en parámetros experimentales:

$$\frac{K_d}{[Toxina]} = \frac{x}{y} = \frac{I_{eq}}{I_0 - I_{eq}}$$

En la Zona II, la toxina se une al canal y el proceso es dependiente del tiempo. La ecuación que representa el curso temporal de la amplitud de la corriente es en términos de parámetros experimentales y en función de las constantes cinéticas:

$$I(t) = \frac{I_0}{1 + \frac{[Toxina]}{K_d}} + \left[I_0 - \frac{I_0}{1 + \frac{[Toxina]}{K_d}} \right] \exp \left\{ - (k_{off} + [Toxina] * k_{on}) \Delta t \right\}$$

En la zona IV, la toxina se despega del canal y es un proceso que depende del tiempo. La expresión es la siguiente:

$$I_{(t)} = x * I_0 + (1-x) * I_0 \exp \left\{ - (k_{off} + [Toxina] * k_{on}) \Delta t \right\}$$

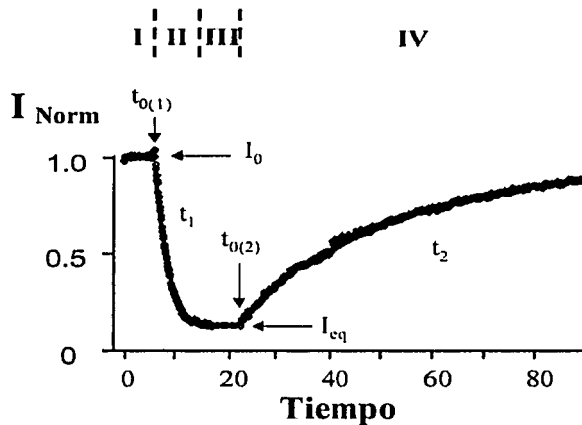


Figura 9: Curso temporal de corrientes normalizadas para la unión y lavado de toxina sobre canales de potasio. Las flechas verticales marcan el tiempo de adición para la toxina, $t_{0(1)}$; y la solución de lavado $t_{0(2)}$. I_0 y I_{eq} son la amplitud de corriente inicial y en el equilibrio.

Las tres ecuaciones finales se ajustaron mediante algoritmos creados en excel y se encontraron los valores de cada una de las constantes cinéticas.

2.9 Obtención de estructuras tridimensionales y potenciales electrostático de toxinas y canales.

Se obtuvieron varias estructuras tridimensionales aproximadas para toxinas y canales. Las estructuras de toxinas de la familia α KTx1 sirvieron como apoyo para tratar de explicar el mecanismo por el cual la SloTx sólo se une al MaxiK. Las estructuras de toxinas bloqueadoras de canales SK, hERG e IRK y las estructuras de los mismos canales, nos permitieron conocer las regiones o residuos importantes para su interacción. La información obtenida nos ayudará en la discusión para explicar la alta afinidad y especificidad de la SloTx sobre el MaxiK.

Todas las estructuras se generaron a partir del modelado por homología usando el programa Swiss-PDB-Viewer (SPDBV) y la información estructural de toxinas y del canal de potasio *KcsA*. En varias de ellas se realizaron mutaciones puntuales. La minimización energética se calculó mediante el módulo GROMOS 36 que posee el programa SPDBV mediante 500-1000 pasos (hasta alcanzar una variación menor del 1%) considerando enlaces, ángulos, torsiones, interacciones electrostáticas y enlaces no formados. Los potenciales electrostáticos se calcularon mediante la ecuación de Poisson-Boltzmann tomando en cuenta únicamente los residuos cargados; los valores de constante dieléctrica para agua y proteínas de 80 y 4 respectivamente; y en la mayoría de los casos, fuerza iónica nula.

Las estructuras obtenidas en este trabajo son: toxinas, (IbTx, LbTx, SloTx, Tsk, Pi1, MTx, y BeKm-1); canales, (KcsA-3M, IRK2.1, ROMK1, *Shaker*, *hsl*, *dslo*, *dslo*-1M, SK1, SK2 y SK3). Todas ellas están marcadas con asterisco en los anexos 2-7.

3 RESULTADOS

Los resultados de este trabajo se presentan en dos partes: resultados publicados y resultados no publicados. En el artículo publicado como primer autor, que se presenta en el anexo 1, se describe parte del trabajo realizado durante el entrenamiento doctoral.

García-Valdés, J., Zamudio, F.Z., Toro, L. and Possani, L.D. (2001). "Slotoxin, α KTx1.11, a new scorpion peptide blocker of MaxiK channels that differentiates between α and $\alpha+\beta$ (β_1 or β_4) complexes" FEBS Letters 505, 369-373.

En el anexo I se incluye otro artículo que a pesar de no formar parte del tema central de esta tesis; fue realizado en sus inicios y gracias a la infraestructura creada durante este periodo de aprendizaje doctoral. En este segundo artículo soy co-autor:

Pardo-López, L., García-Valdés, J., Gurrola, G.B., Robertson, G.A. and Possani L.D. (2002). "Mapping the receptor site for ergtoxin, a specific blocker of ERG channels" FEBS Letters 510, 45-49.

3.1 Resultados Publicados

3.1.1 Aislamiento y caracterización del veneno de *C. noxius*.

La fracción soluble en agua del veneno de *C. noxius* se eluyó a través de una columna Sephadex G50 y se resolvieron tres fracciones distintas (figura 10a , I, II y III). De ellas sólo la fracción II fue capaz de inhibir las corrientes a través del MaxiK a concentración de 30 μ g/ml. Al separar esta fracción por cromatografía líquida de alta resolución CLAR se obtuvo un cromatograma con un patrón de separación complejo (figura 10b). Para facilitar la identificación de péptidos activos los componentes se agruparon en seis fracciones "sintéticas" (II.1-II.6) marcadas con barras al pie del cromatograma. Únicamente II.2 mostró actividad a concentración de 22 μ g/ml (n=3). Esta fracción está compuesta de 22 componentes (inserto izquierdo figura 10b) pero sólo el componente 22, marcado con asterisco bloqueó al MaxiK (n = 3). El inserto derecho de la figura 10b muestra el componente II.2.22 purificado a homogeneidad y al parecer es el único responsable de las propiedades inhibitorias de las

fracciones II y II.2. El péptido puro corresponde aproximadamente al 0.5% del veneno soluble en agua, calculado a partir de los porcentajes reportados en los distintos cromatogramas a través de la separación.

3.1.2 *Secuencia primaria de la fracción II.2.22.*

El péptido puro II.2.22 se secuenció y los primeros 36 residuos fueron identificados de manera inequívoca (figura 11a marcados con una flecha y la letra *d*). La presencia de una metionina en la posición 29 nos permitió el rompimiento del péptido con bromuro de cianógeno *CNBr*. La determinación de la secuencia del péptido truncado y alquilado confirmó siete de los ocho aminoácidos restantes (figura 11a, marcados por una flecha y *CNBr*). El último residuo se obtuvo por análisis de espectrometría de masas *EM* (figura 11a punta de flecha marcada con *EM*). El péptido nativo presenta un ión molecular de 4082.82 que se muestra en la figura 10c. Los primeros 36 residuos contabilizan para una masa de 3983.83 tomando en cuenta los tres enlaces disulfuro característicos de la toxinas bloqueadoras del MaxiK. El aminoácido faltante debe poseer una masa de 99.01, la cual corresponde exactamente a la masa del residuo valina. Por lo tanto es muy probable que la secuencia completa contenga 37 aminoácidos. La comparación de secuencias muestra que el péptido posee mucha similitud con la subfamilia de la Caribdotoxina α KTx1. La nueva toxina presenta una identidad de 84%, 76% y 54% con respecto a Limbatustoxina (LbTx: α KTx1.4), Iberiotoxina (IbTx: α KTx1.3) y Caribdotoxina (ChTx: α KTx1.1), respectivamente (figura 11b). Se decidió clasificar la nueva toxina, α KTx1.11, de acuerdo a la nomenclatura internacional propuesta recientemente por Tytgat et al (1999).

Conforme a su similitud de secuencia con toxinas como LbTx, IbTx y ChTx; α KTx1.11 es también un potente bloqueador del MaxiK de mamífero (*slo*). A la toxina α KTx1.11 se le dió el nombre común de Slotoxina (Slotx).

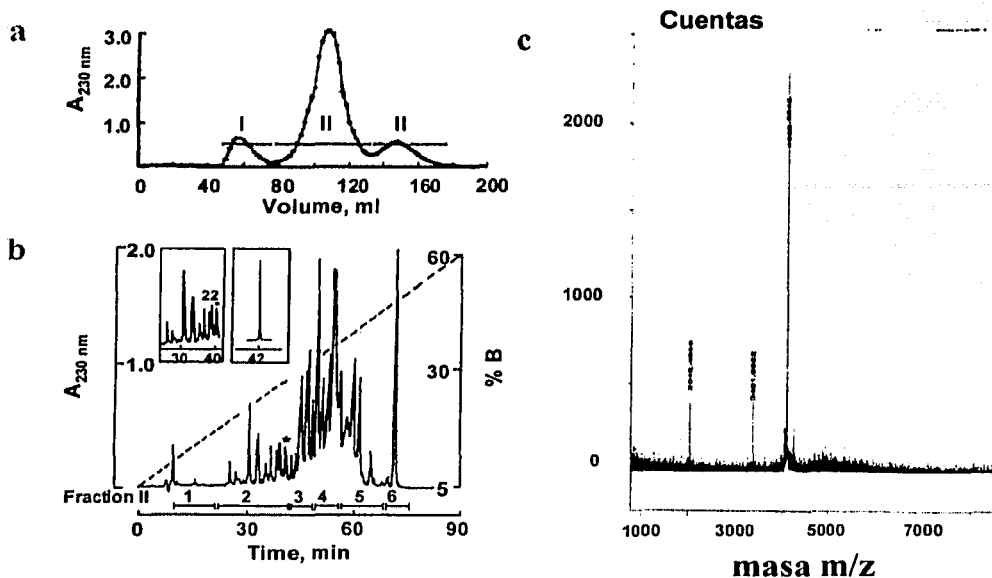


Figura 10. Separación del veneno de *C. noxius* y espectro de masas del péptido inhibidor. a) Tres fracciones (I-III) se obtuvieron en la separación de 80 mg de veneno total de *C. noxius* a través de Sephadex G50. La fase móvil estuvo compuesta por amortiguador de acetato de amonio pH 4.7. b) La fracción activa se separó por CLAR utilizando columna de fase reversa semipreparativa C_{18} con gradiente lineal de la solución A (0.12% de ácido trifluoroacético/agua) hasta 60% de la solución B (0.10% de ácido trifluoroacético/acetonitrilo). Inserto izquierdo: la fracción II se separó a través de una columna analítica C_{18} de fase reversa con un gradiente lineal de la solución B (5% a 40%) en 90 minutos. Inserto derecho: repurificación del componente 22 marcado con asterisco en el inserto izquierdo de b). c) Espectrometría de masas para el péptido homogéneo II.2.22. En el espectro se muestra el ión molecular con valor de m/z igual a 4082.83.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

a)

Secuencia primaria de α KTx1.11

```

          10          20          30
TFIDVDCTVSKECWAPCKAAFGVDRGKCMGKKCKCYV
-----d----->
          -CNBr->
          >
          EM
  
```

b)

		10	20	30	
(α KTx1.11)	TFIDVDCTVSKECWAPCKAAFGVDRGKCMGKKCKCYV				100%
LbTx (α KTx1.4)	V---S-S-----V-T-----?				84%
IbTx (α KTx1.3)	Z-T---S-----SV--DL-----R--Q				76%
ChTx (α KTx1.1)	Z-TN-S-T-----SV-QRLHNTS-----N--R--S				54%

Figura 11: *Secuencia primaria de α KTx1.11.* a) *Secuencia de aminoácidos obtenida por secuenciación directa del péptido nativo (d), de la fracción del péptido liberado por bromuro de cianógeno (CNBr) y por espectrometría de masas (EM).* b) *Comparación de las secuencias del péptido puro (α KTx1.11), LbTx (α KTx1.4), IbTx (α KTx1.3) y ChTx (α KTx1.1). Las toxinas fueron alineadas con el programa Pileup de (Genetics Computer Group). Gulones, residuos idénticos; signo de interrogación, residuos desconocidos.*

3.1.3 Afinidad de la toxina α KTx1.11 sobre el MaxiK.

La técnica de fijación de voltaje con dos electrodos TEV se utilizó en todo el proceso de aislamiento para medir la actividad de las diferentes fracciones sobre las corrientes del MaxiK. Las fracciones II, II.2 y II.2.22 produjeron inhibición en las corrientes del MaxiK.

La cinética de bloqueo del péptido puro se determinó usando outside-out patches en condiciones de alta probabilidad de apertura (84 μ M; +40mV). En el inserto de la figura 12a se observa que FPO es cercana a un 90% lo cual confirma que el canal se encuentra en estado abierto el 90% del tiempo. La adición de 100 nM de SloTx bloqueó mas del 90% de la corriente normalizada inicial (figura 12a), la cual fué prácticamente bloqueada en su totalidad

por adición de TEA 10 mM. El estado estacionario se alcanzó en 15-30 segundos y fue completamente reversible (figura 12a, lavado). La figura 12b muestra registros típicos de la corriente normalizada en diferentes condiciones: antes (1), después de la adición de la toxina (2) y después del lavado (3). Los datos en cada una de las zonas se ajustaron perfectamente a una reacción de bloqueo bimolecular (característica de las toxinas α KTx). Para incrementar la certidumbre en las mediciones de k_{on} se realizaron experimentos adicionales a una concentración menor de SloTx (10 nM). Las ecuaciones que se usaron para ajustar los datos se presentaron en la sección 2.8 del Capítulo II: Materiales y Métodos. Los valores de las constantes obtenidas fueron: k_{on} , $(3.9 \pm 2.2) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, k_{off} , $(4.8 \pm 1.7) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, y K_d , $1.5 \pm 0.8 \text{ nM}$. Los valores de k_{on} y k_{off} para SloTx son muy parecidos a los de la IbTx, pero son un orden de magnitud menor con respecto a los reportados para la ChTx.

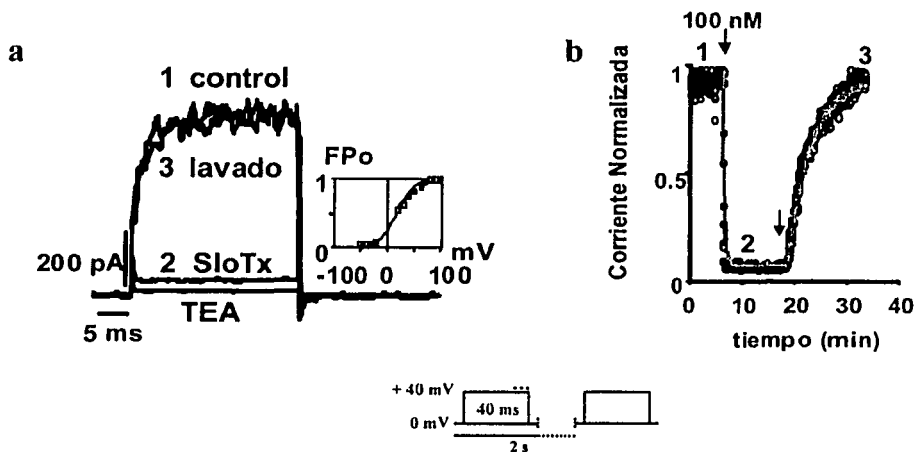


Figura 12. Inhibición de corrientes del MaxiK por SloTx (α KTx1.11). a) Se registraron las corrientes generadas a +40 mV desde $H_p = 0 \text{ mV}$ cada 2 segundos (inserto inferior). Se muestran los trazos a tiempos específicos indicados para las condiciones 1: control, 2: en presencia de toxina, y 3: después del lavado. Se probó el TEA = 10 mM antes de la aplicación de la toxina. b) Corrientes estacionarias en función del tiempo (promedio de los 10 ms finales de cada pulso como se muestra en protocolo de pulsos del inserto en a). Las flechas marcan la adición de toxina y el lavado. Las líneas en gris representan el mejor ajuste del proceso, considerando una reacción bimolecular de bloqueo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.1.4 Modulación de la interacción SloTx-MaxiK por subunidades β

Se conoce que la coexpresión de subunidad β cambia la sensibilidad al voltaje y calcio, la cinética y la farmacología de la subunidad α formadora del poro. Se investigó si las subunidades β_1 ó β_4 modifican el patrón de bloqueo de la SloTx sobre el MaxiK. Para ello en primer lugar se obtuvieron las curvas de activación en función del voltaje.

En los insertos de la figura 13a y 13b se observa que la expresión de las subunidades β causan un desplazamiento de las curvas de activación de ~ 85 mV para β_1 y de ~ 40 mV para β_4 . Los potenciales de activación media fueron de -62 ± 8 para $\alpha + \beta_1$ y de -17 ± 23 para $\alpha + \beta_4$. La coexpresión de la subunidad β_1 enlentece la constante de asociación por dos órdenes de magnitud $(5.0 \pm 2.8) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ($n=5$) cuando se compara con la subunidad α (figura 13c). La constante de disociación disminuyó dramáticamente haciéndose prácticamente irreversible durante el espacio temporal del experimento (figura 13c). El bloqueo por TEA no se vio afectado por la presencia de β_1 .

En el caso de la subunidad β_4 la velocidad de asociación fue mucho menor comparado con el valor obtenido para la coexpresión de β_1 . La constante k_{on} disminuyó en cuatro órdenes de magnitud $(5.9 \pm 1.0) \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ($n=4$) cuando se compara con la subunidad α (figura 13d). La disociación fue irreversible durante 30 minutos. Debido a la drástica disminución de la k_{on} fue necesario incrementar la concentración de toxina hasta $1 \mu\text{M}$ para poder evaluar la constante de asociación. Los trazos en la figura 13b ilustran el bloqueo de la corriente a ~ 25 minutos, (2); ~ 30 minutos de lavado, (3); y bloqueo completo por TEA 10 (mM). La figura 13e muestra la magnitud del bloqueo por SloTx en canales que expresados por α , $\alpha + \beta_1$ y $\alpha + \beta_4$ a una concentración similar de 100 nM. Para canales α y $\alpha + \beta_1$ el porcentaje de inhibición de corriente fue 90% mientras que para $\alpha + \beta_4$ fue casi imperceptible. Parece que los canales $\alpha + \beta$ son resistentes al bloqueo, pero una vez que están, este estado es aparentemente irreversible. Al parecer la unión de SloTx hacia el canal es 10 veces más lenta que para la interacción del mismo con IbTx o ChTx. De hecho 100 nM de SloTx es incapaz de bloquear al canal en 5 minutos mientras que la IbTx y ChTx lo hacen a un 20% (datos reportados en Mecra et al, (2000)).

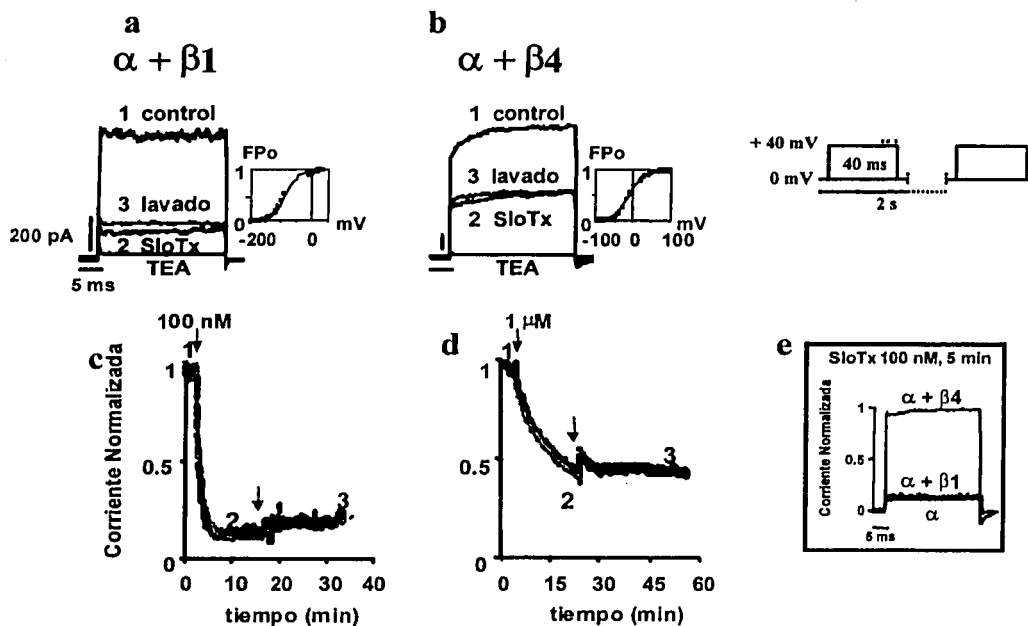


Figura 13. Bloqueo de corrientes del MaxiK formado por complejos $\alpha + \beta_1$ ó $\alpha + \beta_4$. Se registraron las corrientes obtenidas por pulsos de + 40 mV desde $H_p = 0$ mV repetidos cada 2 segundos según el protocolo mostrado en el inserto (derecha). a) y b) Los trazos corresponden a diferentes condiciones: 1, control; 2, en presencia de toxina; y 3, después del lavado. Se adicionó 10 mM de TEA para comprobar la ausencia de corriente de fuga. Las flechas marcan la adición de toxina y el lavado. c) y d) Corrientes estacionarias en función del tiempo. Las líneas en gris representan los datos ajustados considerando una reacción bimolecular. e) Corriente normalizada después de 5 minutos para α , $\alpha + \beta_1$ y $\alpha + \beta_4$. La subunidad β_4 hace al MaxiK muy resistente al bloqueo por SloTx.

3.1.5 Especificidad de la SloTx sobre el MaxiK.

La especificidad de la toxina SloTx se ensayo en diferentes tipos de canales de potasio como: dependientes de voltaje, Shaker-IR (canal Shaker sin la bola de inactivación), Kv1.1 y herg;

TEXTO CON
FALLA DE ORIGEN

dependientes de voltaje y calcio, *dslo*; dependientes de calcio, SK1, SK2 y SK3; e independientes de voltaje, IRK2.1. La técnica de TEV se utilizó para todos los canales dependientes de voltaje y para el IRK2.1 mientras que la técnica de patch clamp se utilizó para todos los dependientes de calcio. Ninguno de estos canales mostró inhibición cuando se adicionó SloTx a concentraciones en el rango de hasta 300-500 nM durante 10 minutos de equilibrio. La falta de actividad de SloTx se asemeja al comportamiento de la IbTx hacia otros canales. En la tabla 3 se muestran los resultados resumidos para los ensayos de todos los canales estudiados. Se observa que la SloTx es específica para el MaxiK.

Tabla 3 Especificidad de la toxina α KTx1.11

Canal	\leq [SloTx] (nM)	Inhibición
hSlo ^a	200	+
dSlo ^a , Kv1.1 ^b , Herg ^b o IRK2.1 ^b	300	-
ShIR ^b	350	-
SK1 ^a , SK2 ^a or SK3 ^a	500	-

^aOutside-out patches en medio 110 KMES.

^bTEV en medio ND96 o ND96_{modificado}.

3.2 Resultados no publicados

Veneno de otras especies de alacranes

Conforme a lo descrito en los objetivos de esta tesis se ensayó el veneno de varios alacranes mexicanos sobre la función del MaxiK. Como ya se describió, el veneno del alacrán de Nayarit *Centruroides noxius* se probó en primer lugar y se encontró la toxina denominada Slotoxina, la cual fue caracterizada completamente. Adicionalmente se ensayaron los venenos de los alacranes: *Anuroctonus phaiodactilus*, *Centruroides exilicauda*, *Centruroides sculpturatus* y *Hadrurus gertschi* (anteriormente *H. aztecus*), cuyos resultados no han sido publicados. A continuación se presentan en forma resumida los resultados obtenidos con dichos venenos.

ON
FALLA DE ORIGEN

3.2.1 *Anuroctonus phaiodactylus*

Las diferentes fracciones de *Anuroctonus phaiodactylus* son inocuas sobre el MaxiK.

En la figura 14a se muestra el patrón cromatográfico de la separación de veneno total por Sephadex G50 obtenida en colaboración (tesis de la estudiante del mismo laboratorio Adriana Valdez). El veneno total y las cuatro fracciones diferentes (I-IV) del primer paso de separación por peso molecular se probaron sobre las corrientes del MaxiK. La concentración de veneno total ensayado fue de 20 $\mu\text{g/ml}$, mientras que para cada fracción (I-IV) fue de 10 $\mu\text{g/ml}$. Todas las pruebas se realizaron en condiciones similares a las descritas para la SloTx (García-Valdés et al., 2001). La actividad en todos ellos fue prácticamente nula según se muestra en los trazos para la adición de veneno total en la figura 14b. Se ensayaron así también las fracciones I-IV y ninguna mostró actividad sobre el MaxiK.

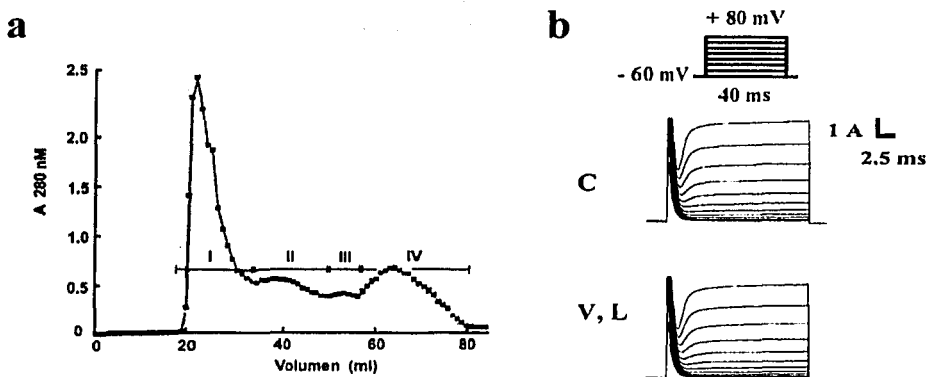


Figura 14. Separación del veneno de *Anuroctonus phaiodactylus*. a) Cuatro fracciones (I-IV) se obtuvieron al separar la fracción del veneno soluble de a través de una columna Sephadex G50 usando acetato de amonio 20 mM pH 4.7 como eluyente amortiguador. b) Actividad del veneno total. Se muestran los trazos para control (C), adición de veneno total (V) y lavado (L). El porcentaje de disminución en la amplitud de corriente es alrededor del 5-10% con respecto del trazo control en los ensayos con veneno total. El protocolo de pulsos se muestra en la parte superior de b. Se aplicaron pulsos despolarizantes de $H_p = -60 \text{ mV}$ hasta $+80 \text{ mV}$ cada 10 mV durante 40 ms.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
LABORATORIO DE FISIOLÓGICA Y FARMACOLÓGICA
FACULTAD DE ORÍGEN

3.2.2 *Centruroides exilicauda*

El veneno de *Centruroides exilicauda* bloquea al MaxiK.

En ovocitos en los que se expresó el MaxiK, se ensayó el veneno total de *Centruroides exilicauda* (C.e.) a dos concentraciones diferentes 11 y 22 $\mu\text{g/ml}$. A las corrientes macroscópicas (4-8 μA) se les compensó el transiente capacitivo al mínimo posible. El protocolo de trabajo aplicado estuvo formado por una serie de pulsos depolarizantes continuos desde el potencial de mantenimiento de -60 mV hasta $+80\text{ mV}$ cada 20 mV durante 40 ms . A -60 mV , y a la concentración de calcio celular en el ovocito, el MaxiK se encuentra preferentemente en el estado cerrado y coincide con lo reportado en Wallner et al., (1995). El valor máximo con que se depolarizó la membrana fue $+80\text{ Vm}$ y con ello se evitó la contaminación de corrientes endógenas de cloro, según lo observado en experimentos control y a lo reportado por Stuhmer (1992).

En la figura 15a se muestra el cromatograma de la separación de 7.5 mg de veneno total de C.e. en columna C_{18} semipreparativa bajo gradiente lineal de elución del disolvente A hasta 60% del disolvente B (en 60 minutos). En ella se marcan las fracciones probadas que se enumeran desde 1 hasta 7. La selección de los componentes ensayados se realizó de acuerdo a los tiempos de retención que comunmente presentan las toxinas que bloquean a los canales iónicos de potasio obtenidas bajo las mismas condiciones de separación. La fracción 6 marcada con asterisco (C6) fue la única que mostró actividad inhibitoria importante. La figura 15b muestra las corrientes control normalizadas con respecto al trazo inicial, en presencia de fracción tóxica (veneno total, Vt; o componente 6, C6), y después del lavado. Se observa que la recuperación de las corrientes es casi nula para veneno total pero del $70\text{-}80\%$ en la fracción seis. La figura 15c muestra el porcentaje de inhibición de la corriente en función del potencial. Se observa que el bloqueo es mayor al 90% y es prácticamente independiente del voltaje. Al componente 6 puro se le denominará en lo sucesivo CeTx.

La fracción 6 (CeTx) muestra afinidad importante sobre el MaxiK

Se realizó la evaluación de los parámetros cinéticos de la unión de esta toxina hacia el MaxiK, mediante la técnica de microáreas de parche de membrana "patch clamp" en la configuración de afuera hacia afuera "outside-out" (Hamill et al., 1981) y tal como se reporta en Meera et al., (2000).

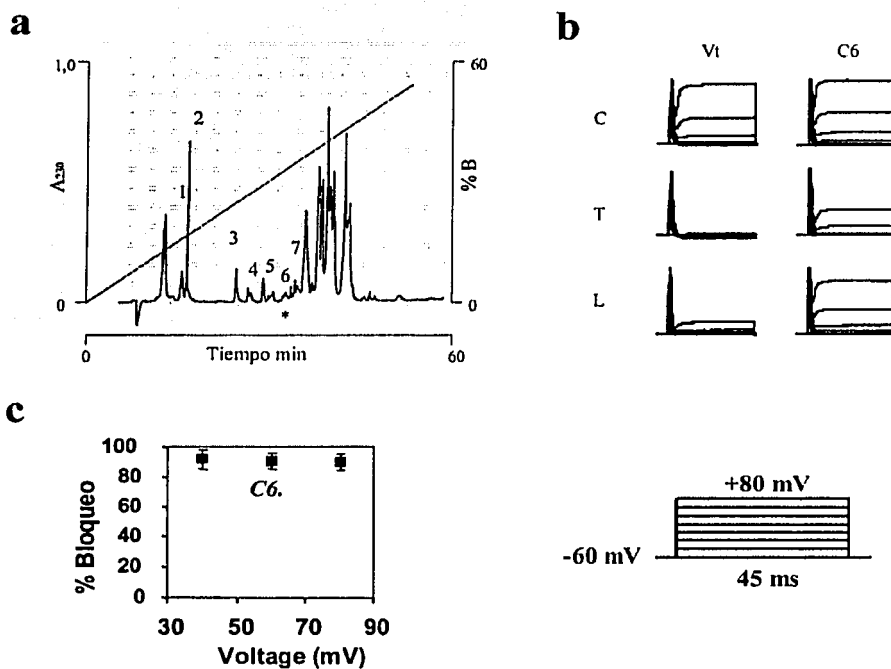


Figura 15. Separación del veneno total de C.e. y ensayo de algunos de sus componentes sobre corrientes macroscópicas del MaxiK. a) Perfil cromatográfico de la separación directa del veneno total (Vt) por CLAR a través de columna de fase reversa semipreparativa C₁₈ con gradiente lineal de la solución A (0.12% de ácido trifluoroacético/agua) hasta 60% de la solución B (0.10% de ácido trifluoroacético/acetonitrilo) en 60 minutos. b) Inhibición del MaxiK por veneno total (Vt) y por el componente 6 (C6, marcado con asterisco en a). Las corrientes fueron normalizadas y la duración del pulso fue de 45 ms (inserto parte inferior derecho). Los trazos corresponden a condiciones control (C), parte superior); en presencia de fracción tóxica (T, ya sea Vt o C6), parte media; y después de lavado (L); parte inferior. c) Porcentaje de bloqueo para C6 a tres diferentes valores de potencial 40, 60 y 80 mV.

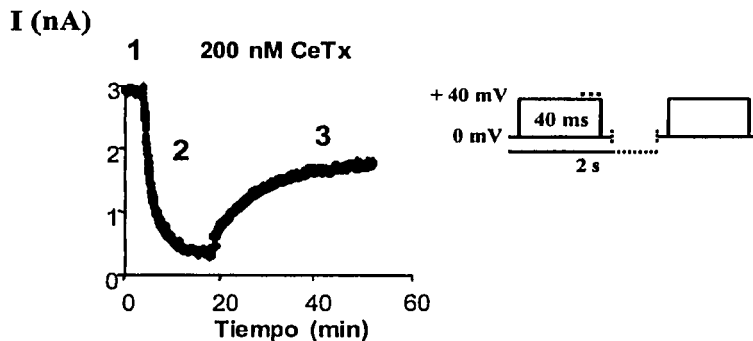


Figura 16. *Curso temporal de corriente normalizada para la inhibición del MaxiK por CeTx. Se muestran los valores de corriente normalizada en respuesta a una serie de pulsos repetitivos, de 40ms de duración, en diferentes condiciones: control (1); durante el bloqueo (2); y después del lavado (3) de la toxina. Cada punto en la curva representa la corriente promedio en los últimos 10 ms de cada pulso depolarizante a $E = +40$ mV repetido cada 2 segundos (inserto).*

En la figura 16 se muestra el curso temporal de corriente de uno de los experimentos de bloqueo a concentración de 200nM. Las constantes cinéticas y de equilibrio de este péptido se calcularon de manera similar a lo descrito para SloTx. Los valores promedio fueron de $3.42 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $6.79 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ y 16 nM para la constante de asociación, disociación y afinidad respectivamente ($n=5$). Hasta el momento, por falta de material, sólo se tiene la secuencia parcial de 25 de los primeros 26 aa.

De acuerdo con la figura 17, CeTx podría pertenecer a la familia αKTx1 ya que: 1) presenta prácticamente la secuencia consenso de esta subfamilia (Tytgat et al., 1999); 2) su secuencia parcial presenta un alto porcentaje de identidad con SloTx 69%; y 3) por su actividad inhibitoria hacia el MaxiK.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

SloTx	TFIDVDCTVSKECNAPCKAAFGVDRGKCMGKKCKCYP	100%
LbTx	V----S-S-----W-----V-T-----?-----?	84
IbTx	Z-T----F-----WSV--DL-----R--Q	76
CeTx	I-----QG--L--D-XA---F-?	69*
sec. con.	-----C--S--C--C-----GKC---C-C--	

Figura 17: Secuencia de primaria de la toxina CeTx. Comparación de secuencia primaria de SloTx, LbTx, IbTx y CeTx. La secuencia consenso de la subfamilia 1 (sec. con.) se muestra en la parte inferior. Las toxinas se alinearon mediante el programa Pileup (Genetics Computer Group). (-), residuos idénticos; (?), residuos desconocidos. (*) porcentaje de identidad de CeTx con respecto a SloTx considerando únicamente la secuencia parcial.

3.2.3 *Centruroides sculpturatus*

El veneno de *C. sculpturatus* no presenta actividad sobre el MaxiK

Tanto el número de alacranes de *C. exilicauda* como el de *C. sculpturatus* es reducido en el laboratorio y por consiguiente la cantidad de veneno disponible es muy limitada. Para evitar pérdida de material en los primeros pasos de purificación se inyectó el veneno directamente en el cromatógrafo de líquidos. En la figura 18 se muestra el perfil de separación obtenida mediante el mecanismo de fase reversa en una columna C₁₈ semipreparativa y con un gradiente similar al reportado por Selisko y colaboradores (1998). La adición de veneno total a concentración de 22 µg/ml no mostró actividad hacia el maxiK expresado en ovocitos según se muestra en la figura 18b. Se probaron fracciones individuales en la región cercana a los 30 minutos de retención ya que se sabe es el tiempo en que eluyen las toxinas que bloquean canales de potasio. Los componentes con tiempos de retención de 28.95, 30.41 y 32.05 minutos, se ensayaron a concentración de 1 µg/ml. Ninguna de estas fracciones mostró actividad inhibitoria sobre las corrientes a través del MaxiK.

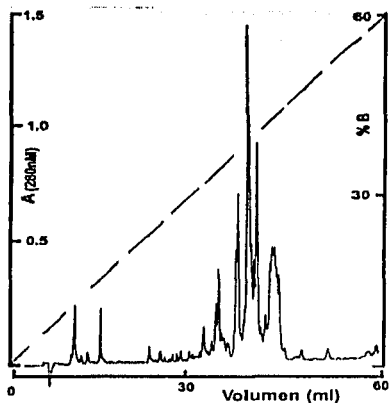
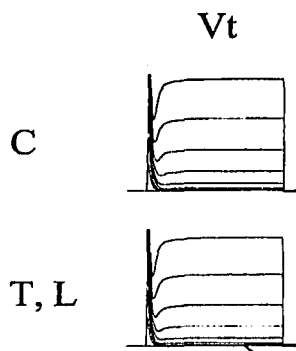
a**b**

Figura 18. Separación del veneno total de *C. sculpturatus*. a) Perfil de separación del veneno total de *C. sculpturatus* a través de una columna semipreparativa C_{18} con gradiente lineal de la solución A (0.12% de ácido trifluoroacético/agua) hasta 60% de la solución B (0.10% de ácido trifluoroacético/acetonitrilo). b) El veneno total (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) es prácticamente inocuo en las corrientes macroscópicas del MaxiK expresado en ovocitos. Se presentan corrientes normalizadas con respecto al trazo inicial a +80 mV para control, (C); en presencia de veneno, (T); y después del lavado, (L). El protocolo de pulsos de prueba es similar al presentado en la figura 15 (inserto izquierdo).

De acuerdo con el perfil cromatográfico y a la actividad del veneno total sobre el MaxiK se podría pensar que su composición en *C. exilicauda* y en *C. sculpturatus* no es exactamente igual (véanse figuras 16 y 18).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.2.4 *Hadrurus gertschi*.

El veneno de *H. gertschi* presenta importante actividad sobre la membrana de ovocitos de *Xenopus*.

La adición de 20µg/ml de veneno total en la cámara de registro provocó un incremento en la corriente de fuga casi instantáneo, haciendo imposible el registro de la corriente. Por medio de inspección visual a través del microscopio observó que la membrana de los ovocitos se dañaba considerablemente al cabo de 30 segundos. Se separó el veneno total por filtración molecular a través de Sephadex G50 y se obtuvieron ocho fracciones principales. Para conocer que fracción (es) eran la(s) responsables de esta actividad se ensayaron las ocho diferentes sobre el MaxiK a concentración de 5µg/ml. En la figura 19 se muestra la separación del veneno total y el efecto de estas fracciones sobre la membrana de ovocitos. Las fracciones que no presentan actividad alguna, después de 6 minutos, son: I, III, VI y VIII.

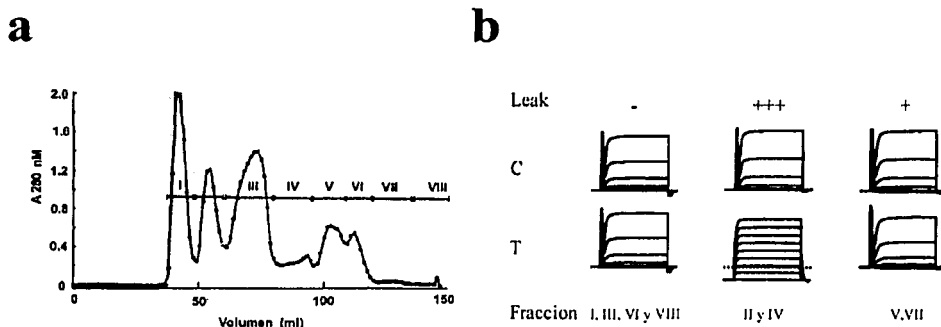


Figura 19: Separación del veneno de *Hadrurus gertschi* por tamaño molecular y ensayos funcionales sobre el MaxiK. a) Se muestran las fracciones de la separación cromatográfica por Sephadex G50 y se numeran de I a VIII. b) Registros electrofisiológicos en condiciones control (C) y en presencia de fracción tóxica (T). Los trazos se agrupan en tres columnas, que corresponden a diferente intensidad en los cambios detectados: sin efecto aparente, (-); con corriente de fuga después de 2-3 minutos, (+); y, con corriente de fuga casi instantáneo (+++). Todas las corrientes están normalizadas excepto por la condición T+++, que está escalada 0.22 veces.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las demás actúan sobre la membrana e impiden la adecuada fijación del voltaje y se dividen en: *importantes* (V y VII) con corrientes de fuga que se manifiestan después de 2-3 minutos y *críticas* (II y IV) con corrientes de fuga casi instantáneas.

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En México existen 221 especies diferentes de alacranes, incluyendo subespecies de distintos géneros. Del género *Centruroides*, por lo menos seis especies son peligrosas para el hombre: *C. elegans*, *C. infamatus*, *C. limpidus*, *C. noxius*, *C. sculpturatus* y *C. suffusus*. En esta tesis se trabajó con dos de éstas: *C. noxius* y *C. sculpturatus*. Se hizo lo propio con *C. exilicauda*, *Hadrurus gertschi* y *Anuroctonus phaiodactilus*. Este trabajo es un primer paso para caracterizar el veneno de manera sistemática que permitirá sentar las bases para entender el mecanismo de acción de neuropéptidos sobre el MaxiK ya sea formado por la subunidad α , como por la expresión conjunta de las subunidades α y β .

SloToxina y el canal MaxiK (*h slo*).

La parte central de este trabajo gira en torno al aislamiento y caracterización de una nueva toxina del veneno de *C. noxius*. De acuerdo a lo reportado en Carbone et al., (1982) el patrón cromatográfico de la separación por filtración molecular del veneno total presenta tres componentes principales (I, II y III, figura 10a en la sección de resultados). La fracción II, rica en toxinas hacia canales de potasio, fue la única efectiva para bloquear el MaxiK. La separación de ésta en columna C_{18} semipreparativa presenta varios componentes no completamente resueltos. Para facilitar el trabajo electrofisiológico de búsqueda, se mezclaron varios componentes en seis grupos que se muestran en la figura 10b. Las fracciones II.2 y II.2.22 contenían el péptido inhibidor de corriente a través del MaxiK. La secuencia primaria del componente II.2.22 es muy similar a la de LbTx e IbTx, sin embargo las tres difieren en el número de residuos ácidos que contienen: IbTx, 5; SloTx, 4; y LbTx, 3. Esta diferencia en carga, además de otros residuos, se encuentran principalmente en la cara opuesta a la región que reconoce al receptor. Se puede observar esto claramente en las estructuras mostradas en las figuras de los renglones 3, 4 y 5 del anexo 2. Consecuentemente la actividad de estas toxinas sobre la subunidad α para el Maxicanal es muy parecida. Los valores de k_{on} , k_{off} y K_d son de $3.9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, 4.8×10^{-3} y 1.5 nM ; $1.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $2.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y 1.4 nM ; en condiciones similares, respectivamente para SloTx e IbTx (Wailner et al., 1995).

Ahora, si se compara la actividad de SloTx en canales que expresan sólo la subunidad α con aquellos que coexpresan con la subunidad β ; encontramos que las constantes cinéticas de los

canales de $\alpha + \beta$ se enlentecieron con respecto a los valores obtenidos para α . Para $\alpha + \beta_1$, se observó que la cinética de asociación disminuye en 2 órdenes de magnitud y la disociación es prácticamente nula. Es importante mencionar que cuando no se alcanza el estado de equilibrio la recuperación de la corriente es significativamente mayor, observación que previamente se reporta en Meera et al., (2000). En el caso de los complejos $\alpha + \beta_4$, la constante de asociación disminuye cuatro órdenes de magnitud y la disociación es casi imperceptible. Si se compara la actividad de S1oTx (100 nM y 5 min.) en α , $\alpha + \beta_1$ y $\alpha + \beta_4$ se observa que para las dos primeras el bloqueo es casi del 90% en tanto que para la tercera es menor del 5% (véase la figura 13e).

En el alineamiento de las subunidades β (figura 4, capítulo I) se observan algunas diferencias entre β_1 y β_4 . El asa extracelular en β_4 es más larga por 11 aa, incluye 5 cisteínas y 4 residuos básicos de más; sin embargo, sólo presenta tres de los cinco residuos conocidos como importantes en la interacción MaxiK- β_1 . A la fecha no se conoce la estructura secundaria de ninguna de las subunidades reguladoras. Al buscar en la base de datos del Protein Data Bank (PDB), disponible por internet, no se encontró ninguna proteína suficientemente parecida con la que se pudiesen alinear y por tanto inferir su probable estructura secundaria y/o terciaria. En el trabajo de Jiang et al., (1999) se dice que posiblemente una región del asa extracelular en β_1 podría estar formando una estructura de espiral enrollada "coiled coil". Dado el número de cisteínas en la subunidad β_4 posiblemente la estructura del asa sería diferente a la correspondiente en β_1 .

La figura 20 muestra una caricatura que podría representar a grosso modo la disposición de las subunidades α y β . La disposición y la distancia se representaron de acuerdo los datos reportados en diferentes fuentes: arreglo de los segmentos S1-S3, (Li-Smerin et al., 2000); posición de S0 con respecto a β_1 (Wallner et al., 1996; Rojas et al., 2002). Por otra parte, al parecer la distancia de S1 ó S3 con respecto sitio receptor externo del TEA del poro del Shaker es de $\approx 30 \text{ \AA}$ (Blaustein et al., 2000). Considerando que las asas para β_1 y β_4 son de 125 y 136 aa es posible que, en los dos casos, este segmento se extendiese y llegara hasta la entrada del poro y formase un dominio semejante al de tetramerización en el *Shaker* (T1). Al igual que T1, podrían existir una serie de "ventanas" por las cuales entraría la toxina y bloquearía el poro. Al ocurrir esto, se establecerían una serie de interacciones electrostáticas y/o impedimentos

estéricos entre las asas y la toxina que posteriormente dificultarían la salida de esta última. Es importante mencionar que la principal diferencia entre ChTx, IbTx y SloTx se encuentra en la parte que estaría interaccionando con las asas de las subunidades β . Esto explicaría en parte la diferencia en cinética de pegado y despegado para ChTx, IbTx y SloTx. IbTx y SloTx presentan mayor densidad de residuos ácidos que tendrían mayor interacción con cargas positivas de las asas extracelulares tanto de β_1 como de β_4 . Esta interacción podría ser mayor en el asa de la subunidad β_4 ya que es más larga y básica. Esto reflejaría constantes de disociación particularmente más lentas cuando se coexpresan los canales con subunidades α y β , que confirmarían los resultados obtenidos en este trabajo.

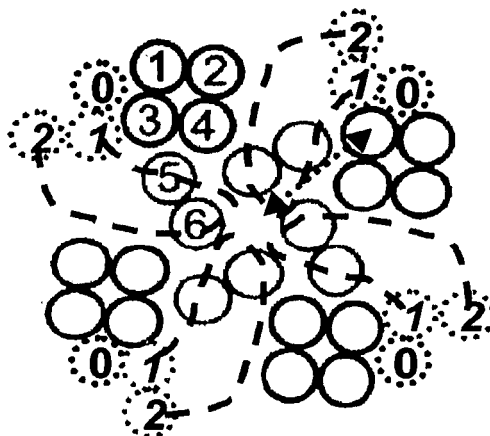


Figura 20. *Caricatura de la disposición tridimensional del MaxiK y la subunidad β . Se muestra el arreglo propuesto por Li-Smerin para los segmentos 1-6 de canales dependientes de voltaje (Kv), círculos marcados con 1-6. Se adicionó un segmento transmembranal S0 para que la figura representara a los canales formados por subunidad α del MaxiK (círculo punteado marcado como 0). Los dos segmentos transmembranales para la subunidad regulatoria β (círculos punteados, número 1 y 2 en itálica) se colocaron de manera adyacente al segmento S0. El asa extracelular se colocó de tal manera que formaran una "tapa" con respecto al poro del canal. La flecha marca la distancia de aproximadamente 30 nA que separa al segmento S3 con el sitio externo de unión al TEA.*

Slotoxina y el canal MaxiK (*dslo*)

El canal *dslo* carece por el momento de un ligando natural con alta afinidad ya que no presenta un residuo cargado importante en la región de la torreta. La SloTx, hasta concentraciones de 300 nM, no produce efecto alguno sobre estos canales expresados en ovocitos. Resultados similares se han reportado para la ChTx cuyo valor de K_d hacia este canal es de 5.8 μ M. Al alinear las secuencias de los canales MaxiK en ratón, humano y *Drosophila* (*mslo*, *hslo* y *dslo*) con el *Shaker*, se encontró que en la posición equivalente a 341, el *dslo* carece de un residuo de ácido al parecer muy importante. En estudios de bloqueo de *Shaker*-AgTx2 se encontró que existe interacción entre Shaker(D341)-AgTx2(R24) y que la mutación de D341, por un residuo no polar, decrece la afinidad dos órdenes de magnitud (Ranganathan et al., 1996; Hidalgo y MacKinnon, 1995). En otro reporte, la mutación T290E en *dslo*, localizado en la región de la torreta y en posición análoga al residuo D431 en *Shaker*, incrementó su afinidad hacia la ChTx hasta 23 nM (Myers y Stampe, 2000). Es importante mencionar que el canal *KcsA*, insensible a las toxinas hasta ahora conocidas, también carece del residuo ácido en esta posición análoga. Se realizó el modelaje por homología, minimización energética y se calculó el potencial electrostático de la región del poro para el *dslo*. Se observa que presenta cierta similitud con poro del canal *KcsA* (Anexo 7). Al realizarse la mutación del residuo T290E en el *dslo* se modifica el potencial electrostático de tal manera que ahora se asemeja al potencial electrostático del *hslo*, canal que sí es sensible a la unión de toxinas de la familia 1. Comparando la secuencia primaria y estructura tridimensional de las toxinas (anexos 2 y 6) se observa que los residuos R24 en Agtx, y R25 en ChTX y SloTx son análogos. Una posible razón por la que la SloTx no presenta afinidad por el canal *dslo*, es que éste prescinde de un residuo ácido en la posición equivalente a 341 en el *Shaker* y que al parecer es muy importante en la interacción de las toxinas con el MaxiK.

Slotoxina y canales de potasio activados por calcio de baja conductancia (SK).

Existe un grupo importante de toxinas que bloquean los canales de potasio de baja conductancia activados por calcio (SK). Poseen una marcada diferencia en longitud (28-35 aa), tres o cuatro puentes disulfuro, y ligeras modificaciones en el plegamiento. La Leiurotoxina, (LeiTx), PO1 y PO5, Maurotoxina (MTx), Tsk, Pil, BmPO1, BmPO2, BmPO3 y BmPO5

bloquean preferentemente a los canales SK2 y SK3. Para el canal SK1 no se han encontrado aún inhibidores peptídicos provenientes de veneno de alacrán. En el anexo 3 se muestran sus estructuras y en ellas se visualizan marcadas diferencias, entre ellas y el MaxiK, en cuanto al arreglo tridimensional y al potencial electrostático. Para las toxinas ScyTx, PO5, Pi1, la secuencia básica RR/XCQ localizada en la hélice α (véase anexo 3, renglones 1, 2 y 4) es de gran relevancia en la interacción con los canales SK2 (Shakkottai et al., 2001). A diferencia de éstas, en la SloTx la hélice α contiene varios residuos ácidos dando como consecuencia una distribución de cargas opuesta a la requerida para la unión con este tipo de canales (véase anexo 2, renglón 5). Esto podría explicar, en gran parte, la inactividad de la SloTx tanto en canales SK2 como SK3 ya que difieren en dos residuos no cargados en la región del poro. En el anexo 7, renglones 11 y 12, se muestran los modelos para ambos canales donde la diferencia, apenas perceptible, es el aa H517 en SK3. Ambos canales poseen dos residuos básicos en la región de la torreta, pero se encuentran “apantallados” por residuos polares sin carga. Situación contraria presentan los residuos ácidos ya que todos ellos se encuentran sin obstáculo para interactuar con la región básica de las toxinas. Por la falta de consenso en tamaño, arreglo espacial y distribución de cargas en toxinas que bloquean este tipo de canales se puede inferir que el vestibulo en ellos pudiera ser muy flexible o que estas toxinas ocluyeran el poro en diferente posición u orientación con respecto al eje de simetría del canal. En el caso de SK1, difiere con SK2 y SK3 por cuatro aa, tres de ellos en la torreta, que modifican la distribución de cargas y el potencial electrostático. En el anexo 7, renglón 10, se observa que para el SK1 existe una región que forma un “anillo básico” externo a lo que podría ser otro “anillo ácido” y la disposición de este arreglo podría complicar el acercamiento de péptidos altamente cargados al vestibulo del canal. Sería importante entonces, buscar en toxinas básicas más pequeñas o bien de longitud similar pero con carga bien localizada y de preferencia pequeña.

Slotoxina y el canal de potasio tipo *herg*.

Hasta la fecha se conocen sólo dos toxinas de alacrán que bloquean selectivamente a los canales *herg*. La ergtoxina ErgTx primera toxina reportada, por nuestro grupo de trabajo, aislada del alacrán mexicano *C. noxius*, con cuatro puentes disulfuro y 42 aa (Gurrola et al., 1999; Scaloni et al., 2000). La BeKm-1 del alacrán asiático *Buthus eupeus* con tres puentes disulfuro y 36 aa (Korolkova et al., 2001). Ambas toxinas al alinearlas muestran identidad nula

entre sí, sin embargo la BeKm-1 comparte prácticamente la secuencia consenso de la subfamilia α KTx1. La mayor identidad de secuencia (58%) se observa con BmTx1. En el anexo 4 se muestra la estructura de BeKm-1 obtenida mediante modelado por homología usando los esqueletos de BmTx1 (1BIG) y BmTx2 (2BMT). A pesar de que el esqueleto prácticamente no cambia, la orientación de las cadenas laterales modifican el potencial electrostático. La estructura obtenida en este trabajo concuerda mayormente con la presentada por Angelo et al., (2002) en el Congreso Annual de la Sociedad de Biofísica realizado en San Francisco California, no obstante, no ha sido reportada ni depositada en el banco de datos PDB. En el caso de la ErgTx la secuencia primaria es muy diferente y no presenta similitud apreciable con algún miembro de las familias hasta ahora conocidas como se muestra en la figura 15. El patrón de ocho cisteínas de ErgTx no se asemeja a ninguna de las otras toxinas con cuatro puentes disulfuro como la P11 o MTx y por esta razón no fue posible obtener su modelo espacial. En la figura 15 se muestran las secuencias primarias para las toxinas SloTx, BmTx, BeKm-1 y ErgTx.

SloTx	TFIDVDCTVSKECWAPCKAAFGVDRGKCMGKKCKCYP	100%
BmTx1	Z-T--K--G--Q--PV--QM--KPN----NG--R--S	56
BeKm-1	RPT- IK-SE-YQ-TPV--SRT-KTN-R-VNGT-D-F	30
ErgTx	DRDSCVDKSRCAKYGYQECQDCCKNAGHNGGTCMFFKCKCA	

Figura 21. *Alineamiento de SloTx, BmTx, BeKm-1 y ErgTx. Se muestra el porcentaje de identidad con respecto a la SloTx. Los guiones significan residuos idénticos.*

Dada la similitud que hay entre la BeKm-1 y las toxinas BmTx1 y BmTx2 (de la familia 1) se pensó que podría haber un dominio estructural común en BeKm-1 y SloTx que permitiera a esta última inhibir la función del canal herg. Los resultados muestran que a pesar de tener la estructura global semejante, la orientación espacial de los residuos cargados entre ambas toxinas es muy diferente según se puede apreciar en el anexo 2 y 4. Ambas presentan un potencial electrostático muy distinto. En la BeKm-1, la cara de las hojas beta parece ser menos

básica y de los ocho residuos críticos en la interacción ChTx-MaxiK sólo posee dos idénticos, S10 y N30; los otros seis son diferentes W14-T, R25-N, K27-R, M29-V, K34-D y Y36-F.

Se conoce que el canal herg contiene una diferencia marcada en el número de aa en la región de la torreta con respecto a los poros de los demás canales, que podría modificar el sitio receptor a las toxinas de alacrán. No se obtuvo un modelo molecular para el canal herg ya que la gran diferencia en tamaño, debe modificar apreciablemente el arreglo espacial de esta zona y por lo tanto el modelaje por homología no sería confiable. Recientemente se propuso que la región del asa cercana al S5 forma una hélice, que posiblemente forma el sitio receptor para la ErgTx y que existiría una oclusión parcial del poro (Pardo-López et al., 2002b)

Slotoxina y el canal de potasio rectificador entrante IRK 2.1

Los rectificadores entrantes son canales que poseen sólo dos segmentos transmembranales y que permiten pequeñas corrientes salientes. El proceso de rectificación se lleva a cabo mediante el bloqueo intracelular del canal por poliaminas o iones Mg^{2+} . El IRK2.1 es uno de los canales que se conoce como rectificadores fuertes, sin embargo existen otras familias que son también muy importantes, una de ellas es la del ROMK1. En el anexo 7, renglones 3 y 4, se muestran las estructuras tridimensionales para ambos canales. Hasta el momento sólo se conoce un péptido del alacrán *Leirus quinquestriatus* (Lq2) que bloquea a los canales ROMK1 y un péptido de abeja (tertiapina, Tpn) que bloquea tanto a los ROMK1 como a los GIRK1/4 (Jin y Lu, 1999; Ramu et al. 2001). La toxina Lq2 bloquea a los canales ROMK1 con un mecanismo y posición similar a la adoptada por otras toxinas hacia los canales voltaje y calcio dependientes (Lu y MacKinnon, 1997). Los residuos E123, N124, F146 y F148 son muy importantes para la interacción de ROMK1-Lq2. En el canal IRK2.1 estos aminoácidos corresponden a S123, E124, F147 y C148. Espacialmente estos residuos, en los dos canales, se encuentran en la zona importante para la interacción con toxinas (torreta) como lo muestran las estructuras tridimensionales del anexo 7. Existe otro péptido activo en ROMK1, la tertiapina que posee una estructura formada por un segmento muy pequeño de hélice alfa, una región aparentemente no bien definida y dos puentes disulfuro. Se cree que los residuos más importantes para la unión de la toxina con estos canales se encuentran en la hélice α y el mecanismo de interacción es primordialmente electrostático (Jin et al., 1999). En el anexo 5 se

muestra la estructura tridimensional de la Tertiapina. Comparando las estructuras de Lq2 con SloTx y observando las estructuras para los canales rectificadores entrantes, se puede concluir que tal vez factores como la distribución de carga y el potencial electrostático pueden ser decisivos en la falta de actividad de SloTx sobre el canal IRK2.1.

Veneno de otras especies de alacranes.

De los venenos estudiados, además del *C. noxius*, sólo el de *C. exilicauda* produce inhibición del MaxiK. Este veneno contiene al menos un componente puro con afinidad de 16 nM, determinado a partir de experimentos en fijación de voltaje en microáreas de membrana de ovocito de *Xenopus*. La secuencia primaria parcial del péptido es similar a la de IbTx, LbTx y SloTx y probablemente sea un miembro más de la familia α -KTx1. El perfil cromatográfico de la separación directa del veneno total de *C. exilicauda* mostrada en la figura 11 es relativamente diferente al perfil de separación, en las mismas condiciones, para el *C. sculpturatus* (figura 12). Este hallazgo, junto con la diferente actividad electrofisiológica, pruebas anatómicas, y de genotipo realizadas en el laboratorio por la estudiante de doctorado Adriana Valdez permitirán aclarar que *C. exilicauda*, y *C. sculpturatus* son dos especies diferentes.

En el veneno del alacrán *A. phaidactylus*, que también habita en el norte del país, no existen en las condiciones de medida, componentes que tengan actividad sobre la función del MaxiK. Esto no significa que el veneno no presente una batería de toxinas que pudieran tener acción en otros canales de potasio.

En el veneno de *H. gertschi* se detectó actividad muy importante sobre la membrana de ovocitos así como en varias de sus subfracciones. Se conoce que en la fracción III existen péptidos antimicrobianos con actividad sobre membrana de bacterias; sin embargo, no muestra actividad aparente sobre la membrana de ovocitos. Las fracciones que exhiben actividad importante son V y VII; mientras que la actividad crítica se detecta en II y IV (véase figura 14). En nuestro grupo de trabajo se han encontrado péptidos con actividad fosfolipásica en el veneno de *Pandinus imperator* (fosfolipina) (Conde et al., 1999). Uno de los posibles productos de degradación de fosfolípidos de membrana podría ser el ácido araquidónico y se conoce activa

de manera importante al MaxiK (Duerson et al., 1996). Así pues, de ser este el caso, se tendría un doble efecto en la corriente medida: el aumento de la corriente de fuga por la destrucción de la membrana, *per se*, y por los productos de esta reacción. Lamentablemente esta investigación sale del marco temporal y conceptual de este trabajo de tesis y se propone para un trabajo posterior.

Conclusiones

Al término de este trabajo de manera general se puede concluir:

El veneno de *C. noxius* contiene al menos una toxina con alta afinidad por el canal de potasio MaxiK en la fracción II.2.22. El porcentaje de esta toxina en el veneno soluble es de aproximadamente 0.5%. La secuencia primaria de la toxina consta de 37 residuos y presenta un gran porcentaje de identidad con otras toxinas de la subfamilia α KTx1 como lo son Limbatustoxina, Iberiotoxina y Caribdotoxina. Debido a su alta actividad sobre canales *slo* se le dió el nombre común de Slotoxina (SloTx) y de acuerdo a la clasificación internacional se le denominó α KTx1.11. El bloqueo de la SloTx es reversible y de acuerdo a los valores cinéticos se trata de una toxina de despegado lento. Las constantes se obtuvieron considerando una reacción de bloqueo bimolecular, común en muchas toxinas que bloquean canales de potasio. Los valores calculados para las constantes cinéticas de asociación, disociación y afinidad fueron de $3.9 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 4.8×10^{-3} y 1.5 nM, respectivamente.

La Slotoxina presenta la propiedad de poder distinguir al maxicanal formado solamente por unidades α , $\alpha+\beta_1$ ó $\alpha+\beta_2$. Los valores cinéticos de unión y disociación son tan distintos que permiten diferenciar si el MaxiK esta formado solamente por subunidades α o por $\alpha + \beta$.

Esta toxina es altamente selectiva por este canal ya que no bloquea a los canales *dslo*, SK1, SK2, SK3, *herg*, IRK 2.1, Kv1.1 y *Shaker IR*. En todos ellos se probó la SloTx a concentraciones de hasta 300 nM o mayores (500 nM).

El veneno de *C. exilicauda* también presenta por lo menos otra toxina con alta afinidad, con un IC_{50} de aproximadamente de 16 nM. Esta Toxina también formaría parte de la subfamilia de la ChTx.

El veneno de *Anuroctonus phaiodactilus* y *Centruroides sculpturatus* no contienen toxinas que a la concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ sean capaces de inhibir al MaxiK.

El veneno de *Hadrurus getschi* presenta una actividad lítica muy importante sobre la membrana de ovocitos. La existencia de toxinas sobre el canal no se pudo evaluar ya que no fue posible fijar el potencial en ninguna de las fracciones de la separación del veneno soluble por Sephadex G50.

El análisis de estructuras obtenidas mediante modelado por homología nos permitió realizar algunas observaciones que pudieran ser importantes en mejor entendimiento de la interacción canal-toxina.

Bibliografia

1. Adelman, J.P., Shen, K.Z., Kavanaugh, M.P., Warren, R.A., Wu, Y.N., Lagrutta, A., Bond, C.T., and North, R.A. (1992). Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs. *Neuron* 9, 209-216.
2. Aiyar, J., Rizzi, J.P., Gutman, G.A., and Chandy, K.G. (1996). The signature sequence of voltage-gated potassium channels projects into the external vestibule. *J.Biol.Chem.* 271, 31013-31016.
3. Aiyar, J., Withka, J.M., Rizzi, J.P., Singleton, D.H., Andrews, G.C., Lin, W., Boyd, J., Hanson, D.C., Simon, M., Dethlefs, B., Lee, C.L., Hall, J.E., Gutman, G.A., and Chandy, K.G. (1995). Topology of the pore-region of a K⁺ channel revealed by the NMR-derived structures of scorpion toxins. *Neuron* 15, 1169-1181.
4. Alioua, A., Tanaka, Y., Wallner, M., Hofmann, F., Ruth, P., Meera, P., and Toro, L. (1998). The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K⁺ channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J. Biol.Chem.* 273, 32950-32956.
5. Anderson, C.S., MacKinnon, R., Smith, C., and Miller, C. (1988). Charybdotoxin block of single Ca²⁺-activated K⁺ channels. Effects of channel gating, voltage, and ionic strength. *J.Gen.Physiol* 91, 317-333.
6. Anderson, P.A. and Greenberg, R.M. (2001). Phylogeny of ion channels: clues to structure and function. *Comp Biochem.Physiol B Biochem.Mol.Biol.* 129, 17-28.
7. Atkinson, N.S., Robertson, G.A., and Ganetzky, B. (1991). A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila slo* locus. *Science* 253, 551-555.
8. Batista, C.V., Gomez-Lagunas, F., Lucas, S., and Possani, L.D. (2000). Tc1, from *Tityus cambridgei*, is the first member of a new subfamily of scorpion toxin that blocks K⁽⁺⁾-channels. *FEBS Lett.* 486, 117-120.
9. Behrens, R., Nolting, A., Reimann, F., Schwarz, M., Waldschutz, R., and Pongs, O. (2000). hKCNMB3 and hKCNMB4, cloning and characterization of two members of the large-conductance calcium-activated potassium channel beta subunit family. *FEBS Lett.* 474, 99-106.
10. Bentrop, D., Beyermann, M., Wissmann, R., and Fakler, B. (2001). NMR structure of the "ball-and-chain" domain of KCNMB2, the beta 2- subunit of large conductance Ca²⁺- and voltage-activated potassium channels. *J.Biol.Chem.* 276, 42116-42121.
11. Bian, S., Favre, I., and Moczydlowski, E. (2001). Ca²⁺-binding activity of a COOH-terminal fragment of the *Drosophila* BK channel involved in Ca²⁺-dependent activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 4776-4781.
12. Blanc, E., Fremont, V., Sizun, P., Meunier, S., Van Rietschoten, J., Thevand, A., Bernassau, J.M., and Darbon, H. (1996). Solution structure of P01, a natural scorpion peptide structurally analogous to scorpion toxins specific for apamin-sensitive potassium channel. *Proteins* 24, 359-369.
13. Blanc, E., Lecomte, C., Rietschoten, J.V., Sabatier, J.M., and Darbon, H. (1997a). Solution structure of TsK_α, a charybdotoxin-like scorpion toxin from *Tityus serrulatus* with high affinity for apamin-sensitive Ca⁽²⁺⁾- activated K⁺ channels. *Proteins* 29, 359-369.

14. Blanc,E., Romi-Lebrun,R., Bornet,O., Nakajima,T., and Darbon,H. (1998). Solution structure of two new toxins from the venom of the Chinese scorpion *Buthus martensi* Karsch blockers of potassium channels. *Biochemistry* 37, 12412-12418.
15. Blanc,E., Sabatier,J.M., Kharrat,R., Meunier,S., El Ayeb,M., Van Rietschoten,J., and Darbon,H. (1997b). Solution structure of maurotoxin, a scorpion toxin from *Scorpio maurus*, with high affinity for voltage-gated potassium channels. *Proteins* 29, 321-333.
16. Bontems,F., Roumestand,C., Boyot,P., Gilquin,B., Doljansky,Y., Menez,A., and Toma,F. (1991). Three-dimensional structure of natural charybdotoxin in aqueous solution by 1H-NMR. Charybdotoxin possesses a structural motif found in other scorpion toxins. *Eur.J.Biochem.* 196, 19-28.
17. Braun,A.F. and Sy,L. (2001). Contribution of potential EF hand motifs to the calcium-dependent gating of a mouse brain large conductance, calcium-sensitive K(+) channel. *J.Physiol* 533, 681-695.
18. Brenner,R., Jegla,T.J., Wickenden,A., Liu,Y., and Aldrich,R.W. (2000). Cloning and functional characterization of novel large conductance calcium-activated potassium channel beta subunits, hKCNMB3 and hKCNMB4. *J. Biol.Chem.*275, 6453-6461.
19. Butler,A., Tsunoda,S., McCobb,D.P., Wei,A., and Salkoff,L. (1993). *mSlo*, a complex mouse gene encoding "maxi" calcium-activated potassium channels. *Science* 261, 221-224.
20. Candia,S., Garcia,M.L., and Latorre,R. (1992). Mode of action of iberiotoxin, a potent blocker of the large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Biophys. J.*63, 583-590.
21. Canto,J., Fernandez,Y., Pons,M., Giralt,E., and Perez,J.J. (1999). Molecular dynamics study of kaliotoxin in water. *Int.J.Biol.Macromol.* 24, 1-9.
22. 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.
23. Catterall,W.A. (2001). A 3D view of sodium channels. *Nature* 409, 988-9, 991.
24. Cornet,B., Bonmatin,J.M., Hetru,C., Hoffmann,J.A., Ptak,M., and Vovelle,F. (1995). Refined three-dimensional solution structure of insect defensin A. *Structure.* 3, 435-448.
25. Crest,M. and Gola,M. (1993). Large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels are involved in both spike shaping and firing regulation in *Helix* neurones. *J. Physiol.*465, 265-287.
26. Cui,M., Shen,J., Briggs,J.M., Luo,X., Tan,X., Jiang,H., Chen,K., and Ji,R. (2001). Brownian dynamics simulations of interaction between scorpion toxin Lq2 and potassium ion channel. *Biophys. J.*80, 1659-1669.
27. Darbon,H., Blanc,E., and Sabatier,J.M. (1999). Three-dimensional structure of scorpion toxins: towards a new model of interaction with potassium channels. *Perspectives Drug Disc.Design* 15/16, 41-60.
28. Dauplais,M., Gilquin,B., Possani,L.D., Gurrola-Briones,G., Roumestand,C., and Menez,A. (1995). Determination of the three-dimensional solution structure of noxiustoxin: analysis of structural differences with related short-chain scorpion toxins. *Biochemistry* 34, 16563-16573.
29. 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.Physiol* 264, C361-C369.
30. Dehesa-Davila,M. and Possani,L.D. (1994). Scorpionism and serotherapy in Mexico. *Toxicon* 32, 1015-1018.

31. Delepieyre, M., Prochnicka-Chalufour, A., Boisbouvier, J., and Possani, L.D. (1999). Pi7, an orphan peptide from the scorpion *Pandinus imperator*: a 1H-NMR analysis using a nano-NMR Probe. *Biochemistry* 38, 16756-16765.
32. Diaz, F., Wallner, M., Stefani, E., Toro, L., and Latorre, R. (1996). Interaction of internal Ba²⁺ with a cloned Ca(2⁺)-dependent K⁺ (hsl α) channel from smooth muscle. *J. Gen. Physiol.* 107, 399-407.
33. Dick, G.M., Rossow, C.F., Smirnov, S., Horowitz, B., and Sanders, K.M. (2001). Tamoxifen activates smooth muscle BK channels through the regulatory beta 1 subunit. *J. Biol. Chem.* 276, 34594-34599.
34. Dick, G.M. and Sanders, K.M. (2001). (Xeno)estrogen sensitivity of smooth muscle BK channels conferred by the regulatory beta1 subunit: a study of beta1 knockout mice. *J. Biol. Chem.* 276, 44835-44840.
35. Ding, J.P., Li, Z.W., and Lingle, C.J. (1998). Inactivating BK channels in rat chromaffin cells may arise from heteromultimeric assembly of distinct inactivation-competent and noninactivating subunits. *Biophys. J.* 74, 268-289.
36. Doyle, D.A., Cabral, J.M., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280, 69-77.
37. Dutzler, R., Campbell, E.B., Cadene, M., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (2002b). X-ray structure of a Cl⁻ channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* 415, 287-294.
38. Dworetzky, S.I., Boissard, C.G., Lum-Ragan, J.T., McKay, M.C., Post-Munson, D.J., Trojnecki, J.T., Chang, C.P., and Gribkoff, V.K. (1996). Phenotypic alteration of a human BK (hSlo) channel by hSlobeta subunit coexpression: changes in blocker sensitivity, activation/relaxation and inactivation kinetics, and protein kinase A modulation. *J. Neurosci.* 16, 4543-4550.
39. Ellis, K.C., Tenenholz, T.C., Jerng, H., Hayhurst, M., Dudlak, C.S., Gilly, W.F., Blaustein, M.P., and Weber, D.J. (2001). Interaction of a toxin from the scorpion *Tityus serrulatus* with a cloned K⁺ channel from squid (sqKv1A). *Biochemistry* 40, 5942-5953.
40. Escobar, L., Root, M.J., and MacKinnon, R. (1993). Influence of protein surface charge on the bimolecular kinetics of a potassium channel peptide inhibitor. *Biochemistry* 32, 6982-6987.
41. Fernandez, J., Romi, R., Szendeffy, S., Martin-Eauclaire, M.F., Rochat, H., Van Rietschoten, J., Pons, M., and Giralt, E. (1994). Kaliotoxin (1-37) shows structural differences with related potassium channel blockers. *Biochemistry* 33, 14256-14263.
42. Ferrat, G., Bernard, C., Fremont, V., Mullmann, T.J., Giangiacomo, K.M., and Darbon, H. (2001). Structural basis for alpha-K toxin specificity for K⁺ channels revealed through the solution 1H NMR structures of two noxiustoxin-iberiotoxin chimeras. *Biochemistry* 40, 10998-11006.
43. Galvez, A., Gimenez-Gallego, G., Reuben, J.P., Roy-Contancin, L., Feigenbaum, P., Kaczorowski, G.J., and Garcia, M.L. (1990). Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *J. Biol. Chem.* 265, 11083-11090.
44. Garcia-Valdes, J., Zamudio, F.Z., Toro, L., Possani, L.D., and Possani, L.D. (2001a). Slotoxin, alphaKTxl.11, a new scorpion peptide blocker of MaxiK channels that differentiates between alpha and alpha+beta (beta1 or beta4) complexes. *FEBS Lett.* 505, 369-373.

45. Garcia,M.L., Hanner,M., Knaus,H.G., Slaughter,R., and Kaczorowski,G.J. (1999). Scorpion toxins as tools for studying potassium channels. *Methods Enzymol* 294, 624-639.
46. Giangiacomo,K.M., Fremont,V., Mullmann,T.J., Hanner,M., Cox,R.H., and Garcia,M.L. (2000). Interaction of charybdotoxin S10A with single maxi-K channels: kinetics of blockade depend on the presence of the beta 1 subunit. *Biochemistry* 39, 6115-6122.
47. Giangiacomo,K.M., Gabriel,J., Fremont,V., and Mullmann,T.J. (1999). Probing the structure and function of potassium channels with alpha-K toxin blockers. *Perspectives Drug Disc.Design* 15/16, 167-186.
48. Giangiacomo,K.M., Garcia,M.L., and McManus,O.B. (1992). Mechanism of iberiotoxin block of the large-conductance calcium- activated potassium channel from bovine aortic smooth muscle. *Biochemistry* 31, 6719-6727.
49. Goldstein,S.A. and Miller,C. (1993). Mechanism of charybdotoxin block of a voltage-gated K⁺ channel. *Biophys.J.* 65, 1613-1619.
50. 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.
51. Gomez-Lagunas,F., Olamendi-Portugal,T., Zamudio,F.Z., and Possani,L.D. (1996). Two novel toxins from the venom of the scorpion *Pandinus imperator* show that the N-terminal amino acid sequence is important for their affinities towards Shaker B K⁺ channels. *J.Membr.Biol.* 152, 49-56.
52. Gross,A., Abramson,T., and MacKinnon,R. (1994). Transfer of the scorpion toxin receptor to an insensitive potassium channel. *Neuron* 13, 961-966.
53. Gross,A. and MacKinnon,R. (1996). Agitoxin footprinting the shaker potassium channel pore. *Neuron* 16, 399-406.
54. Gurrola,G.B., Rosati,B., Rocchetti,M., Pimienta,G., Zaza,A., Arcangeli,A., Olivotto,M., Possani,L.D., and Wanke,E. (1999). A toxin to nervous, cardiac, and endocrine ERG K⁺ channels isolated from *Centruroides noxius* scorpion venom. *FASEB J.* 13, 953-962.
55. Hamill,O.P., Marty,A., Neher,E., Sakmann,B., and Sigworth,F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflüger Arch.* 391, 85-100.
56. Hanner,M., Vianna-Jorge,R., Kamassah,A., Schmalhofer,W.A., Knaus,H.G., Kaczorowski,G.J., and Garcia,M.L. (1998). The beta subunit of the high conductance calcium-activated potassium channel. Identification of residues involved in charybdotoxin binding. *J Biol Chem* 273, 16289-16296.
57. 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.
58. Hille,B. (2001). *Ion channels of excitable membranes.* (MA: Sinauer Associates, Inc.).
59. Ishibashi,K., Suzuki,M., and Imai,M. (2000). Molecular cloning of a novel form (two-repeat) protein related to voltage-gated sodium and calcium channels. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 270, 370-376.
60. Jaravine,V.A., Nolde,D.E., Reibarkh,M.J., Korolkova,Y.V., Kozlov,S.A., Pluzhnikov,K.A., Grishin,E.V., and Arseniev,A.S. (1997). Three-dimensional structure of toxin OSK1 from *Orthochirus scrobiculosus* scorpion venom. *Biochemistry* 36, 1223-1232.

61. Jiang, Y., Pico, A., Cadene, M., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (2001). Structure of the RCK domain from the *E. coli* K⁺ channel and demonstration of its presence in the human BK channel. *Neuron* 29, 593-601.
62. Jiang, Z., Wallner, M., Meera, P., and Toro, L. (1999). Cloning and characterization of human and rodent MaxiK channel β subunit genes: Cloning and characterization. *Genomics* 55, 57-67.
63. Jin, W., Klem, A.M., Lewis, J.H., and Lu, Z. (1999). Mechanisms of inward-rectifier K⁺ channel inhibition by tertiapin-Q. *Biochemistry* 38, 14294-14301.
64. Jin, W. and Lu, Z. (1999). Synthesis of a stable form of tertiapin: a high-affinity inhibitor for inward-rectifier K⁺ channels. *Biochemistry* 38, 14286-14293.
65. Johnson, B.A., Stevens, S.P., and Williamson, J.M. (1994). Determination of the three-dimensional structure of margatoxin by 1H, 13C, 15N triple-resonance nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 33, 15061-15070.
66. Johnson, B.A. and Sugg, E.E. (1992). Determination of the three-dimensional structure of iberiotoxin in solution by 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 31, 8151-8159.
67. Joiner, W.J., Tang, M.D., Wang, L.-Y., Dworetzky, S.I., Boissard, C.G., Gan, L., Gribkoff, V.K., and Kaczmarek, L.K. (1998). Formation of intermediate-conductance calcium-activated potassium channels by interaction of Slack and Slo subunits. *Nature Neurosci.* 1, 462-469.
68. Kerr, I.D. and Sansom, M.S.P. (1995). Sequence analysis and molecular dynamics studies of potassium channel transmembrane helices. *Biochem. Soc. Trans.* 23, 415S.
69. Klenk, K.C., Tenenholz, T.C., Matteson, D.R., Rogowski, R.S., Blaustein, M.P., and Weber, D.J. (2000). Structural and functional differences of two toxins from the scorpion *Pandinus imperator*. *Proteins* 38, 441-449.
70. Knaus, H.G., Folander, K., Garcia-Calvo, M., Garcia, M.L., Kaczorowski, G.J., Smith, M., and Swanson, R. (1994). Primary sequence and immunological characterization of β -subunit of high conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel from smooth muscle. *J. Biol.Chem.* 269, 17274-17278.
71. Korolkova, Y.V., Kozlov, S.A., Lipkin, A.V., Pluzhnikov, K.A., Hadley, J.K., Filippov, A.K., Brown, D.A., Angelo, K., Strobaek, D., Jespersen, T., Olesen, S.P., Jensen, B.S., and Grishin, E.V. (2001). An ERG channel inhibitor from the scorpion *Buthus eupeus*. *J. Biol.Chem.* 276, 9868-9876.
72. Krezel, A.M., Kasibhatla, C., Hidalgo, P., MacKinnon, R., and Wagner, G. (1995). Solution structure of the potassium channel inhibitor agitoxin 2: caliper for probing channel geometry. *Protein Sci.* 4, 1478-1489.
73. Latorre, R. (1994). Molecular workings of large conductance (Maxi) Ca²⁺-activated K⁺ channels. In *Handbook of Membrane Channels: Molecular and Cellular Physiology*, C. Peracchia, ed. (San Diego, CA: Academic Press, Inc.), pp. 79-102.
74. Li-Smerin, Y., Hackos, D.H., and Swartz, K.J. (2000). A localized interaction surface for voltage-sensing domains on the pore domain of a K⁺ channel. *Neuron* 25, 411-423.
75. Lu, Q. and Miller, C. (1995). Silver as a probe of pore-forming residues in a potassium channel. *Science* 268, 304-307.
76. MacKinnon, R. and Miller, C. (1988). Mechanism of charybdotoxin block of the high-conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channel. *J.Gen.Physiol* 91, 335-349.

77. MacKinnon,R. and Miller,C. (1989). Functional modification of a Ca²⁺-activated K⁺ channel by trimethylxonium. *Biochemistry* 28, 8087-8092.
78. Martins,J.C., Van de Ven,F.J., and Borremans,F.A. (1995). Determination of the three-dimensional solution structure of scyllatoxin by 1H nuclear magnetic resonance. *J.Mol.Biol.* 253, 590-603.
79. McManus,O.B., Harris,G.H., Giangiacomo,K.M., Feigenbaum,P., Reuben,J.P., Addy,M.E., Burka,J.F., Kaczorowski,G.J., and Garcia,M.L. (1993). An activator of calcium-dependent potassium channels isolated from a medicinal herb. *Biochemistry* 32, 6128-6133.
80. Meera,P., Wallner,M., Song,M., and Toro,L. (1997). Large conductance voltage- and calcium-dependent K⁺ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94, 14066-14071.
81. Meera,P., Wallner,M., and Toro,L. (2000). A neuronal beta subunit (KCNMB4) makes the large conductance, voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channel resistant to charybdotoxin and iberiotoxin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 97, 5562-5567.
82. Menez,A., Bontems,F., Roumestad,C., Gilquin,B., and Toma,F. (1992). Structural basis for functional diversity of animal toxins. *Proc.Royal Soc.Edinburgh* 99B, 83-103.
83. Meunier,S., Bernassau,J.-M., Sabatier,J.-M., Martin-Eauclaire,M.F., Van Rietschoten,J., Cambillau,C., and Darbon,H. (1993). Solution structure of P05-NH₂, a scorpion toxin analog with high affinity for the apamin-sensitive potassium channel. *Biochemistry* 32, 11969-11976.
84. Miller,C. (1988). Competition for block of a Ca²⁺ -activated K⁺ channel by charybdotoxin and tetraethylammonium. *Neuron* 1, 1003-1006.
85. Miller,C. (1993). Potassium selectivity in proteins: Oxygen cage or π in the face. *Science* 261, 1692-1693.
86. Miller,C. (1995). The charybdotoxin family of K⁺ channel-blocking peptides. *Neuron* 15, 5-10.
87. Miller,C. (2000a). An overview of the potassium channel family. *Genome Biol.* 1, REVIEW.
88. Miller,C. (2000b). Ion channels: doing hard chemistry with hard ions. *Curr.Opin.Chem.Biol.* 4, 148-151.
89. 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.
90. Miller,C., Moczydlowski,E., Latorre,R., and Phillips,M. (1985a). Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca²⁺-activated K⁺ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature* 313, 316-318.
91. Monks,S.A., Needleman,D.J., and Miller,C. (1999). Helical structure and packing orientation of the S2 segment in the Shaker K⁺ channel. *J.Gen.Physiol* 113, 415-423.
92. Morais-Cabral,J.H., Zhou,Y., and MacKinnon,R. (2001). Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature* 414, 37-42.
93. Munujos,P., Knaus,H.G., Kaczorowski,G.J., and Garcia,M.L. (1995). Cross-linking of charybdotoxin to high-conductance calcium-activated potassium channels: identification of the covalently modified toxin residue. *Biochemistry* 34, 10771-10776.
94. Myers,M.P. and Stampe,P. (2000). A point mutation in the maxi-K clone dSlo forms a high affinity site for charybdotoxin. *Neuropharmacology* 39, 11-20.

95. Naranjo,D. and Miller,C. (1996). A strongly interacting pair of residues on the contact surface of charybdotoxin and a Shaker K⁺ channel. *Neuron* 16, 123-130.
96. Oberst,C., Weiskirchen,R., Hartl,M., and Bister,K. (1997). Suppression in transformed avian fibroblasts of a gene (CO6) encoding a membrane protein related to mammalian potassium channel regulatory subunits. *Oncogene* 14, 1109-1116.
97. Olamendi-Portugal,T., Gomez-Lagunas,F., Gurrola,G.B., and Possani,L.D. (1998). Two similar peptides from the venom of the scorpion *Pandinus imperator*, one highly effective blocker and the other inactive on K⁺ channels. *Toxicon* 36, 759-770.
98. Ottolia,M. and Toro,L. (1994). Potentiation of large-conductance K_{Ca} channels by niflumic, flufenamic and mefenamic acids. *Biophys J.* 67, 2272-2279.
99. Pardo-Lopez,L., Garcia-Valdes,J., Gurrola,G.B., Robertson,G.A. and Possani,L.D. (2002). "Mapping the receptor site for ergtoxin, a specific blocker of ERG channels" *FEBS Lett* 510, 45-49.
100. Pardo-Lopez,L., Zhang,M., Liu,J., Jiang,M., Possani,L.D., and Tseng,G. (2002). *J. Biol.Chem.* 277 16403-16411.
101. Park,C.S. and Miller,C. (1992). Interaction of charybdotoxin with permeant ions inside the pore of a K⁺ channel. *Neuron* 9, 307-313.
102. Pérez,G., Ottolia,M., Lagrutta,A., Adelman,J.P., and Toro,L. (1994). Modulation of *Slo* K_{Ca} channels by phosphorylation in lipid bilayers. *Biophys. J.* 66, A342.
103. Pisciotta,M., Coronas,F.I., Bloch,C., Prestipino,G., and Possani,L.D. (2000). Fast K(+) currents from cerebellum granular cells are completely blocked by a peptide purified from *Androctonus australis* Garzoni scorpion venom. *Biochim.Biophys.Acta* 1468, 203-212.
104. Possani,L.D., Becerril,B., Delepierre,M., and Tytgat,J. (1999a). Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *Eur.J.Biochem.* 264, 287-300.
105. Possani,L.D., Calderon,E.S., Olamendi,T.P., Dehesa-Davila,M., and Gurrola,G. (1996). Protección contra el alacranismo. In *Vacunas, ciencia y salud*, A. G. Escobar, J. L. G. Valdespino, and J. A. Sepulveda, eds. (Mexico DF: Secretaria de Salud. Subsecretaria de Coordinación y Desarrollo), pp. 553-567.
106. Possani,L.D., Selisko,B., and Gurrola,G. (1999b). Structure and function of scorpion toxins affecting K Channels. *Perspectives Drug Disc.Design* 15/16, 15-40.
107. Quirk,J.C. and Reinhart,P.H. (2001). Identification of a novel tetramerization domain in large conductance K(ca) channels. *Neuron* 32, 13-23.
108. Ramanathan,K., Michael,T.H., and Fuchs,P.A. (2000). beta subunits modulate alternatively spliced, large conductance, calcium-activated potassium channels of avian hair cells. *J.Neurosci.* 20, 1675-1684.
109. Ramanathan,K., Michael,T.H., Jiang,G.J., Hiel,H., and Fuchs,P.A. (1999). A Molecular Mechanism for Electrical Tuning of Cochlear Hair Cells. *Science* 283, 215-217.
110. Rumu,Y., Klem,A.M., and Lu,Z. (2001). Titration of tertiapin-Q inhibition of ROMK1 channels by extracellular protons. *Biochemistry* 40, 3601-3605.
111. Ranganathan,R., Lewis,J.H., and MacKinnon,R. (1996). Spatial localization of the K⁺ channel selectivity filter by mutant cycle-based structure analysis. *Neuron* 16, 131-139.

112. Rauer, H., Lanigan, M.D., Pennington, M.W., Aiyar, J., Ghanshani, S., Cahalan, M.D., Norton, R.S., and Chandy, K.G. (2000). Structure-guided transformation of charybdotoxin yields an analog that selectively targets Ca(2+)-activated over voltage-gated K(+) channels. *J. Biol. Chem.* **275**, 1201-1208.
113. Renisio, J.G., Lu, Z., Blanc, E., Jin, W., Lewis, J.H., Bomet, O., and Darbon, H. (1999). Solution structure of potassium channel-inhibiting scorpion toxin Lq2. *Proteins* **34**, 417-426.
114. Rojas, P., Orio, P., Toro, L., Garcia, M.L., and Latorre, R. (2002). *Biophys. J.* **82** A998
115. Romi-Lebrun, R., Lebrun, B., Martin-Eauclaire, M.F., Ishiguro, M., Escoubas, P., Wu, F.Q., Iisada, M., Pongs, O., and Nakajima, T. (1997). Purification, characterization, and synthesis of three novel toxins from the Chinese scorpion *Buthus martensi*, which act on K+ channels. *Biochemistry* **36**, 13473-13482.
116. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Vols. I, II, III. (Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
117. Sato, C., Ueno, Y., Asai, K., Takahashi, K., Sato, M., Engel, A., and Fujiyoshi, Y. (2001). The voltage-sensitive sodium channel is a bell-shaped molecule with several cavities. *Nature* **409**, 1047-1051.
118. Savarin, P., Romi-Lebrun, R., Zinn-Justin, S., Lebrun, B., Nakajima, T., Gilquin, B., and Menez, A. (1999). Structural and functional consequences of the presence of a fourth disulfide bridge in the scorpion short toxins: solution structure of the potassium channel inhibitor HsTX1. *Protein Sci.* **8**, 2672-2685.
119. Scaloni, A., Bottiglieri, C., Ferrara, L., Corona, M., Gurrola, G.B., Batista, C., Wanke, E., and Possani, L.D. (2000). Disulfide bridges of ergtoxin, a member of a new sub-family of peptide blockers of the ether-a-go-go-related K+ channel. *FEBS Lett.* **479**, 156-157.
120. Schoenmakers, T.J., Visser, G.J., Flik, G., and Theuvsnet, A.P. (1992). CIELATOR: an improved method for computing metal ion concentrations in physiological solutions. *Biotechniques* **12**, 870-4, 876-9.
121. Schreiber, M. and Salkoff, L. (1997). A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys J* **73**, 1355-1363.
122. Schreiber, M., Wei, A., Yuan, A., Gaut, J., Saito, M., and Salkoff, L. (1998). Slo3, a novel pH-sensitive K+ channel from mammalian spermatocytes. *J. Biol. Chem.* **273**, 3509-3516.
123. Schreiber, M., Yuan, A., and Salkoff, L. (1999). Transplantable sites confer calcium sensitivity to BK channels. *Nat. Neurosci.* **2**, 416-421.
124. Schumacher, M.A., Rivard, A.F., Bachinger, H.P., and Adelman, J.P. (2001). Structure of the gating domain of a Ca2+-activated K+ channel complexed with Ca2+/calmodulin. *Nature* **410**, 1120-1124.
125. Selisko, B., Garcia, C., Becerril, B., Gomez-Lagunas, F., Garay, C., and Possani, L.D. (1998). Cobatoxins 1 and 2 from *Centruroides noxius* Hoffmann constitute a subfamily of potassium-channel-blocking scorpion toxins. *Eur. J. Biochem.* **254**, 468-479.
126. Shakkottai, V.G., Regaya, I., Wulff, H., Fajloun, Z., Tomita, H., Fathallah, M., Cahalan, M.D., Gargus, J.J., Sabatier, J.M., and Chandy, K.G. (2001). Design and characterization of a highly selective peptide inhibitor of the small conductance calcium-activated K+ channel, SkCa2. *J. Biol. Chem.* **276**, 43145-43151.
127. Shih, T.M., Smith, R.D., Toro, L., and Goldin, A.L. (1998). High-level expression and detection of ion channels in *Xenopus* oocytes. *Methods Enzymol.* **293**, 529-556.
128. Shipston, M.J. (2001). Alternative splicing of potassium channels: a dynamic switch of cellular excitability. *Trends Cell Biol.* **11**, 353-358.

129. Sokolova, O., Kolmakova-Partensky, L., and Grigorieff, N. (2001). Three-dimensional structure of a voltage-gated potassium channel at 2.5 nm resolution. *Structure*. (Camb.) *9*, 215-220.
130. Song, J., Gilquin, B., Jamin, N., Drakopoulou, E., Guenneugues, M., Dauplais, M., Vita, C., and Menez, A. (1997). NMR solution structure of a two-disulfide derivative of charybdotoxin: structural evidence for conservation of scorpion toxin alpha/beta motif and its hydrophobic side chain packing. *Biochemistry* *36*, 3760-3766.
131. Stampe, P., Kolmakova-Partensky, L., and Miller, C. (1994). Intimations of K⁺ channel structure from a complete functional map of the molecular surface of charybdotoxin. *Biochemistry* *33*, 443-450.
132. Stocker, M. and Miller, C. (1994). Electrostatic distance geometry in a K⁺ channel vestibule. *Proc. Nat. Acad. of Sci. U S A* *91*, 9509-9513.
133. Stuhmer, W. (1992). Electrophysiological recording from *Xenopus* oocytes. *Methods. Enzymol.* *207P319-39*, 319-339.
134. Tanaka, Y., Meera, P., Song, M., Knaus, H.-G., and Toro, L. (1997). Molecular constituents of maxi K_{Cs} channels in human coronary smooth muscle. Predominant $\alpha + \beta$ subunit complexes. *J. Physiol.* *502*, 545-557.
135. Tenenholz, T.C., Rogowski, R.S., Collins, J.H., Blaustein, M.P., and Weber, D.J. (1997). Solution structure for Pandinus toxin K-alpha (PiTX-K alpha), a selective blocker of A-type potassium channels. *Biochemistry* *36*, 2763-2771.
136. Thompson, J. and Begenisich, T. (2000). Electrostatic interaction between charybdotoxin and a tetrameric mutant of Shaker K(+) channels. *Biophys. J.* *78*, 2382-2391.
137. Tian, L., Duncan, R.R., Hammond, M.S., Coghill, L.S., Wen, H., Rusinova, R., Clark, A.G., Levitan, I.B., and Shipston, M.J. (2001). Alternative splicing switches potassium channel sensitivity to protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.* *276*, 7717-7720.
138. Toro, L., Wallner, M., and Meera, P. (1997). New insights into the topography, gating and modulation of MaxiK channels. In *From Ion Channels to Cell to Cell Conversations*, R. Latorre and J. C. Saez, eds. (New York: Plenum Press), pp. 47-65.
139. Torres-Larios, A., Gurrola, G.B., Zamudio, F.Z., and Possani, L.D. (2000). Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. *Eur. J. Biochem.* *267*, 5023-5031.
140. Tytgat, J., Chandy, K.G., Garcia, M.L., Gutman, G.A., 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: alpha-KTx molecular subfamilies. *Trends Pharmacol. Sci.* *20*, 444-447.
141. Uebele, V.N., Lagrutta, A., Wade, T., Figueroa, D.J., Liu, Y., McKenna, E., Austin, C.P., Bennett, P.B., and Swanson, R. (2000). Cloning and functional expression of 2 families of (beta)-subunits of the large conductance calcium-activated K⁺ channel. *J. Biol. Chem.* *275*, 23211-23218.
142. Vacher, H., Romi-Lebrun, R., Mourre, C., Lebrun, B., Kourrich, S., Masmejean, F., Nakajima, T., Legros, C., Crest, M., Bougis, P.E., and Martin-Eauclaire, M.F. (2001). A new class of scorpion toxin binding sites related to an A-type K⁺ channel: pharmacological characterization and localization in rat brain. *FEBS Lett.* *501*, 31-36.

143. Valdivia, H.H., Smith, J.S., Martin, B.M., Coronado, R., and Possani, L.D. (1988). Charybdotoxin and noxiustoxin two homologous peptide inhibitors of the K⁺ (Ca²⁺) channel. *FEBS Lett* 226, 280-284.
144. Valverde, M.A., Rojas, P., Amigo, J., Cosmelli, D., Orío, P., Bahamonde, M.I., Mann, G.E., Vergara, C., and Latorre, R. (1999). Acute activation of maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit [In Process Citation]. *Science* 285, 1929-1931.
145. Wallner, M., Meera, P., Ottolia, M., Kaczorowski, G.J., Latorre, R., Garcia, M.L., Stefani, E., and Toro, L. (1995). Characterization of and modulation by a beta-subunit of a human maxi KCa channel cloned from myometrium. *Receptors Channels* 3, 185-199.
146. Wallner, M., Meera, P., and Toro, L. (1996). Determinant for β -subunit regulation in high-conductance voltage-activated and Ca²⁺-sensitive K⁺ channels: An additional transmembrane region at the N terminus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93, 14922-14927.
147. Wallner, M., Meera, P., and Toro, L. (1999). Molecular basis of fast inactivation in voltage and Ca²⁺-activated K⁺ channels: A transmembrane β -subunit homolog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 4137-4142.
148. Wang, I., Wu, S.H., Chang, H.K., Shieh, R.C., Yu, H.M., and Chen, C. (2002). Solution structure of a K(+)-channel blocker from the scorpion *Tityus cambridgei*. *Protein Sci.* 11, 390-400.
149. Wei, A., Solaro, C., Lingle, C., and Salkoff, L. (1994). Calcium sensitivity of BK-type K_{Ca} channels determined by a separable domain. *Neuron* 13, 671-681.
150. Wissmann, R., Bildl, W., Neumann, H., Rivard, A.F., Klocker, N., Weitz, D., Schulte, U., Adelman, J.P., Bentsen, D., and Fakler, B. (2001). A helical region in the C-terminus of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels controls assembly with apo-calmodulin. *J. Biol. Chem.*
151. Yellen, G. (2001). Keeping K⁺ completely comfortable. *Nat. Struct. Biol.* 8, 1011-1013.
152. Yuan, A., Dourado, M., Butler, A., and Salkoff, L. (1999). A chloride sensing domain in a large conductance K⁺ channel. *Biophys. J.* 76, A329.
153. Yuan, A., Dourado, M., Butler, A., Walton, N., Wei, A., and Salkoff, L. (2000). SLO-2, a K⁺ channel with an unusual Cl⁻ dependence. *Nat. Neurosci.* 3, 771-779.
154. Zamudio, F.Z., Conde, R., Arevalo, C., Becerril, B., Martin, B.M., Valdivia, H.H., and Possani, L.D. (1997a). The mechanism of inhibition of ryanodine receptor channels by imperatoxin I, a heterodimeric protein from the scorpion *Pandinus imperator*. *J. Biol. Chem.* 272, 11886-11894.
155. Zamudio, F.Z., Gurrola, G.B., Arevalo, C., Sreekumar, R., Walker, J.W., Valdivia, H.H., and Possani, L.D. (1997b). Primary structure and synthesis of Imperatoxin A (IpTx(a)), a peptide activator of Ca²⁺ release channels/ryanodine receptors. *FEBS Lett.* 405, 385-389.
156. Zeng, X.C., Peng, F., Luo, F., Zhu, S.Y., Liu, H., and Li, W.X. (2001). Molecular cloning and characterization of four scorpion K(+)-toxin-like peptides: a new subfamily of venom peptides (alpha-KTx14) and genomic analysis of a member. *Biochimie* 83, 883-889.
157. Zerrouk, H., Laraba-Djebari, F., Fremont, V., Meki, A., Darbon, H., Mansuelle, P., Oughidni, R., Van Rietschoten, J., Rochat, H., and Martin-Eauclaire, M.F. (1996). Characterization of PO1, a new peptide ligand of the apamin-sensitive Ca²⁺ activated K⁺ channel. *International Journal of Peptide and Protein Research* 48, 514-521.

158. Zhou, Y., Morais-Cabral, J.H., Kaufman, A., and MacKinnon, R. (2001). Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel- Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* 414, 43-48.

Slotoxin, α KTxl.11, a new scorpion peptide blocker of MaxiK channels that differentiates between α and $\alpha+\beta$ ($\beta 1$ or $\beta 4$) complexes

Jesús García-Valdés^{a,1}, Fernando Z. Zamudio^a, Ligia Toro^b, Lourival D. Possan^{a,*}

^aDepartment of Molecular Recognition and Structural Biology, Institute of Biotechnology, National Autonomous University of Mexico, Avenida Universidad 2001, P.O. Box 510-J, Cuernavaca 62210, Mexico

^bDepartments of Anesthesiology and Molecular and Medical Pharmacology, Brain Research Institute, University of California, Los Angeles, CA 90095-7115, USA

Received 13 July 2001; accepted 26 July 2001

First published online 5 September 2001

Edited by Maurice Montal

Abstract A novel peptide from *Centruroides noxius* Hoffmann scorpion venom was isolated and sequenced. The 37 amino acid peptide belongs to the charybdoxin sub-family (α KTxl) and was numbered member 11. α KTxl.11 has 75% sequence identity with Iberlotoxin and 54% with charybdoxin. α KTxl.11 revealed specificity for mammalian MaxiK channels (hSlo), thus, was named slotoxin. Slotoxin blocks the MaxiK pore-forming α subunit reversibly ($A_4 = 1.5$ nM). Slotoxin association with $\alpha+\beta$ ($\beta 1$ or $\beta 4$) channels was ~ 10 times slower than Iberlotoxin and charybdoxin, leading to a lack of effect on $\alpha+\beta 4$ when tested at 100 nM for 5 min. Thus, slotoxin is a better tool to distinguish MaxiK $\alpha+\beta$ complexes. © 2001 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Key words: BK channel; Scorpion toxin; Pharmacology; Potassium channel; *Centruroides noxius*

1. Introduction

The large-conductance voltage and calcium-activated potassium (MaxiK, BK) channels are intrinsic membrane proteins that regulate excitability in a large variety of tissues including brain and smooth muscle [1]. MaxiK can be formed only by α subunits or by complexes with at least four families of β subunits [2–5]. The α subunit (Slo) is formed by the 'core' that includes transmembrane segments S0–S6 and hydrophobic regions S7–S8, the C-terminal 'tail' containing S9–S10, and the linker that binds both domains [6]. The 'core' contains the voltage sensor, the pore region and the site for $\beta 1$ subunit interaction [7–9]. The pore is formed by the loops of amino acid sequences between the fifth and sixth membrane spanning domains, and is the place where permeation of ions occur, and where many pharmacologically active peptides bind [10]. Co-expression with β subunits (with two transmembrane domains and a large extracellular loop) modifies the MaxiK α -subunit kinetic behavior, Ca^{2+} sensitivity, modulation, and pharmacological properties like scorpion toxin sensitivity [5,11–15].

Scorpion venoms are rich sources of peptides, which have a variety of pharmacological effects on ion channels. Of special

interest are those that affect ionic membrane permeability [10,16] as they have been excellent tools to study ion channel function and structure [17]. About 50 different peptides from scorpion venoms were recently revised and classified within 12 sub-families, based mainly on structural similarities [18]. All of these peptides have between 23 and 42 amino acid residues. They have in common an α -helix, two or three anti-parallel β -sheets, and three or four disulfide bridges that shape the three-dimensional structure and are essential for channel recognition [19]. Most scorpion toxins specific for K^+ channels are known to behave as pore blockers. The affinity of a given toxin for different types or sub-types of K^+ channels can vary several orders of magnitude [16,17].

Here we describe a new scorpion toxin α KTxl.11 (slotoxin (SloTx)) that specifically inhibits mammalian MaxiK channels and is capable of differentiating among three types of complexes, α , $\alpha+\beta 1$ and $\alpha+\beta 4$.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals, venom and purification procedure

All chemicals were analytical grade reagents obtained from sources already described [20,21]. Scorpions of the species *Centruroides noxius* were milked for venom in the laboratory. The crude venom was dissolved in distilled water and spun at 10000 \times g for 15 min. The supernatant was separated by column (0.9 \times 190 cm) Sephadex G-50 gel filtration, followed by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a semi-preparative C_{18} reverse-phase column (Vydac, Hesperia). Several independent runs of HPLC were obtained. The active fraction was further separated in an analytical C_{18} reverse-phase column using a different gradient (see legend to Fig. 1).

2.2. Amino acid sequence

The amino acid sequence was obtained by automatic Edman degradation in a LF3000 Protein Sequencer (Beckman) [20]. Samples of approximately 1 nmol each of native toxin or reduced and alkylated toxin were applied to the sequencer. A sample of peptide was also cleaved by cyanogen bromide (CNBr) after N-terminal blockade and sequenced. The last amino acid was elucidated by mass spectrometry analysis. The molecular masses were obtained on a Voyager DE-PRO (PerSeptive Biosystems) equipped with a nitrogen laser (337 nm) [22].

2.3. Electrostatic potential analysis

Electrostatic potentials were obtained after homology modeling and energy minimization using parameters of charybdoxin (ChTx) solution structure (Swiss-Prot Accession No. 2C7RD), Swiss-Model and Deep View (Swiss-Pdb Viewer) [23] (<http://www.expasy.ch/spdv/>).

2.4. Electrophysiological measurements

cRNA for hSlo (human MaxiK α subunit), dSlo (*Drosophila* MaxiK α subunit), Herg, IRK, Kv1.1, Sh1R, SK1, SK2 and SK3 α sub-

*Corresponding author. Fax: (52)-73-172388.

E-mail address: possan@ibt.unam.mx (L.D. Possan).

¹ Present address: Department of Anesthesiology, University of California, Los Angeles, CA 90095-7115, USA.

units and MaxiK β I and β II subunits were synthesized using mMES-SAGE mMACHINE In Vitro Transcription Kit (Ambion). cRNA were injected into *Xenopus* oocytes using 1–2 ng of α subunits, and when appropriate, with ~20-fold molar excess of β subunits. These conditions have shown a saturating effect of the β subunit on the Ca^{2+} -sensitivity of MaxiK α subunit [4,13]. Potassium currents were recorded 2–7 days after RNA injection.

2.4.1. Two-electrode voltage-clamp. The bath solution was ND-96 (mM): 96 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 5 HEPES, pH 7.0, with NaOH, or modified ND-96 (containing 30 mM KCl and 68 NaCl). Resistance for the voltage and current electrodes were 0.3–0.5 and 1.0–1.5 M Ω , respectively, when filled with 3 M KCl. Holding potentials were: -90 mV for Herg, -80 mV for ShIR and Kv1.1, and 0 mV for IRK2.1. Pulses were from -80 to +80 in 10 mV steps. For Herg, post-test potential was to -120 mV. Macroscopic currents were recorded using the CA1B amplifier (Dagan Corporation). Currents were filtered at 1/5 of the sampling frequency.

2.4.2. Outside-out patches. Pipet and bath solutions contained (mM): 110 K-methanesulfonate, 5 KCl, 10 HEPES, 5 N-(2-hydroxyethyl)ethyl-enediethylenetriacetic acid, pH 7.0. Different free intracellular Ca^{2+} solutions were prepared by addition of CaCl_2 according to the Chelator program [24] and adjusted using a calcium-selective electrode (World Precision Instruments). Patch pipets had resistances of 2–4 M Ω . Holding potential was 0 mV for dSlo, hSlo, SK1, SK2 and SK3. An EPC-7 amplifier (List Medical) and pCLAMP software (Axon Instruments) were used for acquisition and analysis. Bovine serum albumin (0.001%) was present in all toxin and washing solutions.

2.4.3. Curve fitting. Pharmacological experiments were fitted assuming a bimolecular reaction. Association (k_{on}) and dissociation (k_{off}) rates, and equilibrium dissociation constants (K_d) were obtained as described before [5]. Values are mean \pm S.D.

3. Results and discussion

3.1. Isolation and characterization of the new toxin, $\alpha\text{KTx1.11}$

Three distinct fractions (Fig. 1a, I, II and III) were obtained after separation of *C. noxius* soluble venom on a Sephadex G-50 column. Only fraction II was capable of inhibiting MaxiK currents assayed at 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ protein. Fraction II was further purified by HPLC in a C_{18} semi-preparative column yielding a complicated pattern of separation (Fig. 1b). To facilitate identification of active peptides, the HPLC output was pooled into six fractions II.1 to II.6 (horizontal bars, labeled 1 to 6). Only fraction II.2 blocked MaxiK currents ($n=3$). This fraction contained about 22 different components (Fig. 1b, left-side inset), but only component 22 had MaxiK channel activity ($n=3$). Therefore, component number 22 (asterisk) was further purified to homogeneity (Fig. 1b, right-side inset).

The purified peptide was directly sequenced and the first 36 amino acid residues were unequivocally identified (Fig. 1c, arrow marked with d). The presence of a Met in position 29 facilitated CNBr cleavage of the peptide. The N-terminal amino acid was alkylated before CNBr cleavage. Sequence determination of the C-terminal peptide confirmed the sequence of the last seven residues (Fig. 1c, arrow marked with CNBr). The last residue was obtained by mass spectrometry analysis (Fig. 1c, arrowhead marked with MS). The native peptide had a molecular mass of 4082.82. The first 36 residues accounted for a mass of 3983.83, taking into consideration the three disulfide bridges typical of MaxiK blocking toxins [19]. The missing amino acid residue of the sequence should have a molecular mass of 99.01, which corresponds exactly to that of valine. Thus, it is very likely that the full amino acid sequence of this peptide contains 37 amino acid residues.

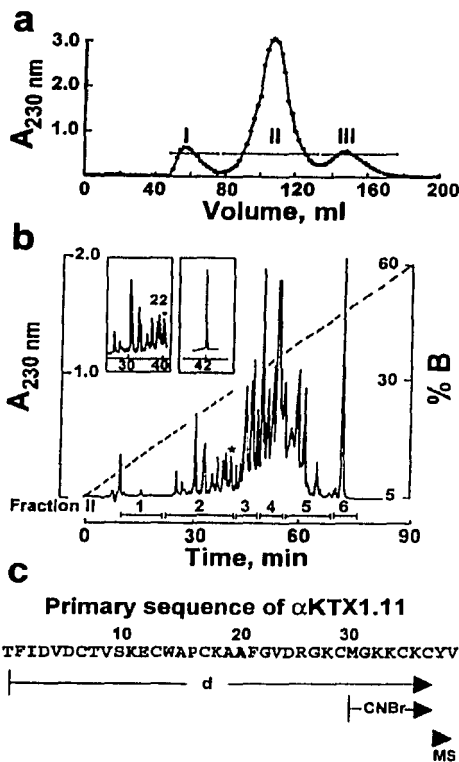


Fig. 1. Purification and sequence of $\alpha\text{KTx1.11}$ (StoTx). a: Three fractions (I–III) were obtained after the soluble *C. noxius* venom (80 mg) was separated in a Sephadex G-50 column using 20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.7. b: The active fraction (II) was further separated by HPLC, using a semi-preparative C_{18} reverse-phase column, with a linear gradient of solution A (0.12% trifluoroacetic acid/water) to 60% of solution B (0.10% trifluoroacetic acid/acetonitrile). Left-side inset: Fraction II.2 was run in an analytical C_{18} reverse-phase column with a linear gradient from 5% to 40% solution B in 90 min. Right-side inset: Re-chromatography of component 22 (labeled with asterisk in the left-side inset). Pure peptide corresponds to less than 0.5% of the soluble venom. c: Amino acid sequence obtained by direct sequencing of the native peptide (td), CNBr cleaved peptide, and mass spectrometry analysis (MS). Arrows mark the sequence obtained by each method.

Sequence comparison using BLASTP showed that the purified peptide has a greater similarity with the ChTx sub-family, αKTx1 , than to other sub-families of the short-chain αKTx family from scorpion venoms [18]. The new toxin is closely related to limbatustoxin (LbTx; $\alpha\text{KTx1.4}$) [25] with 84% identity, and to iberiotoxin (IbTx; $\alpha\text{KTx1.3}$) with 76% identity. The identity with ChTx ($\alpha\text{KTx1.1}$) was only 54% (Fig. 2a). We decided to classify this new toxin, $\alpha\text{KTx1.11}$.

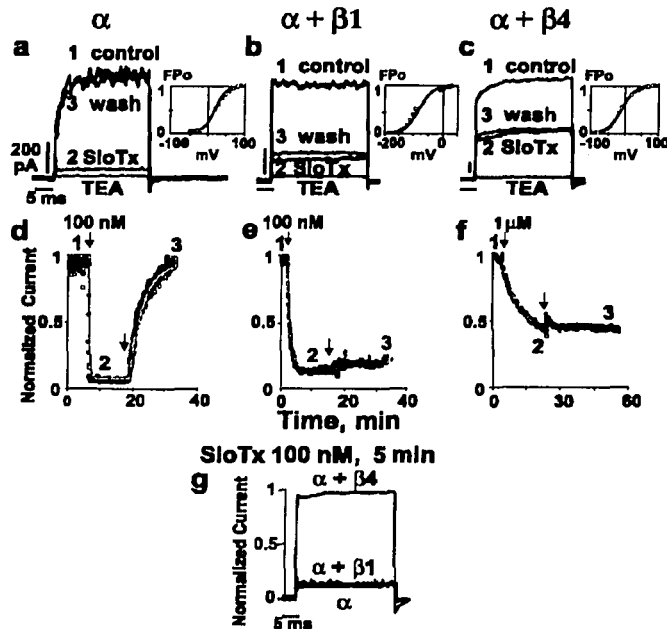


Fig. 3. Blocking properties of α KTx1.11 on MaxiK channels formed by α or $\alpha+\beta$ complexes. Outside-out patches from *Xenopus* oocytes expressing α (a,d), $\alpha+\beta1$ (b,e) and $\alpha+\beta4$ (c,f) subunits. Currents were elicited at +30 mV from a holding potential of 0 mV every 2 s. a,b,c: Current traces at specific times during the experiment. Numbers in traces (a,b,e) and in time course plots (d,e,f) are equivalent. 1: Control; 2: in presence of toxin; 3: after toxin washout. TEA blockade was performed before toxin application. Arrows mark the time of addition of toxin and washout. d,e,f: Steady-state current amplitudes as a function of time. The gray line is the best fit to a bimolecular blocking reaction, which is only an approximation for $\alpha+\beta1$ and $\alpha+\beta4$ channels. g: Normalized current obtained after 5 min application of 100 nM SloTx to channels formed by α , $\alpha+\beta1$ and $\alpha+\beta4$. Note that the $\beta4$ subunit makes MaxiK channels extremely resistant to SloTx blockade.

ward shift of ~ 85 mV of the voltage activation curves, whereas $\beta4$ caused a shift of ~ 39 mV. Half activation potentials were: 22 ± 13 mV ($n=5$) for the α subunit, -62 ± 8 mV ($n=5$) for $\alpha+\beta1$ subunits and -17 ± 23 mV ($n=4$) for $\alpha+\beta4$ subunits.

Co-expression of the $\beta1$ subunit (Fig. 3b,e) slowed down the on-rate of channel blockade by two orders of magnitude to $(5 \pm 2.8) \times 10^4$ $M^{-1} s^{-1}$ ($n=5$) when compared with the α subunit alone $(3.9 \pm 2.2) \times 10^6$ $M^{-1} s^{-1}$. In addition, the off-rate was dramatically slowed down making SloTx blockade practically irreversible during the experimental time (Fig. 3e; $n=5$). Fig. 3b illustrates control records (1), after ~ 10 min of toxin application (2), and ~ 15 min following washout (3). It also shows that $\beta1$ co-expression does not affect full blockade by 10 mM TEA. Interestingly, if channel blockade was not allowed to reach steady-state, washout induced $\sim 50\%$ of recovery (not shown; $n=2$), which may be indicative of a second binding step between the channel, the toxin and the extracellular loop of the $\beta1$ subunit. Thus, the bimolecular model used to fit the data is only an approximation and K_d values cannot be estimated.

In the case of oocytes co-expressing $\alpha+\beta4$ subunits (Fig.

3c,f), the association rate of the toxin was much slower than when $\beta1$ was co-expressed. The on-rate was decreased by four orders of magnitude to $(5.9 \pm 1) \times 10^2$ $M^{-1} s^{-1}$ ($n=4$) when compared to the α subunit alone. On the other hand, the off-rate was even slower, making the toxin dissociation irreversible within the experimental time (~ 30 min following washout; Fig. 3f). Because of the drastic diminution in the association rate, the toxin concentration was increased to 1 μ M to be able to evaluate the on-rate within a reasonable time frame (~ 25 min; Fig. 3f). Traces in Fig. 3c illustrate the current blockade after ~ 25 min of toxin application (2), ~ 30 min following toxin washout (3), and complete blockade with 10 mM TEA. Fig. 3g illustrates the magnitude of α , $\alpha+\beta1$ and $\alpha+\beta4$ blockade using the same concentration of SloTx (100 nM), 5 min after toxin application. Due to the extreme slow on-rate of SloTx on $\alpha+\beta4$ channels, their blockade is imperceptible in this time range, whereas blockade of channels assembled by $\alpha+\beta1$ or α subunits was $\sim 90\%$. In other words, $\alpha+\beta4$ channels are extremely resistant to SloTx blockade, but once blocked, the toxin interaction is apparently irreversible.

Experiments using $\beta1$ and $\beta4$ demonstrate that SloTx binding to the channel is 10 times slower than the interaction of

Table 1
Specificity of α KTx1.11 toxin for MaxiK channels

Channel	\pm [SloTx] (nM)	Inhibition
hSlo ^a	200	+
dSlo ^a , Kv1.1 ^b , Herg ^b or IRK2.1 ^b	300	-
ShIR ^b	350	-
SK1 ^a , SK2 ^a or SK3 ^a	500	-

^aOutside-out patches and 110 K-methanesulfonate.
^bTwo-electrode voltage-clamp and ND96 or modified ND96.

IbTx and ChTx with the channel when these subunits are present [5]. In fact, 100 nM SloTx is unable to significantly block the channel within 5 min of application in α + β channels (Fig. 3g), whereas IbTx or ChTx block ~20% of the current in this same time frame [5]. Thus, SloTx is a more reliable pharmacological tool than ChTx or IbTx to distinguish channels formed by MaxiK α + β complexes.

3.4. Specificity of α KTx1.11 toxin for MaxiK channels

The toxin specificity was assayed in different types of K⁺ channels such as the voltage-dependent ShIR (Shaker K⁺ channel with inactivation removed), Kv1.1, and Herg; the voltage- and calcium-activated hSlo and dSlo; the voltage-independent/calcium-activated SK1, SK2 and SK3; and the voltage-independent IRK2.1. The two-electrode voltage-clamp system was used to study all voltage-dependent K⁺ channels and IRK2.1. Outside-out patches were used to study all calcium-dependent K⁺ channels. None of these channels showed any type of inhibition when nanomolar concentrations of SloTx were tested (Table 1) and after 10 min of toxin application. The lack of activity of SloTx towards the K⁺ channel types examined here mimics the IbTx inactivity on channels other than the MaxiK channels. Thus, IbTx and the new toxin reported here (SloTx, α KTx1.11) are quite specific for MaxiK channels.

In summary, our results open the possibility to use α KTx1.11 for discriminating channels in different tissues that express α , α + β 1 or α + β 4 channels.

Acknowledgements: This work was supported by grants from Howard Hughes Medical Institute (No. 55000574), CONACYT-Mexico (No. 31691-N) and DGAPA-UNAM (IN216900) to L.P., from NIH (HL-54970) and Human Frontier Science Program Organization to L.T. J.G.V. received a Scholarship from CONACYT-Mexico (No. 62396) and DGEP-UNAM. L.T. is an Established Investigator from the American Heart Association. We thank Genaro Pimenta for helping on the purification of toxin and Cesar Batista for mass spectrometry determinations. We also thank J.P. Adelman, for SK1, SK2 and SK3; R. Joho, for IRK2.1; G. Robertson, for Herg; and M. Montal, for Kv1.1 cDNA.

References

[1] Latorre, R., Oberhauser, A., Labarea, P. and Alvarez, O. (1989) *Annu. Rev. Physiol.* 51, 385-399.
[2] Knäus, H.G., Folander, K., Garcia-Calvo, M., Garcia, M.L.,

Kaczorowski, G.J., Smith, M. and Swanson, R. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 17274-17278.
[3] Wallner, M., Meera, P. and Toro, L. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 4137-4142.
[4] Uebach, V.N., Lagrutta, A., Wade, T., Figueroa, D.J., Liu, Y., McKenna, E., Austin, C.P., Bennett, P.B. and Swanson, R. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 23211-23218.
[5] Meera, P., Wallner, M. and Toro, L. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 5562-5567.
[6] Wei, A., Soluro, C., Tingle, C. and Salkoff, L. (1994) *Neuron* 13, 671-681.
[7] Wallner, M., Meera, P. and Toro, L. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14922-14927.
[8] Meera, P., Wallner, M., Song, M. and Toro, L. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 14066-14071.
[9] Diaz, L., Meera, P., Amigo, J., Stefani, E., Alvarez, O., Toro, L. and Latorre, R. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 32430-32436.
[10] Garcia, M.L., Hanner, M., Knäus, H.G., Slaughter, R. and Kaczorowski, G.J. (1999) *Methods Enzymol.* 294, 624-639.
[11] Dworetzky, S.L., Boissard, C.G., Lum-Ragan, J.T., McKay, M.C., Post-Munson, D.J., Trojancki, J.T., Chang, C.P. and Gribkoff, V.K. (1996) *J. Neurosci.* 16, 4543-4550.
[12] McManus, O.B., Helms, L.M., Pallanck, L., Ganetzky, B., Swanson, R. and Leonard, R.J. (1995) *Neuron* 14, 645-650.
[13] Meera, P., Wallner, M., Jiang, Z. and Toro, L. (1996) *FEBS Lett.* 382, 84-88.
[14] Meera, P., Wallner, M. and Toro, L. (2001) *Molecular biology of Ca²⁺-activated K⁺ channels*, in: *Potassium Channels in Cardiovascular Biology* (Archer, S.L. and Rusch, N.J., Eds.), pp. 49-70. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
[15] Brenner, R., Jegla, T.J., Wickenden, A., Liu, Y. and Aldrich, R.W. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 6453-6461.
[16] Possani, L.D., Becerril, B., Delapierre, M. and Tytgat, J. (1999) *Eur. J. Biochem.* 264, 287-300.
[17] Miller, C. (1995) *Neuron* 15, 5-10.
[18] Tytgat, J., Chand, K.G., Garcia, M.L., Gutman, G.A., Martin-Eauclaire, M.F., van der Walt, J.J. and Possani, L.D. (1999) *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 444-447.
[19] Ménez, A., Bontems, F., Roumestand, C., Gilquin, B. and Toma, F. (1992) *Proc. R. Soc. Edinburgh* 99B, 83-103.
[20] Zamudio, F.Z., Conde, R., Arevalo, C., Becerril, B., Martín, B.M., Valdivia, H.H. and Possani, L.D. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 11886-11894.
[21] Conde, R., Zamudio, F.Z., Becerril, B. and Possani, L.D. (1999) *FEBS Lett.* 460, 447-450.
[22] Zhou, W., Merrick, B.A., Khaledi, M.G. and Tomer, K.B. (2000) *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11, 273-282.
[23] Guex, N., Diemund, A. and Peitsch, M.C. (1999) *Trends Biochem. Sci.* 24, 364-367.
[24] Schoonmakers, T.J., Visser, G.J., Filk, G. and Theuvsnet, A.P. (1992) *Biotechniques* 12, 870-879.
[25] Giangiacomo, K.M., Gabriel, J., Fremont, V. and Mullmann, T.J. (1999) *Perspect. Drug Discov. Des.* 15(16), 167-186.
[26] Park, C.S. and Miller, C. (1992) *Biochemistry* 31, 7749-7755.
[27] Stampe, P., Kolmakova-Parfeny, L. and Miller, C. (1994) *Biochemistry* 33, 443-450.
[28] Mullmann, T.J., Munujos, P., Garcia, M.L. and Giangiacomo, K.M. (1999) *Biochemistry* 38, 2395-2402.
[29] Cui, M., Shen, J., Briggs, J.M., Luo, X., Tan, X., Jiang, H., Chen, K. and Ji, R. (2001) *Biophys. J.* 80, 1659-1669.
[30] Jiang, Z., Wallner, M., Meera, P. and Toro, L. (1999) *Genomics* 55, 57-67.
[31] Johnson, B.A. and Sugg, E.E. (1992) *Biochemistry* 31, 8151-8159.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA 79

Mapping the receptor site for ergotoxin, a specific blocker of ERG channels

Liliana Pardo-López^a, Jesús García-Valdés^a, Georgina B. Gurrola^a, Gail A. Robertson^b,
 Lourival D. Possani^{a,*}

^aDepartment of Molecular Recognition and Structural Biology, Institute of Biotechnology, National Autonomous University of Mexico, Avenida Universidad 2001, P.O. Box 510-3, Cuernavaca 62210, Mexico

^bDepartment of Physiology, Wisconsin University, Madison Medical School, Madison, WI 53706, USA

Received 7 November 2001; accepted 19 November 2001

First published online 30 November 2001

Edited by Maurice Montal

Abstract We show here that ergotoxin (ErgTx) is a bona fide, specific blocker of the human ether-a-go-go-related gene (HERG) channels. It does not affect the function of either M-eag or M-erk channels. A chimeric construction containing a segment of the P-region of M-eag channel inserted into the HERG channel drastically diminished or completely abolished the inhibitory effect of ErgTx, whereas chimeras of the P-region of HERG channel into M-eag channels recovered the inhibitory effect. From the P-region point mutants of HERG channel assays, only the mutant N598Q shows about 25% decrement of the ErgTx inhibitory effect. ErgTx recognizes the P-region of HERG channel, blocking the channel function with a K_d in the order of 12 nM. © 2002 Published by Elsevier Science B.V. on behalf of the Federation of European Biochemical Societies.

Key words: Human ether-a-go-go-related gene channel; K⁺ channel; Ergotoxin; M-erk channel; M-eag channel; Scorpion toxin

1. Introduction

The human ether-a-go-go-related gene (HERG) is a member of the Eag super family of genes encoding potassium channels with six transmembrane domains, an S4 region and a highly conserved P-region [1]. Mutations in HERG give rise to inherited, type 2 long QT syndrome [2], caused by a loss of the cardiac repolarizing current I_{Kr} [3,4]. Currents arising from expression of HERG or ERG, as the homologs in other species are known, also play a role in spike-frequency adaptation in neurons [5] and in human pancreatic β-cells [6].

ERG channels are the target of a group of potent drugs including anti-arrhythmics, anti-histamines and antibiotics [7,8] that block K⁺ currents causing acquired long QT syndrome as a side effect. The discovery of naturally occurring substances that can specifically and reversibly block or recognize these types of channels is fundamental for the search and development of new putative drugs to treat some of the diseases and malfunctions associated with HERG channels. For the voltage-dependent K⁺ channels the use of scorpion toxins [9–11] has been extremely useful to determine the geometry of the outer vestibule of the pore of the channel, to conduct studies of double mutants (channel and toxin coding genes)

for correlation of the structure with the function of the ligand receptor complexes [12–18]. Two main kinds of naturally occurring peptides from scorpions and spiders have been isolated and characterized: (i) the blocker toxin type, that interacts with the outer vestibule of the pore inhibiting the channels by physically occluding the K⁺ conduction [19], in a 1:1 stoichiometric relationship, and (ii) the gating modifier, that interacts with the S3–S4 segments of the channel in a 1:4 stoichiometry relationship and modifies the closing and opening kinetics of the channel [20,21].

We have recently found ergotoxin (ErgTx) [22,23], the first scorpion peptide capable of blocking specifically ERG channels. In this communication we describe the interaction of ErgTx with three chimeras of HERG and M-eag channels and six different point mutants involving the P-region of the HERG channel.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of chimeras and point mutants

The nomenclature for chimeras adopted in this communication was selected by using the first letter of each channel (either *H*, standing for HERG; or *M*, standing for M-eag; note the italics, which distinguish the letters from amino acid residues). Thus, *HMM* means a chimera where the upstream sequence of the gene encoding HERG channel was used, followed by a segment of the M-eag gene (here only sequences that encode the pore region of the channel) and the extending sequence to the end of the C-terminal region of the channel was again from HERG channels. Conversely, *MMM* means a construction of a chimeric gene where the N-terminal is from M-eag, the pore segment contains HERG gene sequence and the C-terminal is again from M-eag.

The cDNA for chimera *HMM* was constructed from two PCR reactions. The first amplified the pore of M-eag: a 5' end tag of HERG clone was introduced and a *Bgl*II site of M-eag 3' end was eliminated. The second PCR amplified the first product, using HERG channel as template; a *Bst*EII site of HERG clone was introduced. The PCR product (M-eag pore with 5' end of HERG) and the HERG clone into pCDNA3 were digested with *Bst*EII and *Bgl*II (a *Bgl*II site of pCDNA3 was eliminated). The final PCR product was then subcloned into the corresponding site of the HERG gene.

The encoded channel was composed of HERG sequences from the amino-terminus to residue C566, at which point it crossed over to M-eag residue L396. At M-eag residue K577, the sequence again crossed back to HERG at residue K638.

Chimeras *MMH* and *MMH* were constructed using an in vitro recombination technique as previously described by Herzberg et al. [24]. The first crossover point in the *MMH* construct occurs between M-eag residue V449 and HERG residue V611. The second crossover point occurs after HERG residue L650 to M-eag residue L498. For *MMH*, the crossover occurs between M-eag residue 382 and HERG residue M619.

*Corresponding author. Fax: (52)-73-72388.

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

The point mutations of HERG gene were prepared by direct mutagenesis by two step PCR reactions in which appropriate primers were used. The correct presence of mutants was verified by sequencing the products in an automatic Applied Biosystems machine.

2.2. Toxin purification

ErgTx was purified by chromatographic procedures as earlier described [23].

2.3. Channel expression in oocytes

Complementary RNAs for injection into oocytes were synthesized from the T7 promoter of linearized DNA templates at the *PvuII* site using the Mmessage Mmachine kit (Ambion, Austin, TX, USA). The oocytes were prepared following the technique described earlier [24]. In brief, female *Xenopus laevis* frogs (Nasco) were anesthetized by 15 min exposure to 0.15% of 3-aminobenzoic acid ethyl ester (Sigma). The oocytes were surgically removed from the ovary, after which the frog was closed by suturing and placed in water to allow recovery from the anesthesia. Defolliculation was performed by incubation for 1 h in 1.5 mg/ml collagenase (Sigma Type II) in Ca^{2+} -free OR2 oocyte medium with gentle agitation. Oocytes were stored in ND96 solution (in mM): 96 NaCl, 2 KCl, 1 MgCl_2 , 1.8 CaCl_2 , 5 HEPES buffer adjusted to pH 7.4 with NaOH and supplemented with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicin at 18°C. Oocytes were injected with 50 nl of cRNA (0.3 ng/ml) by using a microdispenser and a micropipette. Injected oocytes were incubated at 18°C for 24–48 h in ND96 medium, before analysis.

2.4. Electrophysiological recordings

Channels were expressed to a level where 0.5–5.0 μA of current was recorded during a depolarizing step from a holding potential of -80 mV to potentials between -80 and $+60$ mV, and repolarizing at -100 mV. Currents were recorded using the two-electrode voltage clamp method (CA-1B high performance oocyte clamp DAGAN). Electrodes were filled with 3 M KCl, had a resistance of 0.3–1.0 M Ω . The bath solution contained (mM) 95 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl_2 , 0.3 CaCl_2 , 5 HEPES buffer adjusted to pH 7.4 with NaOH. Control records were taken prior to the addition of toxin. On the addition of toxin the perfusion medium was stopped to allow homogeneous dispersion of the toxin. In most experiments toxin was removed from the bath to demonstrate recovery.

3. Results and discussion

3.1. Specificity of ErgTx effect in oocyte expressed channels

ErgTx effects were originally reported on ERG-like currents in native neural and cardiac tissues and tissue-derived cell lines shown to express the gene encoding ERG [22]. In the present study we assessed the specificity of the ErgTx interaction by comparing its relative effects on heterologously expressed α -subunits of HERG, M-eag and M-elk channels in *Xenopus* oocytes. The aim of this study was to determine whether ErgTx was specific for ERG and to identify the region of toxin binding on the channel. Fig. 1 shows the recordings of toxin effect (left panel control, right panel after toxin application) on M-eag channels (Fig. 1A), M-elk channels (Fig. 1B) and HERG channels (Fig. 1C). The current was decreased only for the HERG channels. Fig. 1D shows the current versus voltage profile of the inhibitory effect of ErgTx in HERG channels. Inhibition was almost fully reversible as shown in the figure by the circles. A dose-response curve for the effect of ErgTx (Fig. 1E) shows a K_d value of 11.4 nM. This ErgTx sensitivity is similar to that observed for ERG-like currents in native cells and cell lines (16 nM; see [22]). The M-eag and M-elk channels (Fig. 1A,B, respectively) were not inhibited, even after application of a toxin concentration in the range of 200 nM. These experiments were repeated several times ($n=6$) with identical results. Our findings provide additional confirmation that the previously recorded native currents [22] arise from channels composed primarily of the ERG α -subunit. The high sensitivity of HERG for the ErgTx also suggested that the heterologous expression system, together with manipulation of the HERG channel structure using recombinant DNA techniques, would provide a useful means by which to identify the binding domain of ErgTx on the HERG channel.

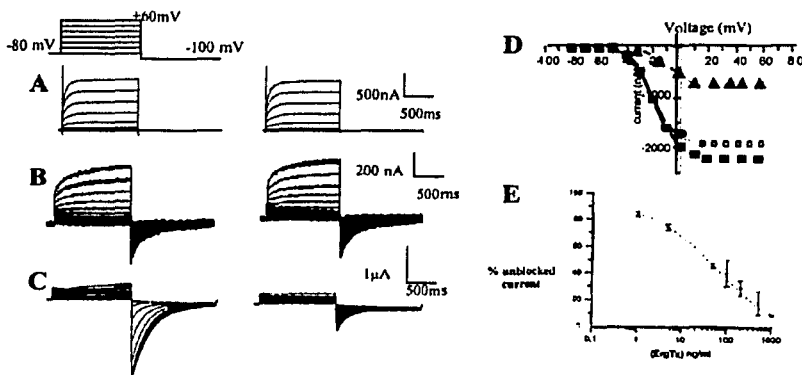


Fig. 1. Effect of ErgTx on three different K^+ channels. K^+ currents were measured in oocytes expressing: (A) M-eag, (B) M-elk and (C) HERG channels. Left panels are control recordings, right panels are in the presence of 100 nM ErgTx, from a holding potential of -80 mV to $+60$ mV by increments of 10 mV each, whereas the tail currents were elicited by repolarization to -100 mV. Panel D represents a current versus voltage trace of the inhibitory effect of ErgTx on HERG channels, in which the squares are control traces, triangles are in the presence of toxin and circles are the recovery of currents after washing the toxin. Panel E is a dose response curve for ErgTx on HERG channels. The calculated IC_{50} was 50 ng/ml ($n=3$), using $(1 + [\text{ErgTx}/\text{IC}_{50}]^2)^{-1}$. $P < 0.05$.

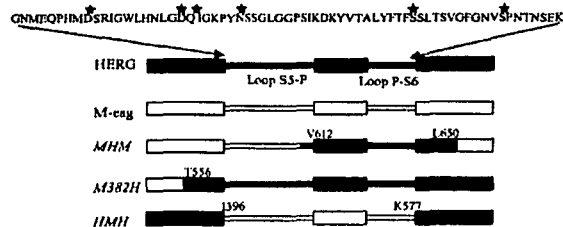


Fig. 2. Scheme showing the chimeric constructions and point mutants of HERG channels. Upper line shows the amino acid sequence of HERG channel from residue G572 to K638. The stars on top of amino acids indicate point mutations: D580A, D591A, I593R, N593Q, S620I and S631Y. The subsequent lines show: (i) a schematic representation of HERG channel sequence from the S5 to S6 transmembrane regions (shaded boxes), where the arrows show the position of the amino acids from G572 to K638; (ii) the equivalent scheme for the M-eag channel (empty boxes); (iii) the chimeric M-eag HERG M-eag channel, where the sequence from V612 to L650 is from HERG; (iv) the *M382H* chimeric construction in which the N-terminal is from M-eag up to T536 and the remaining sequence is from HERG and (v) the last chimeric is HERG sequence up to C566 and after K638, whereas the internal segment is from M-eag 1396–K577.

3.2. Mapping the receptor site for ErgTx binding

We took advantage of the homology between HERG and M-eag to make chimeras and determine what regions of HERG uniquely specify ErgTx sensitivity (Fig. 2). Because previous studies have shown that other scorpion toxins bind to the pore region of voltage-gated K^+ channels of the Kv family, we tested the hypothesis that the pore-forming region serves as the ErgTx binding site in HERG. According to this hypothesis, chimeric M-eag channels with an HERG pore should be inhibited by ErgTx. If the binding were in a different region of HERG, such as the S3–S4 loop serving as the spider hanatoxin receptor in K^+ channels [20,21], sensitivity would be determined by the parent channel in regions outside the pore. Fig. 2 shows the chimeras schematically, with M-eag sequences in unfilled boxes and HERG sequences in filled boxes. We also tested six constructs with point mutations in the corresponding region, as indicated with asterisks.

As a model, we will refer to sub-domains of the bacterial channel KcsA pore, which have been structurally determined

[25]. Within the selectivity filter and preceding pore helix, there is a high degree of sequence similarity between KcsA, HERG and M-eag. In the upstream turret area, the sequence diverges among all three channels.

As a first test of the sensitivity of the pore region to toxin binding, we replaced the pore in HERG with the corresponding sequences of M-eag (*HMH*; Fig. 3). The *HMH* chimera is not sensitive to ErgTx. The currents were not modified in the presence of toxin. However, as it can be observed in Fig. 3C, the substitution of the pore region (M-eag into HERG) abolishes the rectification property of the channel. Fig. 3C does not show the effect of the toxin, but rather compares the behavior of the native M-eag (circles) with that of the chimera (triangles). This observation suggests that the amino acid sequence of the S5–P loop segment of HERG channel, although similar to that of M-eag in size, contains information or spatial folding that makes it different. ErgTx senses the difference between them.

To confirm that pore sequences of HERG were important

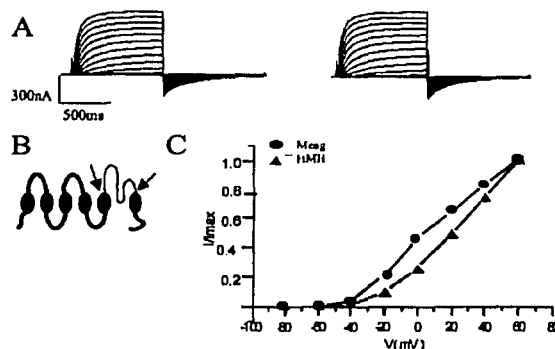


Fig. 3. Effect of ErgTx on *HMH* chimera. A: Left shows outward currents, under voltage clamp conditions for control recordings (similar to M-eag channel alone), and right is in the presence of 200 nM ErgTx. B: The scheme of the chimera (N-terminal and C-terminal of HERG in bold, middle section is from M-eag channels). C: Current versus voltage relationship of the outward currents of A computed with M-eag channels (circles), for $n=5$.

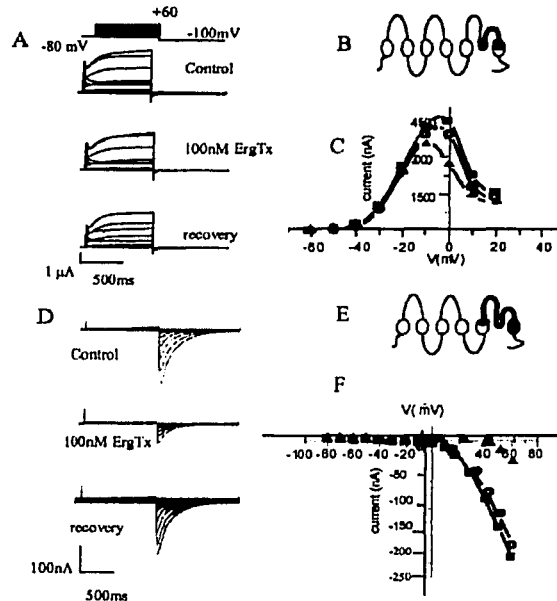


Fig. 4. Effect of ErgTx on *MIIM* and *M382H* chimeras. A–C are from *MIIM*, whose caricature is depicted in B (N-terminal of HERG and C-terminal from M-eag in bold), whereas D–F are from the *M382H* chimera, scheme shown in E. Panel A shows the outward currents elicited according to the protocol of Fig. 1, for control (upper recordings), after application of 100 nM ErgTx (middle) and after washing (lower panel). Panel C shows the current versus voltage curve of the results in A, where the squares represent the control, triangles the toxin effect and the open circles the washing condition ($n=3$, $P<0.005$). D: The same situation as A, for the *M382H*, and F is the corresponding current versus voltage curve, where the squares represent the recording of the control, triangles the toxin effect and the open circles the recovery ($n=4$, $P<0.02$).

in toxin binding, we studied the chimera *MIIM*, an M-eag channel in which the P-region beginning between the turret and the pore helix, and extending half-way through S6, has been replaced with corresponding HERG1 sequences (see Section 2 and [24]). Despite possessing much of the HERG pore, *MIIM* exhibited a drastically reduced sensitivity to ErgTx (Fig. 4A C). Currents were reduced by only 15%, even at high toxin concentrations (100 nM). This chimera exhibits the rapid activation characteristic of M-eag and the rapid inactivation characteristic of HERG, resulting in a partially inactivating, large outward current intermediate between the two parental phenotypes (see also [24]). The intact inactivation indicates that the external mouth of the pore retains its normal function and suggests that the relative lack of toxin binding is not due to a general disruption of structure in that region.

Because *MIIM* does not contain the entire HERG pore sequence, including the 'turret', we tested the sensitivity of the chimera *M382H*, which contains a pore composed entirely of HERG sequence. As shown in Fig. 4, *M382H* is clearly inhibited by ErgTx (Fig. 4D F). This chimera exhibits the pronounced inward rectification characteristic of the wild-type HERG channel. The block is about 80%, using 100

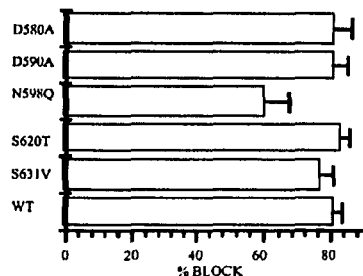


Fig. 5. Percent of blockage for the site-directed mutants. This graphic shows the percent of blockage due to the application of 100 nM ErgTx for the point mutants, shown on the left: D580A, D591A, N598Q, S620T, S631V and wild-type (WT). Error bars indicate mean (\pm S.E.M., $n=3$).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

nM ErgTx, and it is reversible by washing. These observations strongly support a role for the HERG pore region in ErgTx block, especially in the highly divergent turret region that distinguishes HERG from M-eag, M-erk and other K⁺ channels. Moreover, they exclude a primary role for residues in the HERG S3-S4 region in toxin binding.

Finally, we tested six point mutations in this region in an attempt to identify particular amino acids that specify the binding preference of ErgTx for HERG channel (see Fig. 5). Among the mutants tested, only N598Q showed a small reduction in inhibition by the toxin, exhibiting 60% compared with 80% inhibition of wild-type channels. However, this 25% reduction of inhibition should be taken only as an indication for the need of additional point mutation studies in this segment of the channel. I593R did not express. Surprisingly, mutations that disrupt C-type inactivation (and presumably the conformation of the outer pore region), S620T and S631V, had little effect on toxin inhibition of the current. Considering that agitoxin and charybdotoxin binding are disrupted by *Shaker* mutations equivalent to S631V, our findings suggest that their mechanisms of binding are likely to differ from that of ErgTx in HERG. Perhaps this should not be surprising, as the amino acid sequence of ErgTx is quite different from the other known Kv specific toxins (42 amino acids with four disulfide bridges; see [23]). More surprising may be the insensitivity of ERG channels to other K⁺ channel toxins from scorpions, despite homology in the binding regions. One can speculate that structural differences, most notably the long sequence predicted to give rise to an unusually large turret (see review by Tseng [26]), present steric hindrance to an otherwise conserved binding site.

In conclusion, our results support the idea that ErgTx is specific for HERG channel and does not recognize other, closely related channels. It is a legitimate blocker of HERG, able to recognize the amino acid sequence between the S5-P loop region. The specific binding sites are either different from the location where other scorpion toxins bind to the Kv channels, or the structure of the S5-P loop region of HERG channel is different from that of the voltage-dependent K⁺ channels. More mutagenesis studies will be required to pinpoint the residues specifying ErgTx block.


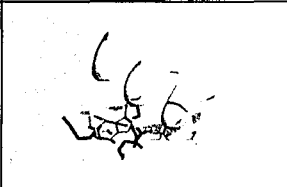

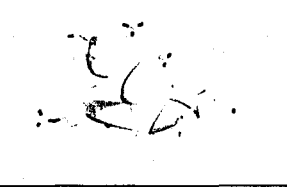


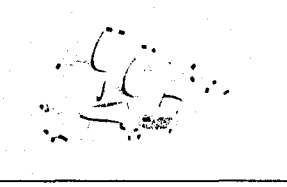
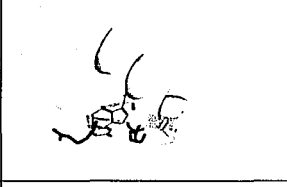
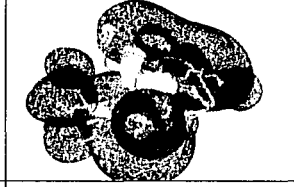

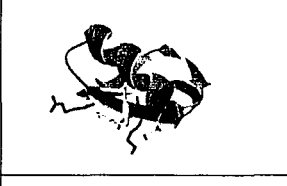
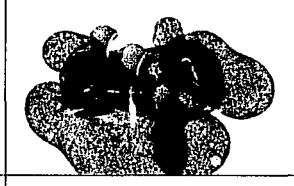




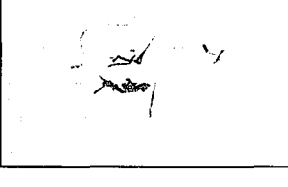

Acknowledgements: This work was partially supported by Grants from: Howard Hughes Medical Institute 55000574, DGAPA-National Autonomous University of Mexico, IN216900 and 31691-N from

CONACyT-Mexican Government to L.D.P. and NIH Grant HL55973 (G.A.R.). L.P.L. received a scholarship from CONACyT and DGAPA for her Ph.D. studies.

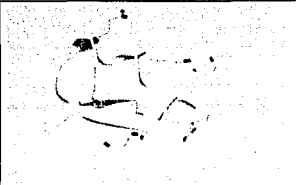
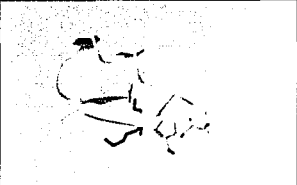

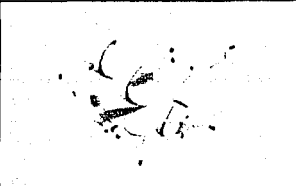

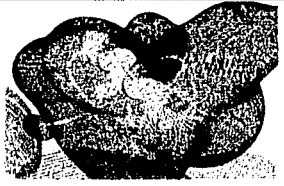


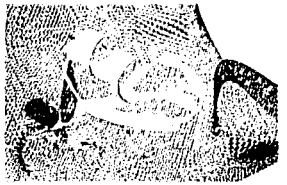
References

- [1] Warmke, J.W. and Ganetzky, B. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3438–3442.
- [2] Curran, M.E., Splawski, J., Timothy, K.W., Vincent, G.M., Green, E.D. and Keating, M.T. (1995) *Cell* 80, 795–803.
- [3] Sanguinetti, M.C., Jiang, C., Curran, M.E. and Keating, M.T. (1995) *Cell* 81, 299–307.
- [4] Trudeau, M.C., Wanke, J.W., Ganetzky, B. and Robertson, G.A. (1995) *Science* 269, 92–95.
- [5] Chiesa, N., Rosati, B., Arcangeli, A., Olivetto, M. and Wanke, E. (1997) *J. Physiol.* 501, 313–318.
- [6] Rosati, B., Marchetti, P., Crociani, O., Lecchi, M., Lupi, R., Arcangeli, A., Olivetto, M. and Wanke, E. (2000) *FASEB J.* 14, 2611–2619.
- [7] Roden, D.M. (1998) *Am. J. Cardiol.* 82, 491–571.
- [8] Mitcheson, J.S., Chen, J., Lin, M., Culbertson, C. and Sanguinetti, M.C. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 12329–12333.
- [9] Carbone, E., Wanke, E., Prestipito, G., Possani, L.D. and MacLücke, A. (1982) *Nature* 296, 90–91.
- [10] MacKinnon, R. and Miller, C. (1988) *J. Gen. Physiol.* 91, 335–349.
- [11] Miller, C. (1995) *Neuron* 15, 5–10.
- [12] MacKinnon, R. and Miller, C. (1989) *Science* 245, 1382–1385.
- [13] Goldstein, S.A. and Miller, C. (1993) *Biophys. J.* 65, 1613–1619.
- [14] Stocker, M. and Miller, C. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9509–9513.
- [15] Hidalgo, P. and MacKinnon, R. (1995) *Science* 266, 307–310.
- [16] Krezel, A.M., Kasibhatla, C., Hidalgo, P., MacKinnon, R. and Wagner, G. (1995) *Protein Sci.* 4, 1478–1489.
- [17] Naranjo, D. and Miller, C. (1996) *Neuron* 16, 123–130.
- [18] Gross, A. (1996) *Neuron* 16, 399–406.
- [19] Miller, C., Moczydlowski, E., Latorre, R. and Phillips, M. (1985) *Nature* 313, 316–318.
- [20] Swartz, K.J. and MacKinnon, R. (1997) *Neuron* 18, 665–673.
- [21] Swartz, K.J. and MacKinnon, R. (1997) *Neuron* 18, 675–682.
- [22] Gurrola, G.B., Rosati, B., Rocchetti, M., Pimienta, G., Zaza, A., Arcangeli, A., Olivetto, M., Possani, L.D. and Wanke, E. (1999) *FASEB J.* 13, 953–962.
- [23] Scaloni, A., Bottiglieri, C., Ferraro, L., Corona, M., Gurrola, G.B., Batista, C., Wanke, E. and Possani, L.D. (2000) *FEBS Lett.* 479, 156–157.
- [24] Herzberg, I.M., Trudeau, M.C. and Robertson, G.A. (1998) *J. Physiol.* 511, 3–14.
- [25] Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T. and MacKinnon, R. (1998) *Science* 280, 69–77.
- [26] Tseng, G.N. (2001) *J. Mol. Cell Cardiol.* 33, 835–849.

Anexo 2. Toxinas bloqueadoras del MaxiK

Toxina	aa cargados	aa críticos	P. electrostático
ChTx			
Lq2			
IbTx *			
LbTX *			
SloTx *			
KTx			

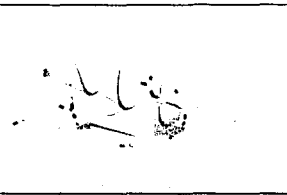
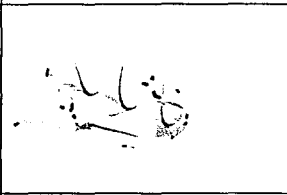
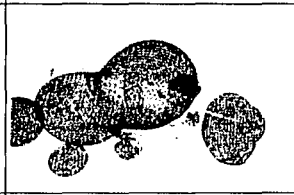
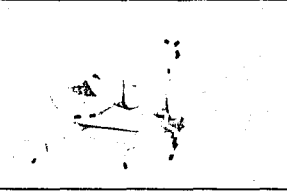
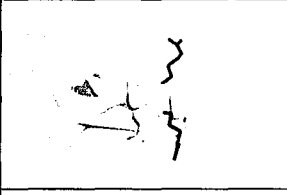

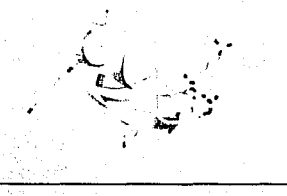
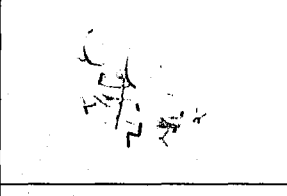
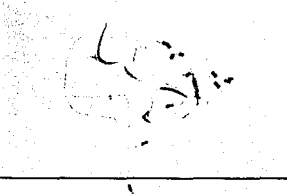
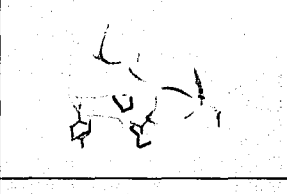
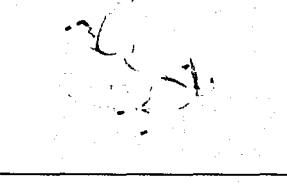
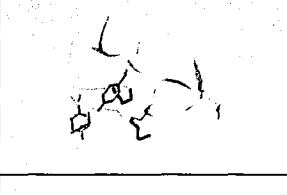
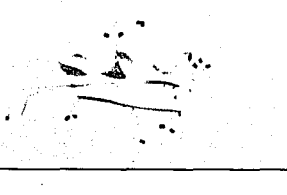
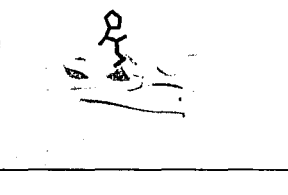
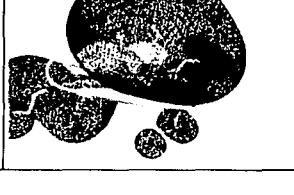
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

NTx			
BmTx1			
BmTx2			

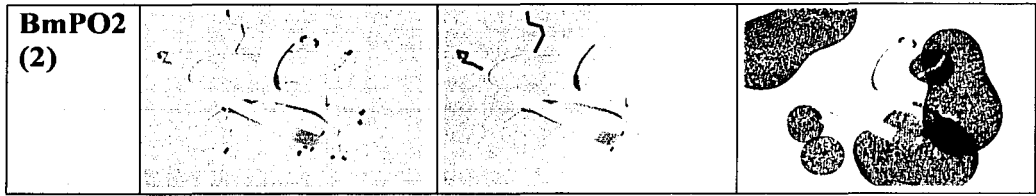
Estructuras tridimensionales de toxinas de alacrán que presentan actividad sobre el MaxiK. Para cada una de las toxinas se presenta en la primera columna la abreviatura; en la segunda, la estructura mostrando los residuos cargados; en la tercera, la estructura mostrando los residuos en las 8 posiciones críticas para el bloqueo (ChTx-MaxiK); y en la última el potencial electrostático. Las estructuras se obtuvieron del Banco de datos de Proteínas (PDB) o mediante modelaje por homología, las últimas marcadas con asterisco (*). En todas las estructuras el potencial electrostático se calculó usando la ecuación de Poisson-Boltzman en condiciones de fuerza iónica nula. Las nubes energéticas presentan energía isopotencial de 2kT. Las toxinas se orientaron hacia la posición más probable en que las toxinas α KTx1 se unen a los canales dependientes del voltaje.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Anexo 3 Toxinas bloqueadoras de los canales SK

Toxina	aa cargados	aa críticos	P. electrostático
LeiTx (1)			
P05 (1)			
Tsk (1)**			
Pi1 (1)*,**			
MTx (1)**			
PO1 (2)			




RECIBO CON
VALOR DE \$ 100.000.000



Estructuras tridimensionales de toxinas de alacrán que presentan actividad hacia canales SK. Para cada una de las toxinas se presenta en la primera columna la abreviatura; en la segunda, la estructura mostrando los residuos cargados; en la tercera, la estructura mostrando los residuos en posiciones críticas para el bloqueo de: (1) ChTx-MaxiK o (2) P01-SK; y en la última, el potencial electrostático. Las estructuras se obtuvieron del Banco de datos de Proteínas (PDB) o mediante modelaje por homología (marcadas con asterisco rojo, *). Las estructuras tridimensionales que no contienen la información requerida para el cálculo del potencial electrostático se señalan con doble asterisco azul (**). En las estructuras donde fue posible, el potencial electrostático se calculó usando la ecuación de Poisson-Boltzman en condiciones de fuerza iónica nula. Las nubes energéticas presentan energía isopotencial de 2kT. Las toxinas se orientaron hacia la posición más probable en que las toxinas α KTx1 se unen a los canales dependientes del voltaje.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

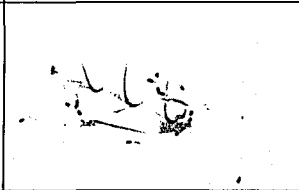
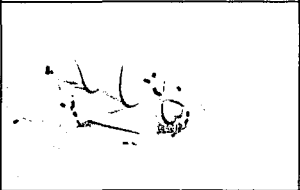
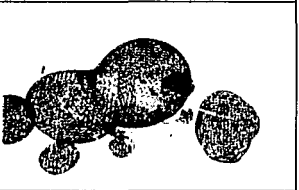

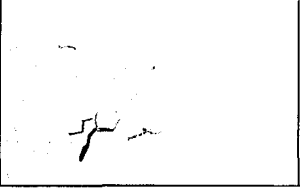
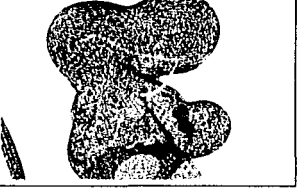
Anexo 4 Toxina bloqueadora de canal Erg

Toxina	aa cargados	aa críticos	P. electrostático
BeKm-1 *			

Estructura tridimensional de la BeKm-1 que bloquea al canal *herg*. Se presenta en la primera columna, la abreviatura; en la segunda, la estructura mostrando los residuos cargados; en la tercera, la estructura mostrando los residuos en las 8 posiciones críticas para el bloqueo (ChTx-MaxiK); y en la última el potencial electrostático. La estructura se obtuvo mediante modelaje por homología (por lo tanto se marca con asterisco rojo, *). El potencial electrostático se calculó usando la ecuación de Poisson-Boltzman en condiciones de fuerza iónica nula. Las nubes energéticas presentan energía isopotencial de 2kT. La toxina se orientó hacia la posición más probable en que las toxinas α KTx1 se unen a los canales voltaje dependientes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN


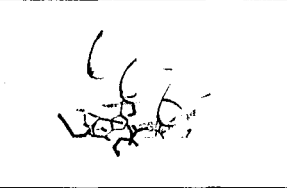
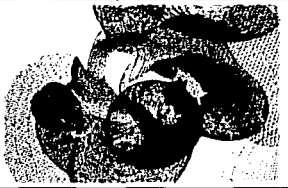
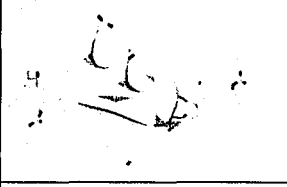

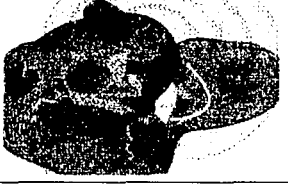
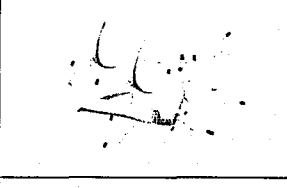
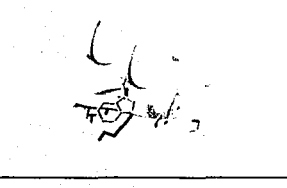
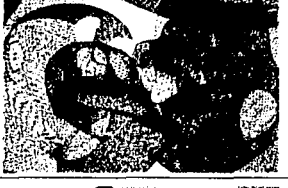
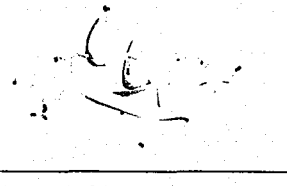
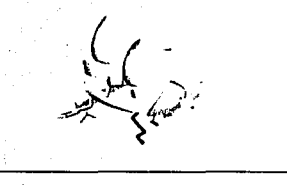

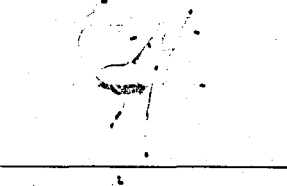
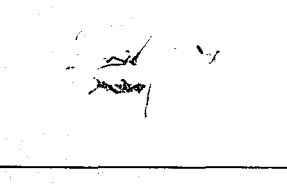

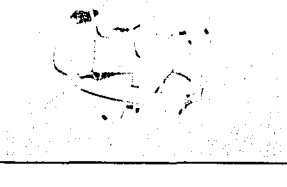
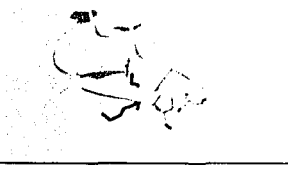

Anexo 5. Toxinas bloqueadoras de canales rectificadores entrantes

Toxina	aa cargados	aa críticos	P. electrostático
LeiTx (1)			
Tpn (2)*			


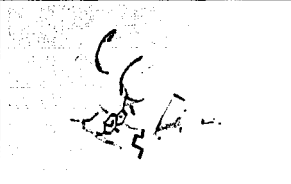
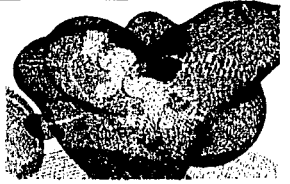

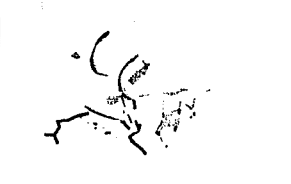
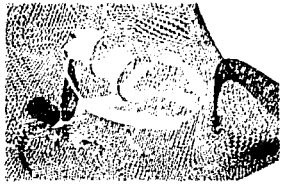
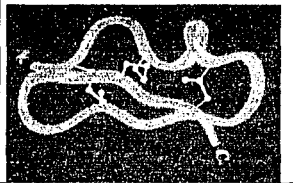
Estructuras tridimensionales de toxinas peptídicas que bloquean canales rectificadores entrantes. Para cada una de las toxinas se presenta en la primera columna, la abreviatura; en la segunda, la estructura mostrando los residuos cargados; en la tercera, la estructura mostrando los residuos en posiciones críticas para el bloqueo de: (1) ChTx-MaxiK o (2) Tpn-ROMK1; y en la última, el potencial electrostático. Las estructuras se obtuvieron del Banco de datos de Proteínas (PDB). La tertiapina, marcada con asterisco (*), es un péptido aislado del veneno de abeja. El potencial electrostático se calculó usando la ecuación de Poisson-Boltzman en condiciones de fuerza iónica nula. Las nubes energéticas presentan energía isopotencial de $2kT$. Las toxinas se orientaron hacia la posición más probable en que se unen a los canales voltaje dependientes o ROMK1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Anexo 6. Toxinas bloqueadoras de canales Kv1.x

Toxina	aa cargados	aa críticos	P. electrostático
ChTx			
AgTx2			
HgTx			
BmKTx			
KTx			
NTx			






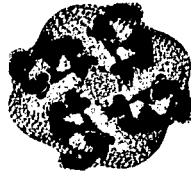









TESIS CON
FOLIA DE ORIGEN

BmTx1			
BmTx2			
Tc1 (*)			


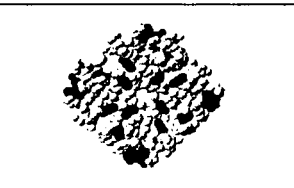

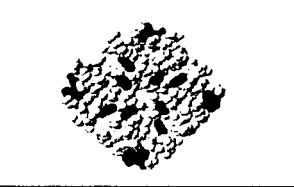

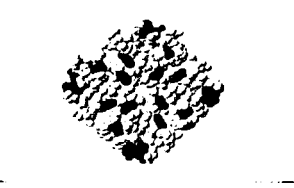

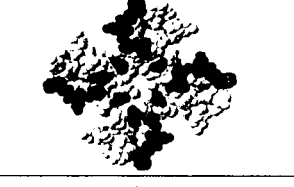

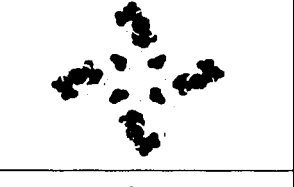
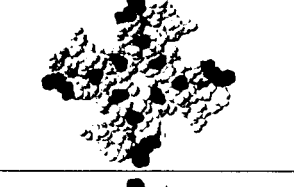
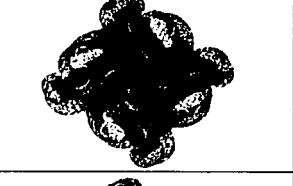
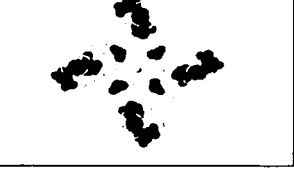
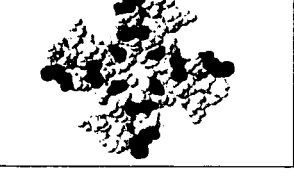
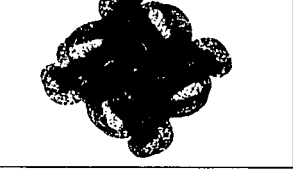
Estructuras tridimensionales de toxinas de alacrán que presentan actividad inhibitoria de canales dependientes de voltaje. Para cada una de las toxinas se presenta en la primera columna, la abreviatura; en la segunda, la estructura mostrando los residuos cargados; en la tercera, la estructura mostrando los residuos en las 8 posiciones críticas para el bloqueo (ChTx-MaxiK); y en la última el potencial electrostático. Las estructuras se obtuvieron del Banco de datos de Proteínas (PDB) o directamente del artículo fuente (*). El potencial electrostático se calculó usando la ecuación de Poisson-Boltzman en condiciones de fuerza iónica nula y energía isopotencial de 2kT. Las toxinas se orientaron hacia la posición más probable en que las toxinas α KTx1 se unen a estos canales.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Anexo 7 Estructuras tridimensionales de canales de potasio

Canal	aa cargados	aa del poro	P. electrostático
<i>KcsA</i>			
<i>KcsA-3M</i> *			
<i>IRK2.1</i> *			
<i>ROMK1</i> *			
<i>Shaker</i> *			

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

<i>hslo</i> *			
<i>dslo</i> *			
<i>dslo-1M</i> *			
SK1 *			
SK2 *			
SK3 *			

Todas las estructuras se obtuvieron mediante modelaje por homología con la estructura del canal *KcsA* (1BL8). En cada uno de los canales se mutaron, en el asa del poro, los aminoácidos diferentes, pero se conservó la secuencia íntegra de los segmentos transmembranales S1 y S2 de la estructura cristalina original. Se consideró que, en esencia, esta región no se modifica por

posibles deleciones o adiciones de hasta tres residuos. Se presenta la estructura tridimensional mostrando únicamente residuos cargados (columna 2), la totalidad de residuos (columna 2) y el potencial electrostático (columna 3). El potencial electrostático se calculó usando la ecuación de Poisson-Boltzman en condiciones de fuerza iónica nula y energía isopotencial de $2kT$. Para los canales *hslo dslo* y *dslo1M* no fue posible calcular el potencial electrostático por limitación del programa SPDV viewer. Todas las estructuras obtenidas en este trabajo se marcan con asterisco rojo, * .