

11281

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Centro de Ciencias Genómicas
Instituto de Biotecnología

Análisis proteómico y genómico de los componentes del veneno de alacrán *Tityus costatus* Karsch: Caracterización de péptidos y genes que codifican toxinas y componentes antimicrobianos.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
DOCTORA EN CIENCIAS
PRESENTA
M. en C. ELIA DIEGO GARCIA

Tutor: Dr. Lourival D. Possani Postay

Cuernavaca, Morelos.

2005

m.346209



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.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

LA PARTE EXPERIMENTAL DE ESTA TESIS DOCTORAL SE REALIZÓ BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. LOURIVAL DOMINGOS POSSANI POSTAY EN EL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

Este proyecto fue financiado en parte por los donativos otorgados al laboratorio del Dr. Lourival Possani: CONACYT (40251-Q), DGAPA-UNAM (IN206003) y el Instituto Bioclón S.A. de C.V.

Agradezco el apoyo económico para estudios posgrado otorgado por el CONACYT (registro 113970), la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP-UNAM) y el Sistema Nacional de Investigadores, en calidad de ayudante de Investigador Nacional, nivel III.

ÍNDICE

Contenido	Página
Resumen	ii
Abstract	iii
PARTE 1. Proteómica y Genómica de <i>Tityus costatus</i> Karsch	1
I. Introducción	2
1.1 Alacranes y alacranismo	2
1.2 Componentes del veneno de alacrán	3
Toxinas de alacrán	4
Toxinas para canales de sodio	4
Toxinas para canales de potasio	7
Péptidos antimicrobianos y defensinas	9
1.3 Genómica y proteómica en el género <i>Tityus</i>	11
Los genes y la genómica de <i>Tityus</i>	11
El estudio de los péptidos y la proteómica de venenos	12
II. Justificación y objetivos	15
III. Materiales y Métodos	16
3.1 Análisis proteómico	16
3.2 Ensayos biológicos	16
Toxicidad en mamíferos	16
Toxicidad en insectos	16
Actividad antimicrobiana	16
3.3 Ensayos electrofisiológicos	17
3.4 Análisis genómico	17
Obtención de clonas a partir de la librería de cDNA	17
IV. Resultado	18
4.1 Datos publicados	18
4.2 Comentarios adicionales y datos no publicados	19
De las toxinas de potasio	20
Caracterización del péptido KIK	20
Efecto de los componentes del veneno de <i>T. costatus</i>	22
Componentes tóxicos a ratón	22
Componentes tóxicos a insectos	22
Componentes con actividades no descritas	22
V. Discusión	24
VI. Conclusiones y perspectivas	33
PARTE 2. Organización de genes que codifican componentes tipo defensinas de alacrán	34
VII. Organización genómica de genes <i>Cll-dlp</i> y <i>Scorpine</i>	35
7.1 Introducción	35
7.2 Materiales y Métodos	35
7.3 Resultados y Discusión	37
7.3 Conclusión	45
VIII. Referencias	46

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Elia Diego Uricá

FECHA: Junio 15 de 2005

FIRMA: [Firma]

ABREVIATURAS

Ca ⁺	Ión Calcio
Cl ⁻	Ión cloro
<i>ClI-dlp</i>	péptido defensina-like de <i>Centruroides limpidus limpidus</i>
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
K ⁺	Ión Potasio
KTx	Toxina de canal de potasio
MS	Espectrometría de masas (Mass spectrometry)
Na ⁺	Ión Sodio
O.D.	Densidad óptica
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase Chain reaction)
TAIL-PCR	Thermal asymmetric interlaced polymerase chain reaction
Tco	Componente de <i>Tityus costatus</i>
TFA	Ácido trifluoroacético
u.m.a	Unidad de masa atómica
FLA ₂	Fosfolipasas A ₂
Ma	millones de años

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estructura de la toxina de canal de sodio β -toxina, Ts1 de *T. serrulatus*.
- Figura 2.** Ejemplos de estructuras en tercera dimensión de péptidos antimicrobianos de invertebrados.
- Figura 3.** Alineamiento de secuencias peptídicas de la familia VFIN.
- Figura 4.** Secuencia completa del péptido TcoKIK (posible toxina de cadena larga moduladora de canales de potasio).
- Figura 5.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos KIKtoxina deducida de la secuencia nucleotídica obtenida a partir del cDNA de *T. costatus*.
- Figura 6.** Comparación de secuencias con el péptido Tco38.32-2 y la secuencia de aminoácidos completa deducida de la clona 11 proveniente del banco de cDNA de *T. costatus*.
- Figura 7.** Alineamientos de la secuencia peptídica del componente del veneno Tco41.46-2 con la defensina *Scorpine* de *P. imperator*.
- Figura 8.** Comparación de estructura de las toxinas de potasio de *T. costatus* y el modelo bidimensional de las interacciones toxina de alacrán y canal de potasio.
- Figura 9.** Comparación de la secuencia de aminoácidos del componente Tco42.14 llamado TcoTXK β (clona 12 y 13), β -1/TsTXK β , toxinas de cadena corta bloqueadoras de canales de potasio y algunas defensinas de alacrán.
- Figura 10.** Número de componentes en los rangos de masa molecular de los proteomas reportados para los venenos de especies del género *Tityus*.
- Figura 11.** Representación de la ubicación de secuencias correspondientes a los oligonucleótidos utilizados en la amplificación de intrones y TAIL-PCR en genes de defensinas de alacranes.
- Figura 12.** Esquema representativo de las secuencias que muestran las secuencias genómicas obtenidas de las defensinas *Cll-dlp* y *Scorpine*.
- Figura 13.** Comparación de secuencias de DNA genómico de *Scorpine* (clona 30) y *Opiscorpine* 3.
- Figura 14.** Comparación de secuencias de *Scorpine* obtenidas por TAIL-PCR provenientes de DNA genómico.
- Figura 15.** Comparación de tres secuencias de *Scorpine* obtenidas por TAIL-PCR del DNA genómico de *P. imperator* con la región 5' del gene.
- Figura 16.** Organización de genes que codifican toxinas y defensinas de alacrán.

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Secuencias de aminoácidos completas reportadas de toxinas para canales de sodio para el género *Tityus*.
- Tabla 2.** Secuencias completas de toxinas para canales de potasio reportadas para el género *Tityus*.
- Tabla 3.** Información integrada de algunos componentes del veneno de *T. costatus*.
- Tabla 4.** Comparación de componentes homólogos encontrados y caracterizados en el género *Tityus*.
- Tabla 5.** Condiciones optimizadas para TAIL-PCR de DNA genómico de alacrán.
- Tabla 6.** Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en el análisis de organización de genes de *Cll-dlp* y *Scorpine* de alacrán.

PRESENTACIÓN

Esta tesis está enfocada al estudio de péptidos, genes y funciones de componentes del veneno del alacrán *Tityus costatus* Karsch, especie de alacrán nativa de Brasil con relevancia toxicológica en el área de Sao Paulo. Se conoce que las personas que sufren la picadura de esta especie de arácnido muestran graves síntomas de intoxicación, no obstante, el veneno no se ha caracterizado y se desconoce el número, variedad, identidad de péptidos relacionados a la toxicidad y posibles funciones de otros péptidos y proteínas presentes en este veneno.

La tesis se encuentra dividida en dos partes. La primera trata de estudios proteómicos, bioquímicos y fisiológicos sobre el veneno de *T. costatus*, Se incluyen datos genómicos de las secuencias obtenidas a partir de cDNA. Un artículo publicado en la revista *Toxicon* incluye estos resultados.

La segunda parte contiene un artículo publicado como co-autora, en el cual se estudia una defensina de alacrán modelo: *Centruroides limpidus limpidus* de México. Se obtuvieron resultados de la organización de este gene, así como, de una defensina del alacrán africano *Pandinus imperator*. Esta última parte no está todavía publicada.

Estos datos, tomados en su conjunto, contribuyen a la generación de conocimiento sobre secuencias genómicas obtenidas de varias especies de alacranes, lo que debe permitir a futuro realizar estudios de filogenia de toxinas y componentes tipo defensinas.

RESUMEN

Tityus costatus Karsch, 1879 (Scorpiones, *Buthidae*) es un alacrán de la región *Mata Atlántica* de Brasil. Esta región incluye el área de la ciudad de Sao Paulo, donde son registrados diversos accidentes que requieren de atención médica por la intoxicación de la picadura de alacrán. Hasta la publicación de este trabajo no existía información disponible sobre péptidos y proteínas tóxicas del veneno de *T. costatus*.

Aquí se describe que el veneno del alacrán *T. costatus* contiene péptidos tóxicos para los humanos. Reportamos la separación de 50 componentes diferentes por cromatografía líquida de alta resolución y la identificación de aproximadamente 90 componentes distintos por espectrometría de masas. Los componentes encontrados tienen masas moleculares en rangos de 413 a 45482 unidades de masa atómica. Cuatro péptidos fueron secuenciados completamente: i) un péptido semejante a Butantoxina que bloquea canales de potasio *Shaker*; ii) un péptido semejante a toxina de insectos; iii) un péptido semejante a la defensina escorpina y iv) un heptapéptido de función desconocida. Quince péptidos fueron secuenciados de manera directa en la región N-terminal, entre los cuales se encontró un componente tóxico para mamíferos. La construcción de una librería de cDNA nos permitió aislar y secuenciar 14 clonas correspondientes a toxinas para canales de sodio, potasio y componentes no descritos. Basados en la secuencia de toxinas conocidas de otros alacranes se observó que los péptidos y genes son muy similares. Nuestros resultados proporcionan información que puede contribuir al manejo médico de la intoxicación y en la generación de antivenenos.

ABSTRACT

Tityus costatus Karsch, 1879 (Scorpiones, Buthidae) is a scorpion of the *Mata Atlantica* region of Brazil, including the area of the city of Sao Paulo, where several human accidents have been reported requiring medical attention. No information on toxic peptides and proteins from its venom was available, until this work.

Here we demonstrate that the venom of the scorpion *Tityus costatus* contains peptides toxic to humans. Here, we report the separation of 50 different components by high performance liquid chromatography and the identification of approximately 90 distinct components by mass spectrometry analysis, with molecular weights varying from 413 to 45482 atomic mass units. Four peptides were fully sequenced: i) a butantoxin-like peptide that blocks *Shaker* K⁺ channel; ii) an insect toxin-like peptide; iii) a scorpine-like peptide, and iv) a short heptapeptide with unknown function. Fifteen peptides were directly sequenced at the N-terminal region, among which are components toxic to mice. A cDNA library was constructed and 14 clones were isolated and sequenced. Some of these peptides and genes are similar to other known scorpion toxins. Based on these results, stings by scorpions of the species *Tityus costatus* should be taken with caution by medical doctors.

Parte I

Proteómica y Genómica del Alacrán *T. costatus* Karsch.

I. Introducción

1.1 Alacranes y alacranismo

Los artrópodos son considerados como el grupo taxonómico más diverso y de amplia distribución en la tierra, siendo muy exitosos en sus diversos habitats. La divergencia entre deuterostomados y artrópodos tiene lugar en el Precámbrico, hace más de 400 millones de años (Ma) (Blair et al., 2005); la evidencia de organismos artrópodos con actividad sub-aérea en sedimentos data de 450 Ma; Se estima que los primeros organismos fósiles pertenecientes a la clase Arácnida muestran edades aproximadas de 419 Ma.

Los alacranes son artrópodos quelicerados miembros de la clase Arácnida y son considerados como taxonómico de mayor antigüedad en la tierra. Los alacranes presentan más de 400 Ma de antigüedad, su morfología y costumbres han variado poco desde su aparición en la tierra (Sissom, 1990). Existen diversas familias de alacranes, la familia *Buthidae* comprende aproximadamente 529 especies, divididas en 73 géneros, de los cuales sólo cinco géneros incluyen especies peligrosas para el hombre (Fet et al., 2000).

Los géneros *Centruroides* y *Tityus* pertenecientes a la familia *Buthidae*, incluyen especies de interés médico debido a los síntomas de envenenamiento por la intoxicación producida por la picadura. Esto es un hecho frecuentemente reportado en países tropicales y subtropicales, incluyendo México y Brasil. En estos países el alacranismo es considerado un problema de salud pública dado los reportes de frecuencia y en algunos casos de consecuencias letales. En México, los reportes de intoxicación por picadura de alacrán son atribuidos principalmente a especies del género *Centruroides*. La incidencia de personas con picadura de alacrán parece ser la más importante del mundo. Solamente en el año de 2002 se reportaron más de 251,000 accidentes (fuente: Sistema único para la vigilancia epidemiológica/SSA, México). El género *Tityus* se distribuye en Sudamérica, siendo Brasil uno de los países en donde se ha reportado como principal causante de trastornos fisiológicos graves en los individuos envenenados.

El género *Tityus* contiene más de 140 especies e incluye a las especies más letales de alacranes tropicales y subtropicales (Fet et al., 2000). Se han reportado diversas especies tóxicas para mamíferos y el humano, como *T. discrepans* (D´Suze et al., 1999), *T. serrulatus*, *T. costatus*, *T. bahiensis*, las cuales han sido consideradas como altamente tóxicas (Nishikawa et al., 1994), *T. zulianus* (Borges et al., 2004), *T. cambridgei*, *T. fasilatus*, *T. stigmurus* (Wanger et al., 2003). La especie *T. costatus* se ha reportado como especie tóxica y representa un problema de salud pública

principalmente en Brasil. El ministerio de salud de Brasil (1998) reportó 10,000 casos de picadura de alacrán al año con un rango de mortandad de 1% en los niños intoxicados (Fukuhara et al., 2004).

Los pacientes que presentan intoxicación por envenenamiento de picadura de las diversas especies del género *Tityus* muestran síntomas relacionados a alteraciones en el sistema nervioso central y periférico, complicaciones gastrointestinales, pancreáticas y arresto respiratorio, entre otros. Los síntomas más severos se manifiestan como arritmias cardíacas, hipertensión o hipotensión, "shock", edema pulmonar, insuficiencia respiratoria y en algunos casos la muerte del paciente (Fukuhara, et al. 2004; Barona et al., 2004). Los síntomas y señales observadas por el envenenamiento son atribuidos al efecto de los componentes del veneno de naturaleza proteica.

Los mecanismos de acción de los diversos componentes del veneno aún no están completamente entendidos, sin embargo, se sabe que la interacción de los componentes con los canales iónicos (de sodio o potasio) afectan al sistema nervioso central y periférico; las primeras publicaciones relacionadas al efecto del veneno de alacrán fueron hechas por el Dr. Del Pozo en México (1948); estas alteraciones pueden estar asociadas a segundos mensajeros, además de afectar al sistema inmune por la movilización de leucocitos y otras células relacionadas a la respuesta inflamatoria (Andrade et al., 2004). El edema pulmonar a menudo es la manifestación fatal originada por la intoxicación por picadura de alacranes del género *Tityus* (Andrade et al., 2004).

El alacrán *T. costatus* pertenece a las especies reportadas como tóxicas a humanos, sin embargo, no existen trabajos que refieran información sobre los componentes del veneno considerados como tóxicos para humano. La importancia médica de la especie hace que el estudio de los componentes del veneno sea de interés y represente una contribución importante en la búsqueda de componentes tóxicos, actividades no descritas y la generación de antivenenos.

1.2 Componentes del veneno de alacrán

El veneno de alacrán contiene una variedad de componentes bioactivos utilizados para la supervivencia ya que le permiten capturar distintas presas y defenderse de sus depredadores. Estos componentes son proteínas tóxicas (péptidos y enzimas), carbohidratos, aminos, nucleótidos, lípidos y otros componentes de bajo peso molecular. Algunos de los componentes encontrados en el veneno del alacrán afectan el potencial de acción de las membranas celulares (bloquean o alteran las

corrientes iónicas), por lo que son una herramienta importante en la investigación sobre los mecanismos de la conducción y la selectividad de los canales iónicos (Possani et al., 2000). Las técnicas de biología molecular, espectrometría de masas, análisis proteómico, entre otras, han permitido el descubrimiento de nuevas estructuras y moléculas con actividades antimicrobianas o sin actividad tóxica aparente.

Se conocen alrededor de 1500 especies de alacranes y sólo se han estudiado 30 de estas especies (Zhijian et al., 2003).

Toxinas de alacrán

En general los trabajos relacionados con componentes de venenos de alacranes han generado información sobre péptidos bloqueadores de canales iónicos. Estos han sido clasificados en toxinas de canales de Na^+ , K^+ , Cl^- , y Ca^{2+} de acuerdo a sus diferentes receptores. Adicionalmente, las toxinas de alacrán por sus distintos blancos pueden ser divididas en toxinas de mamíferos, toxinas de insectos y toxinas de crustáceos (Possani et al., 2000). Los componentes neurotóxicos han acaparado importancia debido a los efectos en los individuos intoxicados. Las neurotoxinas que afectan a mamíferos han sido estudiadas, general o particularmente como efectoras importantes del envenenamiento.

Las toxinas de alacrán están clasificadas en tres familias con base en su longitud: las toxinas de cadena larga con cuatro puentes disulfuro, toxinas de cadena corta con tres puentes disulfuro y toxinas de tipo intermedio con tres o cuatro puentes disulfuro (Possani et al., 2000). Se ha especulado que las toxinas de tamaño intermedio son la prueba de que las toxinas del veneno de alacrán provienen de un ancestro común ya que muestran características similares en la organización de la secuencia nucleotídica que codifica el precursor de la toxina y estructura tridimensional (Zhijian et al., 2003).

Toxinas para canales de sodio

Las toxinas del veneno de alacrán específicas para canales de sodio son polipéptidos de cadena sencilla compuestos de 59-76 residuos de amino ácidos, estabilizados por cuatro puentes disulfuro (Possani et al., 1999). Todas las toxinas de alacrán comúnmente son estabilizadas por cisteínas en una estructura denominada $\text{CS}_{\alpha\beta}$. Este motivo consiste en tres hebras- β antiparalelas y una α -hélice unidas por puentes disulfuro (figura 1).

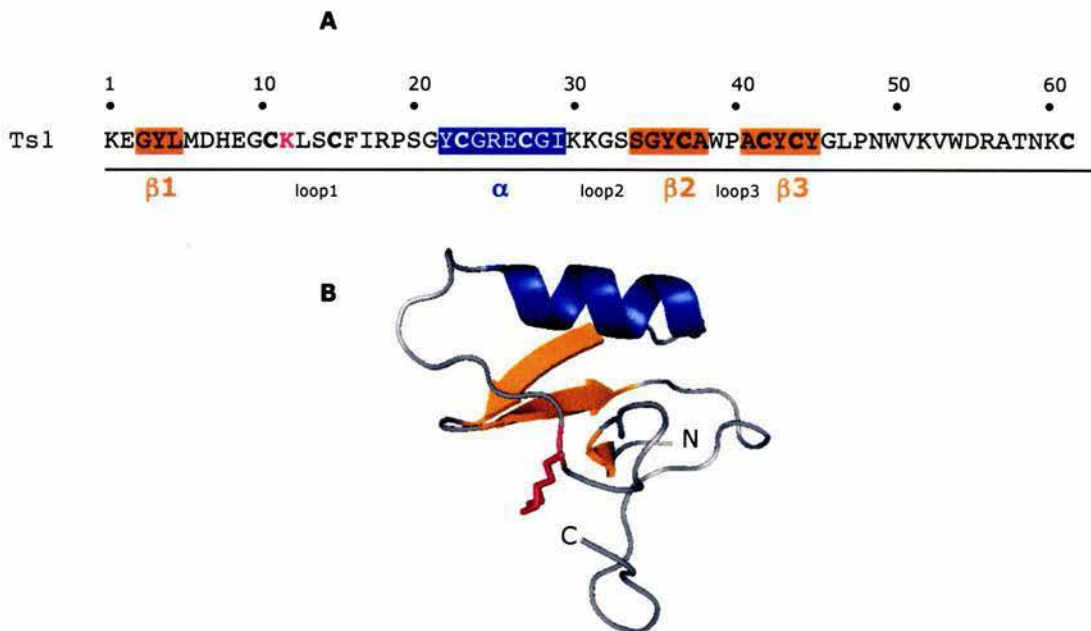


Figura 1. Estructura de la toxina de canal de sodio β -toxina, Ts1 de *T. serrulatus*. A, estructura primaria, los motivos estructurales α -hélice y hoja- β según Polikarpov et al. (1999), son mostrados en la parte baja de la secuencia. Los "loops" o asas conectores de la estructura secundaria son numerados. La posición Lys 12 es resaltada en rojo; las cisteínas son resaltadas en negritas. B, Estructura terciaria de Ts1 (PDB 1NPI).

Estudios bioquímicos y biofísicos demuestran que las proteínas de membrana como los canales de sodio, responden a los cambios de voltaje y cambian su conformación reorientando la estructura para permitir la apertura y cierre del canal (Yang et al., 1996). El canal funcional de sodio contiene subunidades alfa de 260 kDa, consta de cuatro dominios homólogos (I-IV) que contienen seis α -hélices o segmentos transmembranales (S1-S6). El segmento S4 de cada dominio contiene cargas positivas y actúa como sensor de voltaje, éste se mueve en respuesta a la depolarización de acuerdo al estado de transición del canal dependiente de voltaje. La rápida inactivación de la compuerta (gate) se lleva a cabo por las asas intracelulares que conectan los dominios III y IV, los cuales bloquean la conducción de iones por el poro, pocos milisegundos después de la apertura del canal (Catterall, 2000). Los canales de sodio son blancos de las neurotoxinas. Éstas se unen al receptor en sitios específicos del canal y modifican su función (Cestele & Catterall, 2000).

Las neurotoxinas interactúan con el canal uniéndose a sitios localizados de manera extracelular en las asas conectoras de los segmentos transmembranales. Las

toxinas de sodio se dividen en α y β según su modo de acción y propiedades de unión a los distintos sitios del canal (Rochat, et al., 1970). Las toxinas α se unen a los canales de sodio voltaje-dependiente (sitio 3), por el lado externo de la membrana, e inhiben rápidamente la cinética de inactivación, causando una depolarización prolongada en la membrana.

La α -toxina AaHII del alacrán *Androctonus australis* Hector, es un prototipo de toxina de mamífero y la toxina Lqh α IT de *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, es arquetipo de α -toxinas de insecto (revisado en Possani et al, 1999). Diversos estudios con ambas toxinas han generado información sobre unión competitiva y datos sobre los residuos clave en la actividad. Las α -toxinas se dividen en base a su actividad preferencial sobre mamíferos e insectos en tres grupos farmacológicos: 1) toxinas clásicas anti-mamíferos, como AahII y Lqh2, las cuales se unen con alta afinidad a canales de sodio de cerebro de rata; 2) α -toxinas altamente activas sobre insectos como Lqh α IT la cual se une con alta afinidad a canales de sodio de insectos (≈ 0.7 nM) y son tres órdenes de magnitud menos potentes en cerebro de mamíferos comparado con la AahII; y 3) α -toxinas "like" que son tóxicas tanto para insectos como a mamíferos (Karbat et al., 2004).

Las toxinas β se unen al sitio 4 y cambian el umbral para la activación del canal a potenciales más negativos, interfiriendo con el cierre del canal después de la repolarización de membrana (Possani et al., 1999; revisado en Catterall, 2000). La toxina Cn2 de *Centruroides noxius* es un ejemplo de β -toxina (Dehesa-Davila et al., 1996), la cual es tóxica para mamíferos.

Diversos estudios sobre los residuos involucrados en la actividad tóxica muestran que existen residuos conservados en ambos tipos de toxinas que llevan a cabo un papel importante en el reconocimiento y actividad, las β -toxinas presentan estrictamente conservado el residuo Lys12, mientras que las α -toxinas muestran el residuo Lys/Arg58 el cual puede tener relación con la inactivación del canal de sodio (Gordon, 1997; Polikarpov et al., 1999). La comparación entre toxinas α y β muestra que las α -toxinas contienen un asa alrededor del residuo 40, que al parecer juega un papel en la modulación de la actividad tóxica (Fontecillas-Camps et al., 1988).

El veneno de diferentes especies de *Tityus* contiene mayoritariamente toxinas para canales de sodio (Tabla 1), habiéndose reportado diversas α -toxinas (ejem., Ts3 y Tf4) y toxinas β (ejem., Ts1, Ts2, Tz1, Tb2). La tityustoxina representa una fracción del veneno tóxica para mamíferos (Gómez & Diniz, 1966). En esta fracción se ubicó a la toxina Ts1, también llamada TsVII o toxina gama (Bechis et al., 1984; Becerril et

al., 1997), la cual ha sido considerada como la toxina más abundante en el alacrán *T. serrulatus* y tóxica a mamíferos, por lo que ha sido ampliamente estudiada, además de ser motivo de comparación por la existencia de su estructura cristalina (Polikarpov et al., 1999). Otras toxinas de *T. serrulatus*, toxina III-8 o Ts2 (Becerril et al., 1997) y toxina IV-5 o Ts3 (Becerril et al., 1997) causan efectos tóxicos en mamíferos o en canales derivados de éstos así como la Tz1 de *T. zulianus* (Borges et al., 2004) que afecta los canales Nav1.4 de músculo esquelético. Las toxinas TdII-1 y TdII-2 de *T. discrepans* (D'Suze et al., 1996) son tóxicas a crustáceos y mamíferos; se han reportado otros componentes no tóxicos a mamíferos como TsNTxP (Chávez-Olortegui et al., 1997, 2002) o con actividad tóxica en insectos, como la TsTxVI o Ts4 (Margoni et al., 1990), Ardiscretina y Tf4 de *T. fasciolatus* que no muestra toxicidad a mamíferos ni crustáceos pero que muestra inactivación reversible de canales de sodio de epitelio de rana (Wagner et al., 2003).

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos completas reportadas de toxinas para canales de sodio para el género *Tityus*.

Toxina	Secuencia						Referencia /SwissProt																																																									
	1	10	20	30	40	50		60																																																								
Tb1	K	E	G	Y	L	M	D	H	E	G	C	K	L	S	C	F	I	R	P	S	G	Y	C	G	S	E	C	K	I	K	K	G	-	S	S	G	Y	C	A	W	P	A	C	Y	C	Y	G	L	P	N	W	V	K	V	D	R	A	T	N	K	C	P56611		
Tb2	K	E	G	Y	A	M	D	H	E	G	C	K	F	S	C	F	I	R	P	S	G	F	C	D	G	Y	C	K	T	H	L	K	A	S	S	G	Y	C	A	W	P	A	C	Y	G	V	P	S	N	I	K	V	W	D	Y	A	T	N	K	C	P60276			
Ts1 (gama)	K	E	G	Y	L	M	D	H	E	G	C	K	L	S	C	F	I	R	P	S	G	Y	C	G	R	E	C	G	I	K	K	G	-	S	S	G	Y	C	A	W	P	A	C	Y	C	Y	G	L	P	N	W	V	K	V	D	R	A	T	N	K	C	P15226		
Ts2 (III-8)	K	E	G	Y	A	M	D	H	E	G	C	K	F	S	C	F	I	R	P	A	G	F	C	D	G	Y	C	K	T	H	L	K	A	S	S	G	Y	C	A	W	P	A	C	Y	G	V	P	D	H	I	K	V	W	D	Y	A	T	N	K	C	P68411			
Tst1	K	E	G	Y	L	M	D	H	E	G	C	K	L	S	C	F	I	R	P	S	G	Y	C	G	R	E	C	T	L	K	K	G	-	S	S	G	Y	C	A	W	P	A	C	Y	C	Y	G	L	P	N	W	V	K	V	D	R	A	T	N	K	C	P56612		
Tst2	K	E	G	Y	A	M	D	H	E	G	C	K	F	S	C	F	I	R	P	A	G	F	C	D	G	Y	C	K	T	H	L	K	A	S	S	G	Y	C	A	W	P	A	C	Y	G	V	P	D	H	I	K	V	W	D	Y	A	T	N	K	C	P68410			
Tb3	K	K	D	G	Y	P	V	E	A	D	N	C	A	F	V	C	F	G	Y	D	N	A	Y	C	D	K	L	C	G	D	K	K	A	D	S	G	Y	C	Y	W	V	H	I	L	C	Y	C	Y	G	L	P	D	N	E	P	T	K	T	N	G	K	C	P56608	
Ts3 (IV-5)	K	K	D	G	Y	P	V	E	Y	D	N	C	A	I	C	W	N	Y	D	N	A	Y	C	D	K	L	C	K	D	K	K	A	D	S	G	Y	C	Y	W	V	H	I	L	C	Y	C	Y	G	L	P	D	S	E	P	T	K	T	N	G	K	C	P01496		
TsIV	K	K	D	G	Y	P	V	E	Y	D	N	C	A	I	C	W	N	Y	D	N	A	Y	C	D	K	L	C	K	D	K	K	A	D	S	G	Y	C	Y	W	V	H	I	L	C	Y	C	Y	G	L	P	D	S	E	P	T	K	T	N	G	K	C	NTSR4T		
TsTXV	K	K	D	G	Y	P	V	E	G	D	N	C	A	F	A	C	F	G	Y	D	N	A	Y	C	D	K	L	C	K	D	K	A	D	D	G	Y	C	V	W	S	P	D	C	Y	C	Y	G	L	P	E	H	I	L	K	E	P	T	K	T	S	G	R	C	P46115
Tz1	K	D	G	Y	L	V	G	N	D	G	C	K	Y	S	C	F	T	R	P	G	T	Y	C	A	N	E	C	S	R	V	K	G	K	D	G	Y	C	Y	A	W	M	A	C	Y	C	S	M	P	N	W	V	K	T	W	D	R	A	T	N	R	C	Borges et al., 2004		
Ardiscretina	K	N	G	Y	I	I	E	P	K	G	K	Y	S	C	S	W	G	S	T	W	C	N	R	E	C	K	F	K	K	G	S	S	G	Y	C	A	W	P	A	C	W	C	Y	G	L	P	D	N	V	K	I	F	D	Y	N	N	K	C	D'Suze et al., 2004					
Tf4	G	R	E	G	Y	P	A	D	S	K	G	C	K	V	T	C	F	F	T	G	V	G	Y	C	D	T	E	C	K	L	K	K	A	S	S	G	Y	C	A	W	P	A	C	Y	C	Y	G	L	P	D	S	A	S	V	W	D	S	A	T	N	K	C	P83435	
Ts4 (TsTXVI)	G	R	E	G	Y	P	A	D	S	K	G	C	K	I	T	C	F	L	T	A	A	G	Y	C	N	T	E	C	T	L	K	K	G	S	S	G	Y	C	A	W	P	A	C	Y	C	Y	G	L	P	E	S	V	K	I	W	T	S	E	T	N	K	C	P45669	
TsNTXP	G	R	E	G	Y	P	A	D	S	K	G	C	K	I	T	C	F	L	T	A	A	G	Y	C	N	T	E	C	T	L	K	K	G	S	S	G	Y	C	A	W	P	A	C	Y	C	Y	G	L	P	D	S	V	K	I	W	T	S	E	T	N	K	C	077463	

Toxinas para canales de potasio

Las toxinas de alacrán que bloquean diferentes subtipos de canales de K⁺ son clasificadas en varios grupos de acuerdo a su estructura primaria (Tytgat et al, 1999). Las toxinas de alacrán (KTx's) presentan un tamaño de 23-64 aa y pueden presentar tres o cuatro puentes disulfuro. Basados en la secuencia y alineamiento, las toxinas de K⁺ han sido clasificadas en tres familias: α-KTx, β-KTx y γ-KTx. La estructura terciaria

de estas toxinas comúnmente se integra en la región del "core", por el motivo estructural α/β estabilizado por cisteínas que conectan una α -hélice estabilizada por cisteínas y se une a dos hebras beta.

Se han reportado más de 100 subtipos de canales de potasio (Miller, 2000) y alrededor de 120 toxinas de alacrán para canales de potasio (Revisado por Rodríguez de la Vega & Possani, 2004). Estas secuencias se distribuyen de la siguiente manera: 75 son clasificadas como α -KTx's, 4 son β -KTx's, 26 son γ -KTx's, 2 son κ -hefutoxinas, 5 son clorotoxinas/ tipo "insectoxin-like" y 8 no se encuentran clasificadas. Las toxinas específicas para canales de potasio interaccionan con tres clases principales de canales: dependientes de voltaje (tipo Kv), alta conductancia activados por Ca^{2+} (tipo BK) y pequeña conductancia activados por Ca^{2+} (tipo SK). El primer péptido bloqueador de canales de potasio reportado en la literatura fue la noxiustoxina (NTX), del veneno del alacrán mexicano *Centruroides noxius* Hoffmann, la cual mostró efecto de bloqueo al canal de potasio de los axones gigantes de calamar (Carbone et al., 1982; Possani et al., 1982).

Tabla 2. Secuencias completas de toxinas para canales de potasio reportadas para el género *Tityus*.

Toxina	Secuencia						Referencia GenBank																																																						
	1	10	20	30	40	50		60																																																					
β -1/TsTXK β	K	L	V	A	L	I	P	N	D	Q	L	R	S	I	L	K	A	V	V	H	K	V	A	K	T	Q	F	G	C	P	A	Y	E	G	Y	C	N	D	H	C	N	D	I	E	R	K	D	G	E	C	H	G	F	K	C	K	C	A	K	D	P69940
α -4.1/TsTxK α (TsII-9/TsK4)	V	F	I	N	A	K	C	R	G	S	P	E	C	L	P	K	C	K	E	A	I	G	K	A	A	G	K	M	N	G	K	C	K	C	Y	P	P46114																								
α -4.2/Ts κ	V	V	I	G	Q	R	C	Y	R	S	P	D	C	Y	S	A	C	K	L	V	G	K	A	T	G	K	T	N	G	R	C	D	P56219																												
α -4.3/TDK1	V	F	I	N	V	K	T	G	S	K	Q	C	L	P	A	C	K	A	A	V	G	K	A	A	G	K	M	N	G	K	C	K	C	Y	T	P59925																									
α -4.4/Tc30	V	F	I	N	V	K	C	R	G	S	K	E	C	L	P	K	C	A	A	V	G	K	A	A	G	K	M	N	G	K	C	K	C	Y	P	P60210																									
α -15.6/Td (Discrepina)	Z	I	D	T	N	V	K	C	S	G	S	S	K	V	K	I	C	I	D	R	Y	N	T	R	G	A	K	I	N	G	R	C	T	C	Y	P	D'Suze et al, 2004																								
α -12.1/Ts (Butantoxina)	W	C	S	T	C	L	D	L	A	C	G	A	S	R	E	C	Y	D	P	C	F	K	A	F	G	R	A	H	G	K	M	N	K	C	R	C	Y	T	P59936																						
α -13.1/Tc1	A	C	G	S	C	R	K	K	C	K	G	S	G	K	C	I	N	G	R	C	K	C	Y	P83243																																					
α -18.1/Tc32	T	G	P	Q	T	T	C	Q	A	A	M	C	E	A	G	C	K	L	G	K	S	M	E	S	C	Q	G	D	T	C	K	C	K	A	P60211																										
1/Ts pep1	K	P	K	C	G	L	C	R	Y	R	C	S	G	G	C	S	S	G	K	V	N	G	A	C	D	C	Pimenta et al, 2003																																		
2/Ts pep2	T	V	K	C	G	G	C	N	R	K	C	C	A	G	G	C	R	S	G	K	I	N	G	K	C	Q	C	Pimenta et al, 2003																																	
3/Ts pep3	T	V	K	C	G	G	C	N	R	K	C	C	P	G	G	C	R	S	G	K	I	N	G	K	C	Q	C	Pimenta et al, 2003																																	

Existen reportes sobre distintos péptidos con actividad moduladora de canales de potasio en especies del género *Tityus* (Tabla 2). Se han reportado péptidos de cadena corta específicos para canales de potasio: la butantoxina (Holaday et al., 2000; Coronas et al., 2003), TsTxK α y Ts κ (Rogoswski et al., 1994; Legros et al., 2003); péptidos de cadena larga como TsTXK β y ejemplos de nuevas subfamilias como Tc32 (Batista et al., 2004). Las secuencias parciales reportadas de TdII-3 y TdII-4 sugieren que son péptidos bloqueadores de canales de potasio (D'Suze et al., 1996).

Péptidos antimicrobianos y defensinas

En la naturaleza se distribuyen moléculas con propiedades microbicidas encontradas en protozoarios, procariotes, plantas, invertebrados y vertebrados expuestos a los diversos patógenos del ambiente. Los péptidos antimicrobianos son un componente importante de los mecanismos de defensa al ataque o invasión de patógenos. Estos péptidos muestran un espectro de actividades contra diversos microorganismos que incluyen bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, virus, protozoarios, levaduras y hongos. En animales, se han descrito componentes antimicrobianos en fluidos corporales en contacto con el medio ambiente, en hemolinfa, células especializadas del sistema inmune y en venenos.

Los péptidos antimicrobianos son anfipáticos, presentan propiedades catiónicas, adoptan estructuras α -helicoidales, muestran diversidad de tamaño, menores a 10 kDa, con presencia o ausencia de cisteínas en su secuencia primaria (Bulet et al., 2004). La mayoría de estos péptidos actúan como formadores de poro de la membrana plasmática causando lisis celular. En general los componentes antimicrobianos son clasificados en tres grandes grupos: 1) péptidos con conformación α -hélice, 2) péptidos cíclicos o cíclicos abiertos en la parte terminal con residuos de cisteínas, 3) péptidos sobre representados en ciertos aminoácidos (ricos en prolina, histidina, arginina, entre otros) (Bulet et al., 2004).

Las defensinas de vertebrados se clasifican en dos subfamilias, las subfamilias α y β basadas en el patrón de puentes disulfuro. La clasificación de invertebrados en subfamilias basado en las propiedades biológicas, antibacterianas versus actividades antifúngicas. Las toxinas y defensinas presentan un motivo estructural estabilizado por cisteínas ($CS\alpha\beta$). En artrópodos se han aislado más de 70 defensinas diferentes (Bulet, 2004).

En arácnidos se encuentran ejemplos sobre componentes antimicrobianos (figura 2), particularmente en la hemolinfa (Rodríguez de la Vega et al, 2004a) y el veneno de algunas especies de alacrán (Conde et al, 2000; Torres-Larios et al., 2000; Corzo et al., 2001) y arañas (Corzo & Escoubas, 2003; Kuhn-Nentwig et al., 2004). Se han observado diversos péptidos con actividad antimicrobiana tipo α -hélice formadores de poros (parabutoporina, hadrurina, IsCTs y pandinina) u otros componentes tipo defensinas que muestran cisteínas en su estructura primaria.

Las defensinas representan una familia importante con variedad de componentes antimicrobianos, presentando actividades contra bacterias, hongos e inhiben el desarrollo de algunos virus. Las defensinas son parte de la inmunidad innata

que provee la primera defensa contra patógenos infecciosos, son péptidos catiónicos, su tamaño varía entre los 35-50 aa y se expresan de manera inducible o constitutiva por la presencia de microorganismos o productos de éstos (revisado por Bulet et al., 2004). Las defensinas clásicas de invertebrados y plantas se caracterizan por contener tres puentes disulfuro presentando el motivo estructural CS $\alpha\beta$. Las defensinas de vertebrados e invertebrados tienen un modo de acción antibacteriano similar; por la diversidad de secuencia y estructura, son consideradas filogenéticamente no relacionadas (Froy & Gurevitz, 2003).

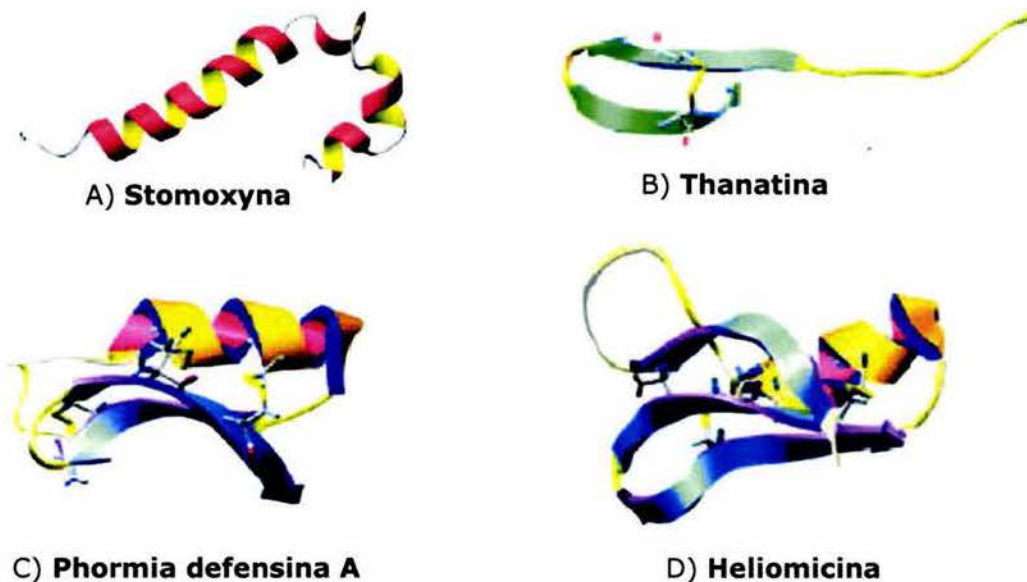


Figura 2. Ejemplos de estructuras en tercera dimensión de péptidos antimicrobianos de invertebrados (Bulet et al., 2004). A, Stomoxyna de la mosca *Stomoxys calcitrans* no contiene cisteínas en su secuencia primaria; B, Thanatina del insecto *Podisus maculiventris* con dos cisteínas en su secuencia primaria; C, Phormicina de la mosca *Phormia terranova* y D, Heliomicina de la mariposa nocturna *Heliothis virescens* presentan 6 cisteínas en su secuencia primaria mostrando una estructura estabilizada por tres puentes disulfuro. Las cisteínas presentes en las estructuras son resaltadas.

Existen algunos reportes sobre péptidos antimicrobianos en alacranes como la Hadrurina de *Hadrurus aztecus* (Torres-Larios et al., 2000); *Scorpine* de *Pandinus imperator* (Conde et al., 2000), *Cll-dlp* de *Centruroides limpidus limpidus* (Rodríguez de la Vega, 2004).

La Hadrurina es un péptido de 41 aminoácidos que no contiene cisteínas, el modelo de estructura tridimensional muestra dos segmentos de α -hélice, es una molécula con características anfipáticas; presenta actividad antimicrobiana inhibiendo el crecimiento de bacterias como *Salmonella thyphy*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, entre otras (Torres-Larios et al., 2000).

La *Scorpine*, defensina aislada del alacrán *Pandinus imperator* (Conde et al., 2000), es un componente que ha sido reportado por nuestro laboratorio como antimicrobiano y potente inhibidor de estadios de desarrollo de *Plasmodium berghei* (anti-malaria) y bactericida. La *Scorpine* tiene 75 aa en su secuencia madura, la masa molecular es de 8350 Da y presenta tres puentes disulfuro. Existen homólogos de *Scorpine*, en el alacrán Africano *Opisthophthalmus carinatus* (opiscorpines 1-4 con actividad antifúngica) cercano filogenéticamente con *P. imperator* (Zhu & Tytgat, 2004). Otros péptidos provenientes de *P. imperator* son las Pandininas 1 y 2, éstos péptidos presentan estructura α -helicoidales y actividad bactericida contra Gram⁻ y Gram⁺ (Corzo et al., 2001).

1.3 Genómica y Proteómica en el género *Tityus*

Los genes y la genómica de *Tityus*

La información sobre la comparación de las secuencias genómicas completas de los organismos eucariota ha permitido reconocer diversos tipos de familias génicas, incluso una organización particular para cada tipo de gene. La generación de información sobre organización de genes en arácnidos es reciente. Existen pocas secuencias para realizar una búsqueda o determinar un consenso sobre la organización de las familias génicas; aun así, se encuentran establecidas características generales sobre la disposición de intrones, exones y algunos procesamientos trasccripcionales (Possani et al., 1999).

Los genes y su organización se ven afectados por la presión selectiva del ambiente, cambios en secuencia y el proceso de co-evolución de especies. La organización de genes tiene implicaciones evolutivas respecto a la filogenia y estructura primitiva de los genes, es decir, la similitud intrón-exón presente en las toxinas de alacrán sugiere una vía común de evolución (Gendeh et al., 1997) o un proceso que lleva a la convergencia. Las diferencias en la estructura primaria de las toxinas y componentes del veneno muestran diferencias en la selectividad a diversos canales (D´Suze et al., 2004), lo que refleja la evolución de las especies o su grado de especialización.

El modelo de organización de genes para las toxinas que afectan canales de Na⁺ se basa en el resultado obtenido para el género *Tityus*, este gene consta dos exones y un intrón; la secuencia genómica de este tipo de toxinas muestra que existe una estructura general en la que un intrón interrumpe el péptido señal (Becerril et al., 1995). Los genes de toxinas de canales de sodio presentan en promedio, un péptido

señal de 18-21 aa. El análisis de estas secuencias y de los 3' no codificantes de varios cDNAs muestran similitud entre las regiones (Becerril et al., 1995; Possani et al., 1999).

Las secuencias de cDNAs y DNA genómico que existen reportadas para toxinas de sodio y potasio nos permiten observar la estructura general de estos genes. Possani et al. (1999), mencionan que los tamaños promedio del premRNA en toxinas varía de 300-350 nucleótidos y que la traducción de los mRNAs genera un precursor de 82-96 residuos, los cuales son procesados en algunos casos (N- y C- terminal). El C-terminal es procesado por una peptidasa carboxil-terminal en un residuo básico (Lys o Arg). Típicamente durante el procesamiento C-terminal son escindidos uno o dos residuos; cuando un residuo de glicina precede a dos residuos básicos, éstos son removidos y el nitrógeno de la glicina amida del aminoácido inmediatamente anterior. Se ha observado que la amidación del C-terminal es un procesamiento postraduccional importante para la actividad del péptido maduro.

La información sobre genes y organización genética en el género *Tityus* es escasa, son pocos los genes reportados que corresponden a secuencias nucleotídicas que codifican precursores o péptidos (cDNAs) con actividad tóxica o no conocida. Estos reportes refieren a la toxina Ts1 (toxina gama) de *T. serrulatus* (Martín-Euclaire et al., 1992; Becerril et al., 1993; Becerril et al., 1996); Tz1 de *T. zulianus* (Borges et al., 2004), Tf4 de *T. fasciolatus* (Wanger et al., 2003), Ardiscretina de *T. discrepans* (D´Suze et al., 2004) además de secuencias parecidas a la de toxinas de canales de potasio como TsPep1, TsPep2 y TsPep3 de *T. serrulatus* (Pimenta et al., 2003).

El estudio de los péptidos y la proteómica de venenos

El término de proteómica ha sido usado para describir la información de todas las proteínas (expresadas) presentes en la célula o tejido, específicamente en determinado tiempo y condiciones fisiológicas. Nos permite observar diversos cambios en la expresión, localización y modificaciones postraduccionales de los componentes peptídicos (revisado por Tsai et al, 2004). El proteoma es un estudio sobre comparación de proteínas, identificando, cuantificando y determinando el efecto de sus modificaciones, interacciones, actividades y función en determinadas condiciones, dado que esta composición de proteínas se puede ver alterada por factores externos como estrés, condiciones ambientales o patógenos.

La información de los diversos transcriptomas y proteomas son pieza básica en estudios comparativos relacionados a condiciones de estrés y estadios de desarrollo, entre otros. Los reportes sobre análisis proteómico o peptidómico en artrópodos son

escasos y, se enfocan a la obtención de información sobre proteomas relacionados a respuesta inmune en *Drosophila* (Engstrom et al., 2004; Levy et al., 2004), alacranes (Rodríguez de la Vega et al., 2004a), o enfatizando componentes péptidicos del veneno de arañas (Kuhn-Nentwig et al., 2004), serpientes (Tsai et al., 2004) y alacranes (Pimenta et al., 2001; Batista et al., 2004).

Los métodos de electroforesis y HPLC han sido utilizados para establecer los perfiles de diversos venenos; la espectrometría de masas es una importante herramienta para determinar de manera sensible, rápida y precisa, la masa molecular de muestras puras. Estas metodologías han permitido resolver problemas relacionados con la clasificación de especies con base a la composición de venenos (Pimenta et al., 2003; Valdez-Cruz et al., 2004). Con el desarrollo de la proteómica, se han realizado adecuaciones para elucidar estructuras y la identificación de muestras biológicas, como las mezclas complejas de extractos naturales o venenos, además de diversas aplicaciones médicas como la detección específica de toxinas en la sangre u otros componentes expresados en tejidos relacionados a condiciones de estrés (Desbroces et al., 2005) o cáncer (Drew et al., 2005); estas aplicaciones han contribuyen a responder diversas interrogantes sobre la composición y expresión de los proteomas en diversos organismos.

Los trabajos sobre análisis proteómico relacionados con la composición general de los venenos enfatizan a los componentes peptídicos de acción neurotóxica, actividad citolítica, péptidos catiónicos con actividades antimicrobianas, hemolíticas, insecticidas, de fosfolipasas (PLA₂s) y disintegrinas. Las fosfolipasas son componentes importantes del veneno de alacranes y serpientes, catalizan la hidrólisis de enlaces 2-acil éster de fosfoglicéridos para producir lisofosfoglicéridos y ácidos grasos. Por otro lado, las disintegrinas son polipéptidos cortos de alrededor de 9 kDa con secuencias expuestas (RGD o KGD) para la unión específica a una variedad de glicoproteínas de receptores de membrana o motivos favorables para interacciones de alta afinidad con el receptor α IIB β ₃ de plaquetas humanas. Tsai et al. (2004), reporta un análisis comparativo de fosfolipasas A2 y disintegrinas de tres especies de serpientes asiáticas del género *Protobothrops* ("pit vipers") analizando la expresión de fosfolipasas y la neurotoxicidad. Los datos generados permitieron un análisis filogenético basado en las secuencias de aminoácidos de las dos familias lo que indicó que pertenecen a un grupo monofilético, de esta manera la información de los proteomas permite el análisis evolutivo de familias génicas.

En la literatura existen tres reportes anteriores sobre la proteómica de alacranes, dos de estos reportes muestran la huella proteómica de los componentes del veneno de dos especies del género *Tityus*, *T. serrulatus* (Pimenta et al., 2001) y *T. cambridgei* (Batista et al., 2004), este último generado en nuestro laboratorio. Con el trabajo que se reporta en esta tesis ya son cuatro las publicaciones que se refieren al estudio proteómico de componentes del veneno de alacranes (Diego-García et al., 2005).

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En diversas especies de alacranes se han realizado análisis de los componentes de los venenos a diferentes niveles, enfatizando el estudio particular de componentes aislados, siendo escasos los estudios que engloban los análisis proteómico y genómico. La importancia médica atribuida a la especie de alacrán *T. costatus* como especie tóxica para humanos, además de la carencia de información sobre los componentes del veneno a niveles molecular y peptídico, nos permiten plantear este trabajo de investigación justificando que el análisis de los componentes del veneno de *T. costatus* es necesario para la generación de antivenenos, además de ser una contribución a la proteómica de arácnidos dando la pauta a la generación de información sobre la "huella" del peptidoma en el género *Tityus*. Este trabajo proporciona una base sólida para investigaciones posteriores de los componentes del veneno. Por otro lado, la escasa información sobre secuencias nucleotídicas y organización genética de genes de alacrán, permite hacer de este proyecto una contribución significativa a la generación de información básica y a los análisis de filogenia molecular de arácnidos.

Objetivo

El objetivo principal de este trabajo es realizar la caracterización de péptidos y genes que codifican toxinas y componentes antimicrobianos del veneno del alacrán *T. costatus* Karsch.

Objetivos Particulares

1. Aislamiento y determinación de la secuencia de aminoácidos de péptidos del veneno de *T. costatus*.
2. Ensayos de toxicidad (letalidad) de los componentes purificados en mamíferos (ratón), insectos y bacterias.
3. Realización del análisis de los componentes peptídicos del veneno de *T. costatus* (identificación del número total de componentes y sus masas moleculares).
4. Obtención de clonas nucleotídicas a partir de la generación de un banco de cDNA de telsón (incluye glándula del veneno) de *T. costatus*.
5. Integración de la información nucleotídica y peptídica de *T. costatus* mediante el análisis bioinformático de secuencias.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 Análisis Proteómico

Las técnicas utilizadas para este trabajo involucraron metodologías de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), secuenciación directa de péptidos por degradación de Edman, espectrometría de masas con ionización por electrospray (LC/ESI-MS/MS), así como herramientas bioinformáticas que llevaron a obtener las diversas secuencias y masas moleculares de los distintos componentes del veneno. Los detalles sobre las técnicas y protocolos utilizados en este trabajo son mencionados en datos publicados (Diego-García et al., 2005).

3.2 Ensayos Biológicos

El análisis del efecto tóxico de los componentes se realizó en mamíferos, insectos y bacterias.

Toxicidad en mamíferos: Las fracciones y componentes del veneno de *T. costatus* (Tco) empleados en el análisis y exploración particular de actividad biológica fueron re-cromatografiados por HPLC fase reversa para la obtención de componentes aislados. Los componentes fueron cuantificados y solubilizados en agua para su posterior inyección en ratones. Se utilizaron ratones de la línea CD1 en el experimento de toxicidad. Se tomaron los datos de peso y posteriormente fueron inyectados con las fracciones del veneno de manera intraperitoneal. Uno de los ratones fue inyectado con solución libre del componente de Tco como control negativo. Las fracciones probadas para toxicidad en ratón fueron Tco36.14 (10 µg), Tco36.62 (20 µg), Tco38.32 y 39.81. La observación de los síntomas de envenenamiento se realizó por un tiempo de 24 horas posterior a la inyección.

Toxicidad en insectos: La observación del efecto tóxico en insectos se realizó utilizando el protocolo para la obtención de los componentes Tco descrito previamente para ratones. Se inyectaron por la región abdominal a tres grillos con cantidades de 0, 3 y 7 µg del componente purificado Tco38.32-2.

Actividad antimicrobiana: Las pruebas de actividad antimicrobiana se llevaron a cabo utilizando cepas tipo silvestre de *Escherichia coli* (cepa DH5α) y *Bacillus subtilis* (cepa BSRI). Los cultivos de bacterias fueron crecidos en medio LB libre de antibiótico a 37°C hasta llegar a una densidad óptica (O.D.) de 0.7-0.8, posteriormente se colocó 1 ml de cultivo bacteriano en 200 ml de medio de cultivo LB con agar para su vaciado en caja Petri. Las cajas con medio sólido fueron inoculadas por goteo con los

componentes puros indicados con posible actividad antimicrobiana en base a la similitud en secuencia con componentes de reportados en la base de datos.. Se utilizaron 0.5 y 2 μg del componente (Tco41.46-2) para cada una de las cepas.

3.3 Ensayos electrofisiológicos

Los experimentos electrofisiológicos se realizaron en el canal de potasio *Shaker B* expresado en células de insecto Sf9; el protocolo utilizado para el proceso de transfección fue previamente reportado (Klaiber et al., 1990). La medición de las corrientes fue registrada en células intactas por "Patch clamp" con Axopatch-1D (Axon Instruments). Las condiciones en detalle son descritas en datos publicados (Diego-García et al., 2005).

3.4 Análisis genómico

Obtención de las clonas a partir del banco de cDNA

La preparación del banco de cDNA, la obtención de clonas y su caracterización se realizaron siguiendo los procedimientos publicados (Martin-Euclaire et al., 1992; Rodríguez de la Vega, 2004). En forma resumida se diseñaron oligonucleótidos degenerados a partir de las secuencias peptídicas obtenidas por secuenciación directa de los componentes del veneno. Estos oligonucleótidos fueron usados en conjunto con el oligonucleótido CDIII/3' (CLONTECH Lab) para la amplificación de las secuencias a partir del cDNA de *T. costatus*. Los productos amplificados fueron purificados y clonados en el vector *pGEM* (Promega, Madison, WI). Las clonas seleccionadas con base en la identidad con toxinas o componentes antimicrobianos fueron utilizadas como sondas homólogas para la búsqueda de clonas completas en la librería de cDNA mediante métodos de hibridización tipo Southern blot. Las sondas fueron marcadas no radioactivamente (Alkphos, Amersham) y posteriormente fueron usadas para la hibridización en colonia mediante las membranas tratadas correspondientes a las placas del banco de cDNA. Se utilizaron condiciones de baja (55 y 60°C) y alta severidad (astringencia) para la hibridización en colonia (65°C).

Los materiales y métodos para la generación del banco de cDNA, hibridización en colonia tipo Southern blot, secuencias de oligonucleótidos, obtención y análisis de las secuencias nucleotídicas correspondientes a las secuencias peptídicas encontradas en el veneno de *T. costatus* han sido referidos en datos publicados (Diego-García et al., 2005).

IV. RESULTADOS

4.1 Datos Publicados

El trabajo medular de este proyecto fue publicado en la revista *Toxicon* en el artículo "The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: genes, peptides and functions", publicado en el volumen 45, páginas 273-283 (2005).



ELSEVIER

Toxicon 45 (2005) 273–283

TOXICON

www.elsevier.com/locate/toxicon

The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: genes, peptides and function

Elia Diego-García^a, Cesar V.F. Batista^a, Blanca I. García-Gómez^a, Sylvia Lucas^b, Denise M. Candido^b, Froylan Gómez-Lagunas^c, Lourival D. Possani^{a,*}

^aDepartment of Molecular Medicine and Bioprocesses, Institute of Biotechnology, National Autonomous University of Mexico, Avenida Universidad 2001, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca 62210, Mexico

^bInstituto Butantan, Avenida Vital Brazil 1500, Sao Paulo, Brazil

^cDepartment of Physiology, Medical School, National Autonomous University of Mexico, Ciudad Universitaria Mexico D.F. 04510, Mexico

Received 8 September 2004; revised 19 October 2004; accepted 20 October 2004

Available online 10 December 2004

Abstract

The venom of the scorpion *Tityus costatus* contains peptides toxic to humans but scarce information on their structure and function is available. Here, we report the separation of 50 different components by high performance liquid chromatography and the identification of approximately 90 distinct components by mass spectrometry analysis, with molecular weights varying from 413 to 45482 atomic mass units. Four peptides were fully sequenced: (i) a butantoxin-like peptide that blocks *Shaker* K⁺ channel; (ii) an insect toxin-like peptide; (iii) a scorpine-like peptide, and a short heptapeptide of unknown function. Fifteen peptides were directly sequenced at the N-terminal region, among which are components toxic to mice. A cDNA library was constructed and 13 clones were isolated and sequenced. Some of these peptides and genes are similar to other known scorpion toxins. Based on these results, stings by scorpions of the species *Tityus costatus* should be taken with caution by medical doctors.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Ion-channel; Proteomics; Scorpion; *Tityus costatus*; Toxin

1. Introduction

Tityus costatus Karsch, 1879 (Scorpiones, Buthidae) is a scorpion of the *Mata Atlantica* region of Brazil, including the area of the city of Sao Paulo, where several human accidents have been reported requiring medical attention (Sylvia Lucas, Butantan Institute, unpublished observations). No information on toxic peptides and proteins from its venom is available, contrary to the other dangerous species of the genus *Tityus* (*T.*) from Brazil: *T. serrulatus*,

T. bahiensis, *T. stigmurus*, *T. cambridgei* and *T. fasciolatus*. These five species have been studied in more detail especially *T. serrulatus* (see review de Lima and Martin-Eauclaire, 1995; Becerril et al., 1997; Pimenta et al., 2001). Earlier studies with *T. serrulatus* have shown the presence of at least three distinct toxins that affect mammals (Possani et al., 1981, 1991): toxin gamma, also named toxin VII (Bechis et al., 1984) or Ts1 (Becerril et al., 1997), toxin III-8 or Ts2 and toxin IV-5 or Ts3 (Becerril et al., 1997). They all are toxic to mice and recognize Na⁺-channels with different modes of action (Lombet and Lazdunski, 1984; Yatani et al., 1988; Kirsh et al., 1989). Genes coding for these toxins, from *T. serrulatus*, *T. bahiensis* and *T. stigmurus* were cloned using messenger (cDNA) or DNA as templates (Martin-Eauclaire et al., 1992; Becerril et al., 1996).

* Corresponding author. Tel.: +52 77 73 171209; fax: +52 77 73 172388.

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

Another peptide non-toxic to mammals (TsNTxP) isolated from *T. serrulatus* was fully characterized (Chavez-Olortegui et al., 1997, 2002). Three different short chain peptides specific for K⁺-channel were characterized: butantoxin (Holaday et al., 2000; Coronas et al., 2003), TsTxK α and Tsk (Rogowski et al., 1994; Legros et al., 1996). Additionally, minor components toxic to mice were reported to exist in the venom of *T. serrulatus* (Marangoni et al., 1990, see also review Possani et al., 1999). Their effects on ion-channels were studied in various preparations. Reviews on the subject can be found in (Martin-Eauclaire and Couraud, 1995; Possani et al., 1999, 2000; Tytgat et al., 1999; Gordon et al., 2002; Gurevitz et al., 2002; Rodríguez de la Vega and Possani, 2004). From *T. cambridgei* a recent communication of our group has shown the presence of more than 110 different components (Batista et al., 2004), among which was Tc32. This was the first example of a novel sub-family of K⁺-channel specific toxin (systematic name α -KTX 18.1), in which the functional dyad of amino acids responsible for channel recognition (Dauplais et al., 1997) was shown to be absent (Batista et al., 2002). Thus, the isolation and characterization of unknown components from other species of the genus *Tityus* might provide the discovery of interesting novel components in these venoms. Furthermore, due to the fact that *T. costatus* scorpion stings are known to cause human accidents of medical consequences, it is very important to identify their venom components and to verify if the venom contains similar or different peptides, when compared to the other species of the genus *Tityus*.

In this report we show the presence of more than 40 distinct components in its venom. We confirm the presence of mammalian specific toxins, similar to those that recognize Na⁺ and K⁺-channels, as well as the presence of a defensin-like peptide. A novel structural component was also found, from which the function is still unknown.

2. Material and methods

2.1. Geographical distribution and characteristics of *T. costatus*

This scorpion is a typical species of the Atlantic Forest of Brazil; distributed from the State of *Rio de Janeiro* to *Rio Grande do Sul*. In 1879, F. Karsch described the species using specimens collected in Rio de Janeiro (Karsch, 1879). For many years this scorpion was considered a closely related species to *T. dorsomaculatus*, earlier classified by Lutz and Mello (see review by Lourenço (2002)). Presently they are considered synonymous species, under the denomination *T. costatus* (Lourenço, 2002). The adults have between 5 and 7 cm length, colour yellowish brown, with spots in the legs and pedipalps. They have a subaculear spine in the telson, show three longitudinal stripes on the dorsal face of the mesosoma and can be found in two different isoforms. One shows a more clear background body with three darkish

stripes, usually found at the sea level; whereas the maculate isoform has a darker body and the stripes are not well defined but convergent. The latter one is found at higher altitude areas, as that of the city of Sao Paulo (Lourenço, 2002). This was the isoform used for the work reported here.

2.2. Venom source and purification procedures

Venom from a dozen scorpions collected in the area surrounding the Butantan Institute, Sao Paulo, Brazil was obtained by electrical stimulation and dried. The material was dissolved in water and centrifuged 10,000 \times g for 15 min. The soluble venom was separated by high performance liquid chromatography (HPLC) in a C18 reverse-phase analytical column (Vydac, Hisperia, CA), using a linear gradient from 0% solvent A (0.12% trifluoroacetic acid–TFA—in water) to 60% solvent B (0.10% TFA in acetonitrile) run for 60 min, at a flow rate of 1 ml/min. Several components were obtained in homogenous form; others required a second HPLC separation, using an analytical C18 reverse-phase column, run with slightly modified gradients, as indicated in the appropriate figure legend below.

2.3. Bioassays

Lethality tests were performed using mice (CD1 strain with approximately 20 g body weight). A 'non-toxic' component means that the animal (mouse) injected with a dose not greater than 50 μ g protein showed no symptoms of intoxication, similar to injection of saline solution in presence of 0.15 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4. A 'toxic' component means that the mouse showed any of the following symptoms: excitability, salivation, dyspnea, sialorrhoea, convulsions, paralysis but recovered overnight, whereas 'lethal' means that the animal showed more than one of the symptoms described and died, within 20 h of the injection. A reduced number of mice were used (not more than a couple), in order to avoid inflicting unnecessary pain to living animals. The protocol of experimentation was approved by the Ethical Committee for the Welfare of Animals of our Institute.

2.4. Mass spectrometry determination

Five μ l of the sample was injected into a LC/MS system composed of a Finnigan LCQ^{Duo} ion trap mass spectrometer (San Jose, CA) with a nanoelectrospray ionization (ESI) source using a Surveyor MS syringe pump delivery system and a C₁₈ PicoFrit column/needle (75 μ m \times 10.1 cm) which was set on an xyz multi-axis translational stage for optimizing the ESI signal. The LC/ESI-MS/MS data acquisition program was set up to collect ion signals from the eluted peptides using an automatic, data-dependent scan procedure, in which a cyclic series of three different scan modes (full scan, zoom scan and MS/MS scan) were performed.

First, the most abundant peptide ion peak in a full scan (m/z 300–2000) was selected as the precursor ion. Second, a zoom scan was performed to determine the charged state of the precursor ion. Finally, an MS/MS scan was used to determine the sequence of the precursor ion using collisionally induced dissociation (CID) with relative collision energy of 40%. The enzymatically digested peptides were separated using mobile phases A and B with a linear gradient of 5–60% B, (mobile phase A, 0.5% acetic acid–water; mobile phase B, 0.5% acetic acid in acetonitrile), at a flow-rate of $0.2 \mu\text{l min}^{-1}$. The data acquisition and the automatic analysis of data were performed with the Xcalibur software on a Windows NT PC system. The MS/MS spectra from peptides enzymatically generated were analyzed manually and by the Sequest software. Peptides and toxins previously separated by HPLC were direct injected into the mass spectrometer.

2.5. Amino acid sequence determination

Amino acid sequence determination of pure peptides and fragments of the alkylated samples after digestion with enzyme was performed by automatic Edman degradation in a Beckman LF 3000 Protein Sequencer (Palo Alto, CA, USA) using the chemicals and procedures previously described (Brune, 1992; Batista et al., 2004). The enzyme used for this work was endopeptidase lysine-C (Lys-C) from Roche Diagnostics (Basel, Switzerland).

2.6. cDNA library construction

A cDNA library was constructed with RNA extracted from a single telson (last postabdominal segment of the animal, which contains the stinger and a pair of venomous glands) of a *T. costatus* scorpion. For RNA isolation the 'Total RNA Isolation System' of Promega (Madison, WI) was used. With this material a full-length cDNA phagemid library was prepared using the SMART cDNA Library Construction Kit (CLONTECH Lab., Palo Alto, CA). The titer of the amplified cDNA library obtained was 1×10^7 with 99% recombinant clones.

2.7. Gene cloning and DNA sequencing

Based on the information obtained from direct peptide sequencing, several oligonucleotides were synthesized:

Tc3 5'-AARATYAARAGYGGNTGGGARCG-3';
 Tc6 5'-AARGARGGNTAYGCNATGGAYCAYGAR-3';
 Tc7 5'-AARAARTCNGGNTAYCCNGTNGARTAY-3';
 Tc8 5'-GGNAARGARGGNTAYCCNACN-3'; and
 Tc10 5'-TGCYTDGTCATCGAGATCYTD-3',

using a model 391 DNA Synthesizer from Applied Biosystems (Foster city, CA), where D,N,R and Y stand for degenerate nucleotides. For the polymerase chain reaction (PCR), each one of these primers were used in conjunction with the pair CDSIII/3' primer, purchase from

the same company (CLOTECH Lab, see above). The library material was used as template for the PCR reaction. The PCR reaction was performed in $1 \times$ Taq DNA polymerase PCR buffer, $200 \mu\text{M}$ dNTPs, $0.25 \mu\text{M}$ degenerate forward primer, $0.25 \mu\text{M}$ reverse primer (SMART Library) and 2 units of Taq DNA polymerase (Perkin Elmer 9600) in $50 \mu\text{l}$ final volume. The PCR protocol was: initial cycle 1 min denaturation at 94°C , 15 min alignment at 55°C (before Taq polymerase was added), 30 s elongation at 72°C , for one cycle. After these cycles the mixture was incubated 30 s for denaturation at 94°C , 40 s alignment at 50°C , 30 s elongation at 72°C , repeated 40 cycles, followed by a final step at 72°C ($50 \mu\text{l}$ total volume of reaction). PCR products were purified using a Centricon 100 column (Amicon) following the manufacturer instructions and then ligated into the *pGEM-plasmid* (Promega, Madison, WI). The ligation reaction was used to transform competent *E. coli* DH5- α cells. Positive clones were sequenced from both ends using an automatic machine (Model 3100, Applied Biosystems, Foster city, CA).

Several sequences were obtained from these initial PCR reactions and used as probes. The search for complete clones was conducted by colony hybridization experiments using the plated cDNA Library and the probes obtained from the previous experiments. No radioactively labeled material was used according to the specifications of the manufacturer (Alkphos from Amersham Pharmacia Biotech Inc (Piscataway, NJ). For the second and third selection rounds and for searching more related clones, specific synthetic probes were used. Two different pairs of specific oligonucleotides were synthesized (VFIN and KEGY). The pair VFIN was: 5'-GGATTTGAGCCAGCAAGTT-3' and 5'-CACGGCAATTCATGGATA-3' and the pair KEGY was: 5'-AAGGAGGGGTATGCTATG-3' and 5'-TTATTTTTTGCCACATCTG-3'. These oligonucleotides were used for the PCR amplifications of the clones obtained from the previous screening with degenerate oligonucleotides, as mentioned above. The protocol for the PCR reaction was: 1 min denaturation at 94°C , 1 min alignment at 50°C , 1 min elongation at 72°C , repeated 30 cycles, in a $50 \mu\text{l}$ total volume of reaction. These PCR conditions were the same for all cloned genes. The products of amplification were cloned in the plasmid pGEM, and sequenced from both ends, as it was described before. The nucleotide sequences obtained in this work are deposited in GeneBank (accession numbers: AY740683 to AY740695).

2.8. Sequence comparison

Sequence comparisons were performed by the program Clustal_X (Thompson et al., 1997). Similarity searches were performed using BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) and FASTA 3 (www.ebi.ac.uk/fasta).

2.9. Electrophysiological experiments

The electrophysiological experiments with *Shaker B* K^+ -channels expressed in Sf9 cells were performed essentially as earlier described (Klaiber et al., 1990). In short, the insect cell line Sf9 was kept in culture at 27 °C in Grace's media from Gibco BRL (Grand Island, NY). The cells were transfected by infection with a recombinant baculovirus containing the cDNA of *Shaker B*, and were used for the experiments 2 days later (Klaiber et al., 1990). Macroscopic currents were recorded under whole-cell patch clamp with an Axopatch-1D (Axon Instruments). The currents were sampled at 100 μ s per point, and filtered in-line at 5 kHz. Leak conductance was subtracted with a P/6 protocol. The electrodes were pulled from borosilicate glass (KIMAX 51) to 1.5–2.0 M Ω resistance; 80% of the series resistance was electronically compensated. The external control solution was (in mM): 145 NaCl, 10 CaCl₂, 10 HEPES-Na buffer, pH 7.2. The internal pipette solution was (in mM): 90 KF, 30 KCl, 10 EGTA, 10 HEPES-K buffer, pH 7.2. The purified dried toxins were dissolved in the external solution, before being added to the recording chamber.

3. Results and discussion

3.1. Separation, biological assays and amino acid sequencing

Fig. 1 shows the HPLC profile obtained from the separation of the soluble venom of *T. costatus*, in which at least 50 different components can easily be observed. These fractions were biologically tested in order to identify possible lethal/toxic components. Most of the fractions eluting between 30 and 42 min were toxic to mice. For example, the fractions labeled with numbers 2–5 in Fig. 1, were all toxic to mice at the doses assayed (using only 20 μ g protein each). All these components were further separated by HPLC, similarly to what is indicated for toxin 1 and 4 (see inset of Fig. 1).

At least 15 different peptides were obtained in homogeneous form and were loaded into the Sequencer for determination of the N-terminal region, as described below. Fig. 2 shows the amino acid sequence of three representative examples of peptides for which the full sequence was obtained: a Butantoxin-like peptide (labeled 1 in Fig. 1 that elutes at 30.58 min), an insect toxin-like peptide (initially elutes as a mixture at 38.32 min, labeled 4 in Fig. 1) and a novel scorpine-like peptide (labeled 6 in Fig. 1 that elutes at 41.46 min). Under rechromatography, component 4 was collected in three separated tubes, labeled 38.32–1, 38.32–2 and 38.32–3. Two of them are clearly seeing in the right inset of Fig. 1. The one completely sequenced is the one labeled 38.32–2. Component 6 of Fig. 1 has an amino acid sequence similar to scorpine earlier reported by our group. Scorpine is a defensin peptide with

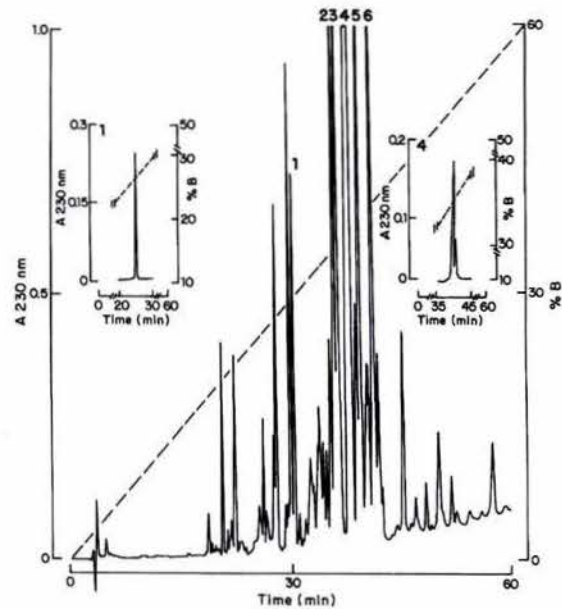


Fig. 1. HPLC separation of *T. costatus* venom. Soluble venom (1 mg protein) from *T. costatus* scorpion was separated in a C18 reverse-phase column, eluted with a linear gradient from 0% solution A (0.12% TFA in water) to 60% solution B (0.10% TFA in acetonitrile) run at a flow rate of 1 ml/min, for 60 min duration, in a Waters 600E HPLC system. Numbers on top of each fraction were used to identify the components described. The inset shows the profile of separation of the sub-fractions 1 and 4, using linear gradients. For both gradients the elution was obtained from 10 to 50% B, run for 60 min at flow rate of 1 ml/min.

antimicrobial activity. It was isolated from the venom of the African scorpion *Pandinus imperator* (Conde et al., 2000). Actually, the scorpine-like peptide described here, also have sequence similarities with scorpion toxins of the family beta (Tytgat et al., 1999), known to affect K^+ -channels (Rogowski et al., 1994).

The Butantoxin-like peptide was directly sequenced using a sample alkylated in situ (Brune, 1992), from which the first 29 amino acid residues were identified. Peptidic fragments obtained by endopeptidase cleavage provided overlapping sequences as indicated in Fig. 2.

The molecular mass found for the native toxin was 4564 a.m.u., and the theoretical mass expected for this sequence was 4564 a.m.u., confirming completion of the full sequence. The amino acid sequence of the insect-like peptide was obtained by a combination of direct Edman degradation and gene cloning, as also indicated in Fig. 2. The molecular mass obtained from the pure peptide was 6566.0 a.m.u. and the theoretical expected value based on the nucleotide sequence was 6566.4 a.m.u., strongly supporting the data reported. The amino acid sequence for the scorpine-like peptide (third sequence) was obtained by using the same strategy, as indicated in Fig. 2. The molecular mass found experimentally for this peptide was

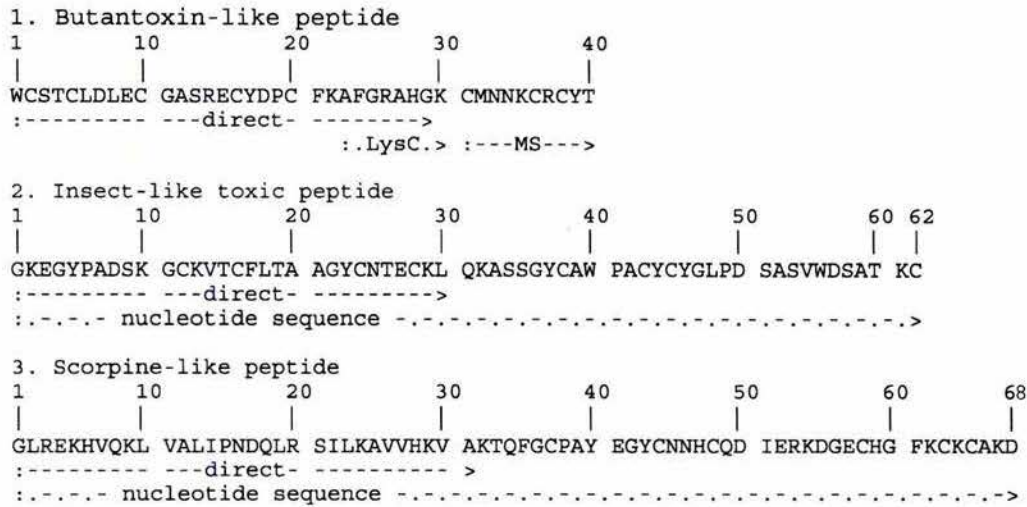


Fig. 2. Complete amino acid sequence peptides. The numbers on top of each sequence indicate the position of each amino acid in the sequence. The Butantoxin-like peptide, number 1 in Fig. 1 (see also inset), underlined by direct meaning this section of the sequence was determined directly by Edman degradation. Two additional segments underlined LysC, were also sequenced after cleavage with endopeptidase LysC. They were separated by HPLC and identified by mass spectrometry analysis (underlabeled MS). The insect-like peptide (initially labeled 38.32–2) was sequenced at the N-terminal segment by direct Edman degradation, and the entire sequence was obtained by superposition of the primary structure with the deduced amino acids obtained from the cloned gene. The third sequence, corresponding to the scorpine-like peptide was sequenced using the same strategy described for the insect-like peptide.

7678.0 a.m.u. and the theoretical expected molecular mass, based on nucleotide sequence, was 7677.91 a.m.u.

Another peptide was fully sequenced (it elutes at 22.40 min as a mixture). This fraction was rechromatographed and allowed to separate a pure peptide, labeled 22.40–1, with only seven amino acids (Fig. 3). It is not clear if it is a bona fide peptide, or a product of degradation, judging by its short amino acid sequence.

Additional to these four full sequences, another 11 peptides were sequenced only at the N-terminal side (due to limitations of sample), as shown in Fig. 3. The peptide slightly toxic to mice, numbered 3 in Fig. 1, corresponds to peptide Tco 36.62 of Fig. 3 with a molecular mass of 6954. Toxic peptide labeled 4 in Fig. 1 was rechromatographed as shown in the inset, and the major component had the N-terminal amino acid sequence shown as Tco38.32–2 in

Peptides	MW	Amino acid sequence						
		1	10	20	30	40	49	
Tco20.72	3467.6	MKPSKPKCGLCRYRCCGGTS						
Tco22.40-1	844.8	LRIGRCK						
Tco26.21	3136.6	XXXRSKLV						
Tco30.58	4564.0	WCSTCLDLECGASRECYDPCFKAFGRAHGKCMNNKCRCYT						
Tco35.00	6077.0	KLHXAKDXIKSGXERLQXE						
Tco35.52	7529.0	KKSGYPVEYKNCAFSCNYSNEY						
Tco36.14-1	N.D.	XDDGYPVEYKNCAFDCNYDNEXCDDL						
Tco36.14-2	6818.0	KRFWRSKLVRRRLRAKQGQLLNEALAPEPKPEPAAPEPAPEPAPEPAA						
Tco36.62	6954.0	KEGYAMDHEGCKFSCFIGPSGFCD						
Tco38.32-2	6566.0	GKEGYPADSKGCKVTCFLTAAGYCNTCKL						
Tco38.32-3	6622.5	GKEGYPADSKGCKVTCFLTAAGYCDT						
Tco39.68-1	6975.0	KEGYLMDHEGCKLSCFIRPSGYCGR						
Tco41.46-1	7345.0	XLAALIPNQQLSINLAVHDHKAXT						
Tco41.46-2	7678.0	GLREKHVQKLVALIPNDQLRSILKAVVHKVA						
Tco42.14	6730.0	KLVALIPNDQLRSILKAVVHKVAKTQFGCPAY						

Fig. 3. N-terminal amino acid sequences of pure peptides. Fifteen peptides were directly loaded in the Sequencer and their N-terminal amino acid sequence determined. The peptides are identified by their time of elution in the HPLC column, preceded by Tco, abbreviation of *T. costatus*. When the peptide was obtained after rechromatography of the main component from Fig. 1, an additional number was added, depending on the number of sub-components obtained. For each peptide the corresponding molecular mass was experimentally determined (see MW). The molecular mass for component 36.14–1 was not determined (ND). The one code letter for the amino acids was used, in which X means undetermined amino acid.

Fig. 3, with a molecular mass of 6566. The N-terminal sequence of toxic peptide number 5 (Fig. 1) is shown as Tco 39.68–1 in Fig. 3, with a molecular mass of 6975 a.m.u. In this manner, several toxic peptides to mice are now identified and have their molecular masses determined and their N-terminal sequence known.

3.2. The mouse lethal component

One of the most relevant findings in terms of human interest was the identification of the component that elutes from the HPLC column at 36.14 min, labeled with number 2 in Fig. 1. This fraction contains more than one component. At least three peptides were found, with molecular masses: 1036.7, 6549.0 and 6818.0 a.m.u. (Table 1). When injected into mouse at 10 µg amounts, it kills the mouse within the first 43 min after injection. When this fraction is subjected to further HPLC separation, two main fractions are obtained (data not shown). The minor component assumed to be lethal to mice was still contaminated and due to scarcity of sample, did not allow the identification of a unique amino acid sequence. However, the major component when injected into mice was non-toxic, but had a very unusual amino acid sequence among all scorpion peptides known to date (Fig. 3). The sequence reach in repeats 'PEPAA' shown in Fig. 3 is unique. The molecular mass found for the peptide was 6818.0 a.m.u. Its function is totally unknown. Due to the presence of repeated amino acid sequences with the motif 'PEPAA' it deserves further investigation, because none of the scorpion venom components previously isolated have a similar sequence. If we compare the sequence of only the first 24 amino acid residues of this peptide with that of a precursor of bradykinin-potentiating peptide from the scorpion *Buthus martensii* (unpublished data of Zheng X.C, Li, W.-X and Zu, S.-Y, deposited in GenBank with accession number AAF99564) it has 54% identity. Similarly, if we compare the same N-terminal region with that of the anti-microbial peptide named parabutoporin, from the scorpion *Parabuthus schlechteri* (Verdonck et al., 2000) the identity is 50%. If we take the full sequence, as shown in Fig. 3, the identity among these peptides are not significant.

3.3. Mass spectrometry analysis of the venom components

Mass spectrometry analysis of each one of the fractions obtained by HPLC, as shown in Fig. 1, indicated the presence of at least 86 different single components in the venom, as shown in Table 1. The data were aligned according to the elution time on the HPLC column. Some fractions were re-purified and when more than one component was found the initial retention time was added by a dash and numbers 1–3 depending on the mixture of sub-peptides separated in the second HPLC column. The molecular masses vary from 413.3 (elution time 20.22 min) to 35482.0 (elution time 45.63 min). Based on these values and the nucleotide sequences obtained from

Table 1
Molecular masses of components from *T. costatus* venom

Retention time	Molecular weight	Retention time	Molecular weight
18.86	966.8; 2413.12	36.62–1	6954.0 ^a ; 7265.0
19.77	3483.3	36.62–2	1067.6; 1692.4
20.22	428.3; 413.3	38.32–1	10942.0
20.72	3467.5 ^a	38.32–2	6566.0 ^a
21.14	628.6	38.32–3	6622.5 ^a
21.95	948.7; 4241.5	39.20	1073.5; 10996.0
22.40	844.8 ^a ; 613.5	39.68–1	6975.0 ^a
23.07	399.3; 457.5;	39.68–2	11218.0
	828.5; 880.4		
23.84	431.3; 499.3;	40.76–1	3688.8
	672.5; 866.1		
25.45	1284.9; 3777.3	40.76–2	10824.0
25.72	676.5; 1095.9	40.76–3	2643.3
26.21	1341.4; 1363.0;	41.46–1	7345.0 ^a
	3136.6 ^a		
26.64	724.5; 809.1;	41.46–2	7678.0 ^a
	2716.0; 4176.6		
27.70	3986.0; 4520.0	42.14–1	1705.9; 6730.0 ^a
28.04	1186.0	42.14–2	1149.5
28.53	803.5; 845.1	42.78	1573.0
29.26	3949.5	44.78	1828.2
29.59	1109.7; 4220.0;	45.63	45482.0
	4541.0		
30.06	4785.0; 5224.0	46.67	14121.0
30.58	4564.0 ^a	47.42	Undetermined
31.27	794.6; 4575.0;	48.80	44952.0
	4619.0		
31.86	2983.4; 5720.9	49.60	Undetermined
32.17	5281	50.59–1	Undetermined
32.80	968.9; 3295.5	50.59–2	Undetermined
33.20	733.4	52.32	Undetermined
33.88	5278.5	53.12	Undetermined
34.08	10732.0	54.88	1732.8
34.54	907.6; 1656.0	56.48	1759.8
35.00	6077.0 ^a	58.06	Undetermined
35.52	7529.0 ^a	63.00	Undetermined
36.14	1016.7; 6549.0;		
	6818.0 ^a		

^a Peptides with the indicated molecular masses were directly sequenced.

gene cloning (see Section 3.4) several components were identified, whose theoretical molecular masses coincide with the experimentally obtained. The number of possible components found in this venom eventually could be slightly underestimated, since the valleys in between the peaks shown in Fig. 1 were not collected and evaluated. But in terms of real natural peptides it might be approximately correct, because some of the components found by mass spectrometry could be the product of degradation during handling, as earlier discussed for the components found in *T. serrulatus* (Pimenta et al., 2001) and *T. cambridgei* (Batista et al., 2004). For other components with high molecular mass it was not possible to determine the exact

molecular weight (labeled 'undetermined' in Table 1). They usually elute at more hydrophobic conditions (end of the HPLC separation in Fig. 1) and because they show a high number of mass/charge peaks produced by the electrospray ionization source it is not always possible to deconvolute the protein 'envelope' either automatically or manually. This means we cannot say which is the exact molecular mass and probably the component is not homogeneous (more than one protein/peptide elutes from the chromatographic separation at those specific retention times).

3.4. Gene cloning

Fig. 4 gives an example of the results obtained by gene cloning. In special, for this clone the degenerate primer Tc10 allowed to select a clone that when amplified with the pair of synthetic oligonucleotides 'VFIN' (see Section 2) permitted to clone the gene, whose sequence is shown in Fig. 4. The deduced amino acid sequence was used to search on data banks for putative peptides coded by this gene. The signal peptide was assumed to be 22 amino acid residues long (single underlined in Fig. 4), based on previous work done with similar precursor peptides (Becerril et al., 1997; Froy et al., 1999; Goudet et al., 2002). The mature peptide corresponding to this gene would have 37 amino acid residues. Another scorpion from the same genus *Tityus*, but species *T. serrulatus* has a peptide named II-9 (Possani et al., 1982), latter renamed Tityustoxin TstxK α (Rogowski et al., 1994), whose sequence similarity is 94% identical to the putative mature peptide of the gene in Fig. 4. The peptide TstxK α was clearly shown to be a K⁺-channel blocker (Rogowski et al., 1994). Another analogous peptide, but from the species *T. cambridgei* has a component named

Tc30, whose sequence is 86% identical to the proposed sequence for the mature peptide coded by this gene, and was also shown to be a K⁺-channel blocker (Batista et al., 2002). If the molecular mass corresponding to the mature region of the peptide of Fig. 4 is calculated, a theoretical value of 3985.85 a.m.u is obtained. In Table 1, a peptide with retention time of 27.70 min has the same expected molecular mass of 3986 a.m.u. Thus the peptide coded for the gene of Fig. 4 is possibly a new member of the subfamily α -KTx 4.x and we propose to call it α -KTx 4.5 (see review Rodríguez de la Vega and Possani, 2004).

Fig. 5 shows several additional clones obtained from this scorpion. In special, for clone 1 the degenerate oligonucleotide Tc6 (see Section 2) was used to select a clone that when amplified with the pair of synthetic oligonucleotides 'KEGY' gave the sequence shown. For all the other clones, only the degenerate oligonucleotides (Tc3–Tc8, see Section 2) were used to select various probes. With these positive probes the screening by hybridization of the library permitted to obtain the other 12 clones reported in Fig. 5. For these clones the exact mature peptide was not identified. There is no indication on the length of the corresponding signal peptides, in fact, they are all precursor sequences. Nevertheless, if we compare the possible mature peptides coded by the genes of Fig. 5 with the real data obtained from directly sequencing the actual peptides (Fig. 3) several interesting results can be found and discussed. Clone 1 was the only one obtained without the signal peptide sequence, for the reasons described above. This sequence is 82% identical to toxin Tst1 from *T. stigmurus* (Becerril et al., 1996) and 93% identical to the precursor of gamma toxin from *T. serrulatus* (Possani et al., 1981, 1991; Bechis et al., 1984). Due to the high identity score with the other potent

```

      10          30          50
1  ATG AAA GCT TAC TAC GGT GTA CTG ATC ATA TTT ATT TTA ATT TCG ATG CTG GAT TTG AGC
   M  K  A  Y  Y  G  V  L  I  I  F  I  L  I  S  M  L  D  L  S  20

      70          90          110
21 CAG CAA GTT TTT ATA AAT GTA AAA TGT AGA GGA TCG CCT GAG TGT TTG CCG AAG TGT AAA
   Q  Q  V  F  I  N  V  K  C  R  G  S  P  E  C  L  P  K  C  K  40

      130          150          170
41 GAA GCA ATA GGG AAG TCG GCC GGC AAA TGT ATG AAC GGT AAA TGC AAA TGT TAT CCA TGA
   E  A  I  G  K  S  A  G  K  C  M  N  G  K  C  K  C  Y  P  end 60

      193          218          243
gattgccgtgaaagagatcaaatcattgtgaactgtttatgaaaaacgtgttgataatttactgctaataatat
      268          293          318
tataatgaaaatttaagaacagagtaataagacattggtttaaaattttgataatgtaaaatttctacattactt
      343          368
tcttcaataaaatttttaagtaagcgaaaaaataaaataaaataaaataaaataaaataaaataaaataaaataaa

```

Fig. 4. Nucleotide sequence of clone 3. When using the pair of oligonucleotides VFIN (see Section 2) here double underlined, a segment of clone 3 was obtained, allowing to search in the cDNA library the full sequence shown in this figure (by hybridization techniques). A nucleotide sequence containing 382 pair of bases was obtained (labeled by numbers at the top of the sequence). The deduced amino acid sequence is shown in capital letters, below each codon (the corresponding positions are labeled in both margins of the figure). The single underlined sequence is the putative signal peptide, from amino acid -1 to -22. The small letters stands for the 3'-untranslated sequences. The bold letters indicate the assumed poly-adenylation site (aataaa).

Clone	Amino acid sequence
Clone1	KEGYAMDHEGCKLSCFIRPSGYCGRECGYKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKVWERATNRCGKK
Clone2	MHFGVVLILLSMTLVNFVETKVKVETGQYVKCKYDCAKSCQEEKGKRTGFCSNPECICSKD
Clone3 ^a	MKAYYGVLIIFILISMLDLSQQVFINVKCRGSPCELPKCKEAIKGSAGKCMNGKCKCYP
Clone4	MQMKYLIPIFFLVLIVADHCHAFGLMIPGLIGGLISAFKGRKRKRDITSQIEQYRNLOKREAELEDILANLPVY
Clone5	MQIKHLITLFFLVLIVADQCSAFFSLIPSLIGGLVFAIKGRKKREVS P IDQYRN F OKREAELEELDLRLPMY
Clone6	MQIKHLITLFFLVLIVADQCSAFFSLIPSLIGGLVSAIKGRKKRE ISTQ IDQYRN L OKREAELEELDLRLPMY
Clone7	MVSKSLIVLLVSVLSTFFFT GAYPTS YDDDFDALDDLDLDDLLD L EPADLVLLDMWANMLDSQDFEDFE
Clone8	MVSKSLIVLLVSVLSTFFFT EAYPAS YDDDFDALDDLDLDDLLD L EPADLVLLDMWANMLDSQDFEDFE
Clone9	MVSKSLIVLLVSVLSTFFFT EAYPAS YDDDFDALDDLDLDDLLD S EPADLVLLDMWANMLDSQDFEDFE
Clone10	MVSKSLIVLLVSVLSTFFFT EAYPAS YD G DFDALDDLDLDDLLD L EPADLVLLDMWANMLDSQDFEDFE
Clone11 ^b	MKRMLFTSCLLLIDIVVGGKEGYPADSKGCKVTCFLTAAGYCNTCKLQKASSGYCAWPACYCYGLPDSASVWDSATNCKGKK
Clone12 ^c	MERKLAPLFLGMVTLASCGLREKHVQKLVALIPNDQLRSILKAVVHKVAKTQFGCPAYEGYCNHCDIERKDGECHGFCKCAKD
Clone13 ^c	MERKLALLLFLGMVTLASCGLREKHVQKLVALIPNDQLRSILKAVVHKVAKTQFGCPAYEGYCNHCDIERKDGECHGFCKCAKD

Fig. 5. Clones obtained from the cDNA library. Thirteen clones were obtained using the same strategy mentioned in Fig. 4, but with the oligonucleotides described in Section 2. Here only the deduced amino acid sequences are shown (data are deposited in the GenBank, see Section 2). Superscript letter a means stands for the sequence of the clone shown in Fig. 4, for which a peptide of the expected molecular mass was found at the elution time 27.70 min. Letter b corresponds to the peptide eluting at 38.32–2 min, whose N-terminal sequence is in Figs. 2 and 3. Letter c, corresponds to either one of the two retention times 41.46–2 and 42.14 min shown in Fig. 3 (see Section 3). The amino acids in bold correspond to equivalent positions occupied by distinct residues.

mammalian toxins of the venom from *Tityus* genus, it certainly code for a mammalian toxin present in *T. costatus* venom. Clone 2 is a typical precursor that code for a cysteine-rich peptide, certainly a variant of a toxic peptide from this venom. Clone 3 was discussed above (see Fig. 4). Clones 4–6 are an interesting case, because they code for possible mature peptides without cysteine residues, but presenting 47% identity with an anti-microbial-like peptide found in the scorpion *Mesobuthus martensii*. They are respectively 48, 58 and 60% identical to the protein BmK1 from *B. martensii*, (Zeng et al., 2004).

The clones 7–10 are highly identical, with only four differences in the full sequence (amino acids shown in bold). They are all precursors of peptides that contain an unusual content of acidic amino acids. Peptides with these characteristics were not reported before, except for some genes cloned from the scorpion *B. martensii* (Goudet et al., 2002; Zeng et al., 2004). The function of these peptides is not known. The clone 11 codes for the peptide Tco 38.32–2, which in its mature form does not present the last three residues (GKK) found in the nucleotide sequence. The mature peptide is certainly processed, like other scorpion toxins (Becerril et al., 1997; Possani et al., 1999), and produces a C-terminal amino acid amidated (cysteine in this case). In fact, the molecular mass found was 6566.0 and that expected was 6566.41.

Finally, one of the most interesting findings is the case of clones 12 and 13. The amino acid sequence of Tco 41.46–2 and Tco 42.14 of Fig. 3 correspond to clones 12 and 13 of Fig. 5. Clones 12 and 13 differ in only one position (number 7) at the precursor level. In clone 12 there is a proline, whereas in clone 13 there is a leucine, otherwise they are identical. Searching for similar sequences among components of other scorpions, a 43% identity was found with scorpine, an antibacterial agent, isolated from *Pandinus imperator* scorpion venom

(Conde et al., 2000), and 64% identity with the putative potassium channel blocker TXKbeta2' from the scorpion *B. martensii* (Goudet et al., 2002; Zhu et al., 1999). The interesting finding is that the N-terminal amino acid sequence of peptide Tco 41.46–2 (Fig. 3) initiates with GLREKHVQKLVALIP... sequence, equivalent to the position where scorpine starts, whereas the peptide Tco 42.14 (Fig. 3) starts at KLVALIP..., which is identical to the same sequence but starting at position 9 of the scorpine-like peptide. The theoretical molecular masses expected for both peptides based on the nucleotide sequence of Fig. 5 are 7677.91 a.m.u for the first and 6729.81 a.m.u for the second. The molecular masses experimentally found are 7678 and 6730 a.m.u. respectively, supporting the interpretation that the complete sequence of the mature peptides are the same as those found for the cloned genes. However, it seems that clone 12 and 13 code for identical mature peptides, one starting at –9 position of the other. In other words, it suggests that the same gene can code for two different mature peptides, one with 68 amino acid residues and the other with 60 residues. If that is the case, the second peptide could arise by a genetically controlled enzymatic processing of the precursor peptide. It is worth observing the amino acid differences at the signal peptide level. Furthermore, we do not know how similar these two clones (12 and 13) could be at the most 5'-up-stream region, where many signals controlling expression and/or processing are located (Zhu and Tytgat, 2004). A non-specific cleavage at lysine in position 9 is another possible explanation for the results found. None of these two possibilities can be ruled out at this moment. However, judging by the similarities found in other scorpion venom components, it seems that both analogs do exist independently.

3.5. Electrophysiological action of Butantoxin-like toxin

When the amino acid sequence of the first peptide (see Fig. 2) was compared to literature data it was found a high degree of similarity (around 97% identity) with butantoxin, earlier published (Holaday et al., 2000; Coronas et al., 2003). For this reason we called it butantoxin-like peptide, abbreviated Tco30 in Fig. 6. The only amino acid change is the glutamic acid in position 9, which is alanine in Butantoxin (Holaday et al., 2000). It was then tempting to verify if this peptide was capable of blocking the potassium currents in the *Shaker B* K⁺-channel, as earlier shown for butantoxin (Coronas et al., 2003).

Fig. 6A shows K⁺ currents through *Shaker B*. The channels were activated by stepping the membrane from -30 to -70 mV, in 10 mV increments from -80 mV. The traces in the left panel present the control currents recorded every

other pulse. The subsequent addition of 2.6 μM Tco30 to the external solution, indeed, inhibited the channels (see Section 2), producing a decrease of the amplitude of the currents of ~44% (middle panel). The following superfusion of the cells with the control external solution revert the inhibition of the channels (right panel). Fig. 6B shows the complete I–V relationship of the experiment in A. See that Tco30 inhibited about the same fraction of channels at each voltage, and that its effect was completely eliminated after washing the cells with the external solution. The average inhibition of the channels at two different concentrations of Tco30 is presented in Fig. 6C. The results suggest that Butantoxin-like (Tco30) inhibits the channels with a K_d of ~3 μM, less efficient than Butantoxin, whose K_d is 0.66 μM, when assayed in the same system (Coronas et al., 2003). However, both peptides are considered to have a mild effect on the *Shaker B* K⁺-channel, because most

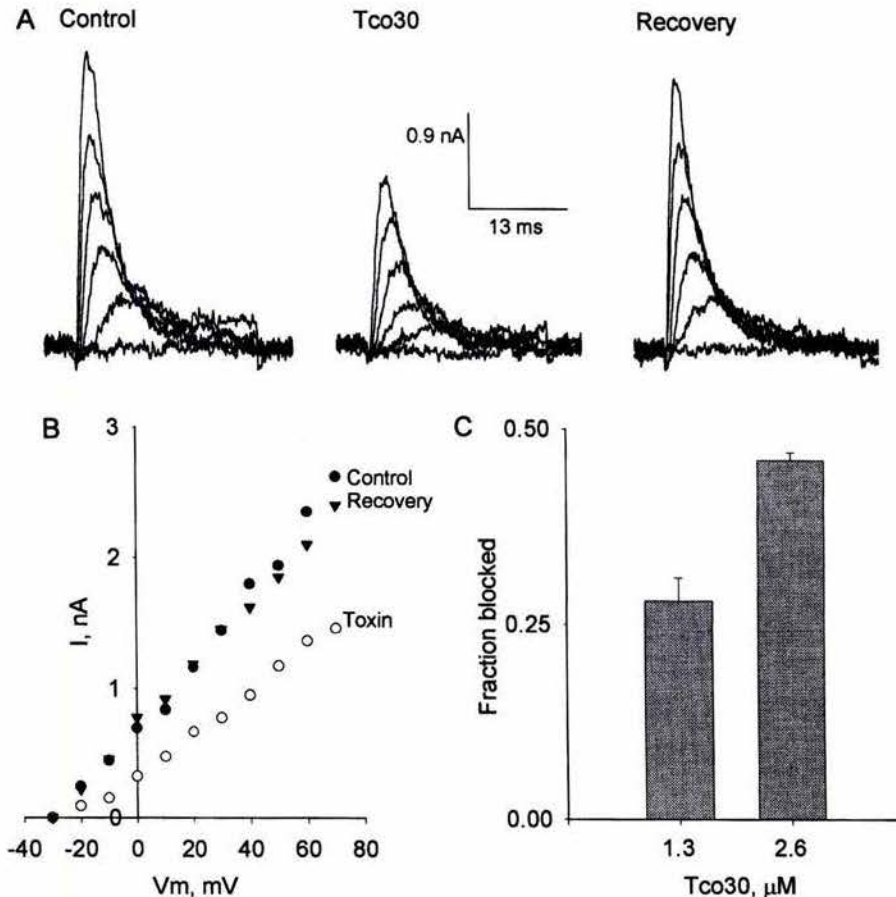


Fig. 6. Butantoxin-like peptide inhibits *Shaker B* K⁺ channels. (A) K⁺ currents evoked by stepping the membrane from -30 to +70 mV in 20 mV increments from the holding potential of -80 mV. The pulses were applied every 40 s. The left panel shows the control currents. The middle panel presents the currents left in the presence of 2.6 μM Tco30 (abbreviated here from Tco30.58), as indicated. The right panel shows the currents after washing the cell with the external solution. (B) Complete I–V relationship of the traces in A (see Text). (C) Fraction of channels blocked at the indicated [Tco30]. The points are the mean ± SEM of 4 experiments at each concentration. Fraction blocked = $1 - (I_{Tco30}/I_{control})$. I, means the current at 0 mV in either the control or with Tco30, as indicated.

bona fide scorpion toxins that are inhibitors of K⁺-channels do so at nanomolar range concentration (Rodríguez de la Vega and Possani, 2004).

3.6. Comparative analysis of *T. costatus* venom with other known scorpion peptides

As discussed above, several of the peptides found in the venom of *T. costatus* have similar representatives in other scorpion venom components, mainly from the Brazilian species of *Tityus* studied (Marangoni et al., 1990; Rogowski et al., 1994; de Lima and Martin-Eauclaire, 1995; Becerril et al., 1997; Chavez-Olortegui et al., 1997). Except for the peptide with reach repeated 'PEPAA' motifs, the scorpine-like and the insect-like peptides, most of the sequences found are consistent with the presence of mammalian specific toxins. The amino acid sequences directly determined for several peptides (see Fig. 3), such as Tco 35.32, Tco 36.14, Tco 36.62, Tco39-68 and the peptides coded by the precursors Clone 1, 2, 3 and 11 (see Fig. 5) have very similar peptides in terms of their amino acid sequence, as the classical known scorpion toxins from other scorpion venoms. The best example is the case of the putative peptide coded by clone 1, which has over 90% identity compared to toxin gamma (Ts1) from *T. serrulatus*. This toxin is one of the best studied toxins from *Tityus* genus, because it was sequenced (Possani et al., 1981, 1991; Bechis et al., 1984), studied physiologically (Lombet and Lazdunski, 1984; Kirsh et al., 1989), and even its three-dimensional structure is already solved (Polikarpov et al., 1999). Thus, it should not be surprising that serious health accidents can occur when this species of scorpion stings humans, confirming the description mentioned in the introductory section of the paper.

Acknowledgements

The authors are indebted to Mr Fredy I.V. Coronas, M.C. Timoteo Olamendi-Portugal, Dr Fernando Zamudio and Miss Patricia Salas for technical assistance. Readings of this manuscript by Dr Ricardo C. Rodríguez de la Vega is acknowledged. This work was supported in part by grants number 40251-Q from the National Council of Science and Technology (Mexican Government), and IN206003-3 from the *Dirección General de Asuntos del Personal Académico* of the National Autonomous University of Mexico, awarded to L.D.P.

References

- Batista, C.V.F., del Pozo, L., Zamudio, F.Z., Contreras, S., Becerril, B., Wanke, E., Possani, L.D., 2004. Proteomics of the venom from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of prolines on mass spectrometry analysis. *J. Chromatogr. B* 803, 55–66.
- Batista, C.V.F., Gómez-Lagunas, F., Rodríguez de la Vega, R.C., Hadju, P., Panyi, G., Gáspár, R., Possani, L.D., 2002. Two novel toxins from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* that block Kv1.3 and Shaker B K⁺-channels with distinctly different affinities. *Biochim. Biophys. Acta* 1601, 123–131.
- Becerril, B., Corona, M., Coronas, F.I.V., Zamudio, F.Z., Calderon-Aranda, E.S., Fletcher Jr., P.L., Martin, B.M., Possani, L.D., 1996. Toxic peptides and genes encoding gamma toxin of the Brazilian scorpions *Tityus bahiensis* and *Tityus stigmurus*. *Biochem. J.* 313, 753–760.
- Becerril, B., Marangoni, S., Possani, L.D., 1997. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*: a review. *Toxicon* 35, 821–835.
- Bechis, G., Sampieri, F., Yuan, P.M., Brando, T., Martin, M.F., Diniz, C.R., Rochat, H., 1984. Amino acid sequence of toxin VII, a beta-toxin from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122, 1146–1153.
- Brune, D.C., 1992. Alkylation of cysteine with acrylamide for protein sequence analysis. *Anal. Biochem.* 207, 285–290.
- Chavez-Olortegui, C., Kalapothakis, E., Ferreira, A.M., Ferreira, A.P., Diniz, C.R., 1997. Neutralizing capacity of antibodies elicited by a non-toxic protein purified from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon* 35, 213–221.
- Chavez-Olortegui, C., Molina, F., Granier, C., 2002. Molecular basis for the cross-reactivity of antibodies elicited by a natural anatoxin with α - and beta-toxins from the venom of *Tityus serrulatus* scorpion. *Mol. Immunol.* 38, 867–876.
- Conde, R., Zamudio, F.Z., Rodríguez, M.H., Possani, L.D., 2000. Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Lett.* 471, 165–168.
- Coronas, F.V., de Roodt, A.R., Olamendi-Portugal, T., Zamudio, F.Z., Batista, C.V., Gómez-Lagunas, F., Possani, L.D., 2003. Disulfide bridges and blockage of Shaker B K⁺-channels by another butantoxin peptide purified from the Argentinean scorpion *Tityus trivittatus*. *Toxicon* 41, 173–179.
- Dauplais, M., Lecoq, A., Song, J., Cotton, J., Jamin, N., Gilquin, B., Roumestand, C., Vita, C., de Medeiros, C.L., Rowan, E.G., Harvey, A.L., Menez, A., 1997. On the convergent evolution of animal toxins. Conservation of a diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structures. *J. Biol. Chem.* 272, 4302–4309.
- de Lima, M.E., Martin-Eauclaire, M.F., 1995. The toxins purified from *Tityus serrulatus* (Lutz and Mello) venom. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 14, 457–481.
- Froy, O., Sagiv, T., Poreh, M., Urbach, D., Zilberberg, N., Gurevitz, M., 1999. Dynamic diversification from a putative common ancestor of scorpion toxin affecting potassium, sodium and chloride channels. *J. Mol. Evol.* 48, 187–196.
- Gordon, D., Gilles, N., Bertrand, D., Molgo, J., Nicholson, G.N., Sauviat, M.P., Shichor, I., Lotan, I., Gurevitz, M., Kallen, R.G., Heinemann, S.H., 2002. Scorpion toxins differentiating among neuronal sodium channel subtypes: nature's guide for design of selective drugs, in: Menez, A. (Ed.), *Perspectives in Molecular Toxicology*. Wiley, Chichester, pp. 215–238.
- Goudet, C., Chi, C-W., Tytgat, J., 2002. An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Toxicon* 40, 1239–1258.
- Gurevitz, M., Froy, O., Zilberberg, N., Turkov, M., Strugatsky, D., Vilunsky, R., Gilles, N., Anglister, J., Shaanan, B., Pelhate, M., Adams, M.E., Gordon, D., 2002. Diversification of toxic sites on

- a conserved protein scaffold: a scorpion recipe for survival, in: Menez, A. (Ed.), *Perspectives in Molecular Toxinology*. Wiley, Chichester, pp. 239–253.
- Holaday Jr., S.K., Martin, B.M., Fletcher Jr., P.L., Krishna, N.R., 2000. NMR solution structure of butantoxin. *Arch. Biochem. Biophys.* 379, 18–27.
- Karsch, F., 1879. Scorpionologische Beiträge. II. Mitt. Münch. Ent. Ver. 3, 97–136.
- Kirsh, G.E., Skattebol, A., Possani, L.D., Brown, A., 1989. Modification of Na⁺ channel gating by an alpha scorpion toxin from *Tityus serrulatus*. *J. Gen. Physiol.* 93, 67–83.
- Klaiber, K., Williams, N., Roberts, T.M., Papazian, D.M., Jan, L.Y., Miller, C., 1990. Functional expression of Shaker K⁺ channels in a baculovirus-infected insect cell line. *Neuron* 5, 221–226.
- Legros, C., Oughuideni, R., Darbon, H., Rochat, H., Bougis, P.E., Martin-Eauclaire, M.F., 1996. Characterization of a new peptide from *Tityus serrulatus* scorpion venom which is a ligand of the apamin-binding site. *FEBS Lett.* 390, 81–84.
- Lombet, A., Lazdunski, M., 1984. Characterization, solubilization, affinity labeling and purification of the cardiac Na⁺ channel using *Tityus* toxin gamma. *Eur. J. Biochem.* 141, 651–660.
- Lourenço, W.R., 2002. *Scorpions of Brazil*. Les Éditions de l'If. Paris, 307 pp.
- Marangoni, S., Ghiso, J., Sampaio, S.V., Arantes, E.C., Giglio, J.R., Oliveira, B., Frangione, B., 1990. The complete amino acid sequence of toxin TsTX-VI isolated from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *J. Prot. Chem.* 9, 595–601.
- Martin-Eauclaire, M.F., Couraud, F., 1995. Scorpion neurotoxins: effects and mechanisms, in: Chang, L.W., Dyer, R.S. (Eds.), *Handbook on Neurotoxicology*. Marcell Dekker Inc, New York, pp. 683–716.
- Martin-Eauclaire, M.F., Ceard, B., Ribeiro, A.M., Diniz, C.R., Rochat, H., Bougis, P.E., 1992. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of the cDNA encoding the main β -neurotoxin from the venom of the South American scorpion *Tityus serrulatus*. *FEBS Lett.* 302, 220–222.
- Pimenta, A.M., Stocklin, R., Favreau, P., Bougis, P.E., Martin-Eauclaire, M.F., 2001. Purification, amino-acid sequence and partial characterization of two toxins with anti-insect activity from the venom of the South American scorpion *Tityus bahiensis* (Buthidae). *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 15, 1562–1572.
- Polikarpov, I., Sanches, M., Maragoni, S., Toyama, M.H., Teplyakov, A., 1999. Crystal structure of neurotoxin Ts1 from *Tityus serrulatus* provides insights into the specificity and toxicity of scorpion toxins. *J. Mol. Biol.* 290, 175–184.
- Possani, L.D., Martin, B.M., Mochca-Morales, J., Svendsen, I., 1981. Purification and chemical characterization of the major toxins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. *Carlsberg Res. Commun.* 46, 195–205.
- Possani, L.D., Martin, B., Svendsen, I., 1982. The primary structure of noxiustoxin: a K⁺ channel blocking peptide purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius*. *Carlsberg Res. Commun.* 47, 285–289.
- Possani, L.D., Martin, B.M., Fletcher, M.D., Fletcher Jr., P.L., 1991. Discharge effect on pancreatic exocrine secretion produced by toxins purified from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *J. Biol. Chem.* 266, 3178–3185.
- Possani, L.D., Becerril, B., Delepierre, M., Tytgat, J., 1999. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *Eur. J. Biochem.* 264, 287–300.
- Possani, L.D., Merino, E., Corona, M., Bolivar, F., Becerril, B., 2000. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. *Biochimie* 82, 861–868.
- Rodríguez de la Vega, R.C., Possani, L.D., 2004. Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. *Toxicon* 43, 865–875.
- Rogowski, R.S., Krueger, B.K., Collins, J.H., Blaustein, M.P., 1994. Tityustoxin K alpha blocks voltage-gated noninactivating K⁺ channels and unblocks inactivating K⁺ channels blocked by alpha-dendrotoxin in synaptosomes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91, 1475–1479.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876–4882.
- Tytgat, J., Chandy, K.G., Garcia, M.L., Gutman, G.A., Martin-Eauclaire, M.F., Van del Walt, J.J., 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.
- Verdonck, F., Bosteels, S., Desmet, J., Moerman, L., Noppe, W., Willems, J., Tytgat, J., Van der Walt, J., 2000. A novel class of pore-forming peptides in the venom of *Parabuthus schlechteri* Purcell (Scorpions: Buthidae). *Cimbebasia* 16, 247–260.
- Yatani, A., Kirsh, G.E., Possani, L.D., Brown, A.M., 1988. Effects of two new world scorpion toxins on single channel and whole cell cardiac sodium channels. *Am. J. Physiol.* 254, H443–H451.
- Zeng, X.-C., Wang, S.-X., Zhu, Y., Zhu, S.-Y., Li, W.-X., 2004. Identification and functional characterization of novel scorpion venom peptides with no disulfide bridge from *Buthus martensii* Karsch. *Peptides* 25, 143–150.
- Zhu, S., Tytgat, J., 2004. The scorpine family of defensins: gene structure, alternative polyadenylation and fold recognition. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 1751–1763.
- Zhu, S., Li, W., Zeng, X., Jiang, D., Mao, X., Liu, H., 1999. Molecular cloning and sequencing of two short chain and two long chain K(+) channel-blocking peptides from the Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. *FEBS Lett.* 457, 509–514.

4.2 Comentarios adicionales y datos no publicados

Este trabajo se realizó con una cantidad de material del orden de cinco miligramos de veneno extraídos de un número reducido de alacranes (cinco ejemplares vivos). Para la caracterización genómica se contó con un ejemplar vivo de *T. costatus*. Por esto fue importante optimizar el uso del veneno disponible. Esto significó que el uso de los componentes purificados para la secuenciación directa, análisis de masa molecular y ensayos biológicos fue eficiente. Sin embargo, la cantidad obtenida de los componentes purificados fue el principal limitante para completar las secuencias peptídicas correspondientes a las 90 distintas masas moleculares (413 a 45,482 u.m.a.) obtenidas por espectrometría de masas y para los ensayos biológicos (sección de datos no publicados). Las secuencias de aminoácidos obtenidas por secuenciación directa fueron pieza importante en la estrategia para la obtención de las clonas en el banco de cDNA.

La similitud de la secuencia de aminoácidos derivada de las clonas obtenidas mostró la composición clásica de las toxinas bloqueadoras de canales de sodio, potasio y de componentes antimicrobianos. Se aislaron 14 clonas distintas a partir del banco de cDNA de telson de *T. costatus*. Las 14 clonas encontradas corresponden a dos clonas de toxinas de sodio (clonas 1 y 11), cuatro toxinas para canal de potasio (clonas 3, 12, 13 y 14) y ocho secuencias correspondientes a péptidos con actividades no conocidas o con similitud a componentes antimicrobianos (clonas 2, 4-11).

Los datos obtenidos en los análisis proteómico y genómico complementaron la información de algunos de los componentes del veneno, además de proporcionar datos sobre la actividad biológica o el efecto sobre canales iónicos que se resumen en la tabla 3. Los nombres asignados a cada componente se basan en la similitud de secuencia con otros componentes descritos en los datos publicados de este trabajo.

Tabla 3. Información integrada de algunos componentes del veneno de *T. costatus*.

Nombre del componente	Componente (RT)	WM	Secuencia directa (No. de aa)	Secuencia nucleotídica (No. de aa)	Secuencia madura completa	Toxicidad
VFIN toxina	Tco27.70	3986.0	-	Clona 3 (59)	37aa	Canal <i>Shaker</i> (-)
Butantoxina	Tco30.58	4564.0	WCSTC...(40)	-	40aa	Canal <i>Shaker</i> (+)
KIK toxina	Tco33.88	5279.0	KIKSG...(29)	Clona 14 (47)	47aa	nd
Insect toxin	Tco38.32-2	6566.0	GKEGY...(30)	Clona 11(84)	62aa	Grillo (-)
Scorpine-like	Tco41.46-2	7678.0	GLREK...(31)	Clona 12, 13 (87)	68aa	<i>E. coli</i> (-)
K' long chain	Tco42.14	6730.0	KLVAL...(32)	Clona 12, 13 (87)	60aa	<i>B. subtilis</i> (-)

El valor otorgado para el símbolo en los diversos experimentos es: -, no obtenido; + sí obtenido; nd, no determinado; el número de aminoácidos entre paréntesis se refiere a la región correspondiente a la región secuenciada de manera directa a la secuencia completa que incluye el péptido señal.

denominada TcoKIK. Esta secuencia pertenece al componente Tco33.88. La secuencia directa del péptido fue determinada hasta el residuo 29 (figura 4). La masa molecular experimental corresponde a los valores generados por MS/MS determinada en 5279.0, mientras que la masa teórica fue estimada en 5278.12 unidades de masa atómica.

```

1           10           20           30           40           47
•           •           •           •           •           •
KIKSGWERLTSESEYACPAIDKFCEDHCAAKKAVGKCDDFKNCIKL
:----- secuencia nucleotidica ----->
:---- secuencia directa ---->

```

Figura 4. Secuencia completa de aminoácidos del péptido TcoKIK (posible toxina de cadena larga moduladora de canales de potasio) derivada de la secuencia nucleotídica obtenida del banco de cDNA. La secuencia directa fue obtenida por degradación de Edman, se indica en la parte baja de la figura.

La estrategia previamente mencionada para la obtención de clonas provenientes del banco de cDNA fue utilizada para la obtención de la secuencia nucleotídica. Se diseñaron los oligonucleótidos degenerados en el extremo N-terminal: Tc3 5'-AAR ATY AAR AGY GGN TGG GAR CG-3' y Tco4.8 5'-AAA ATC AAG AGT GGG TGG GAA-3', que en conjunto con el oligonucleótido CDIII (CLONTECH Lab) del extremo C-terminal permitieron la obtención de la secuencia. La secuencia TcoKIK muestra homología con toxinas bloqueadoras de canales de potasio, presenta una identidad del 68% con la secuencia de TXK β , posible toxina de canales de potasio de cadena larga y una identidad del 44% con la toxina TXK β 2 reportada como toxina de canal de potasio de cadena larga (figura 5B). La similitud con estas secuencias es interesante, sin embargo, es necesaria la caracterización fisiológica de los efectos de la toxina ya que por sus características puede representar una nueva familia de toxinas para canales de potasio reportada para el género *Tityus*.

```

1           10           20           30           40           50           60
•           •           •           •           •           •           •
TcoKIK -----KIKSGWERLTSESEYACPAIDKFCEDHCAAKKAVGKCDDFKNCIKL-----IKL--
TxK $\beta$    KNIKEKLTE--VKDKMKHSWNKLTSMSEYAVVIEKWEEEAAPAIKEDTEK-----LKLRK
TxK $\beta$ 2  KLVKYAVPEGLRTIIQTAVHKIG-KTQFGAYQGYDIEQDIEEEEFHGFKKKGIPMGF

```

Figura 5. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos KIKtoxina deducida de la secuencia nucleotídica obtenida a partir del cDNA de *T. costatus*. El alineamiento muestra las identidades con toxinas de cadena larga de canales de potasio Txk β (AAL58197) y Txk β 2 (AAF31479) del alacrán *Mesobuthus martensii*. Los números superiores indican el residuo tomando como referencia la secuencia de mayor tamaño.

La carencia de péptido nativo nos llevo a sintetizar el péptido por vía química, el cual fue obtenido por la Dra. Gurrola en nuestro laboratorio. Sin embargo, los

problemas en el plegado del péptido sintético en la formación de puentes disulfuro no permitieron que se llevaran a cabo los ensayos biológicos.

Efecto de los componentes del veneno de *T. costatus*

Componentes tóxicos a ratón

La fracción Tco36.14 mostró efectos tóxicos y letales al ser inyectada en ratón por lo que este dato fue incluido en la publicación (Diego-García et al., 2005).

Las fracciones ensayadas Tco36.62 y Tco39.81 fueron tóxicas a ratón pero sólo causaron síntomas de envenenamiento como diarrea, salivación y convulsiones, sin llegar a ser letales.

La fracción Tco38.32 no mostró efectos de toxicidad en ratón. Una vez secuenciado este componente, dada su similitud con componentes tóxicos para insectos fue probada en grillos.

Componentes tóxicos a insectos

El péptido correspondiente al componente Tco38.32-2, mostró similitud con toxinas de canales de sodio tóxicas a insectos (figura 6), por lo que se denominó péptido "insect-toxin like", esta secuencia presentó identidad de 91% y 80% con las toxinas Tf4 y TbIT-I respectivamente. Los ensayos de actividad insecticida fueron realizados en grillos, sin embargo, el componente Tco38.32-2 en cantidad de 6 µg no fue tóxico (no se observaron síntomas de intoxicación o parálisis en estos insectos).

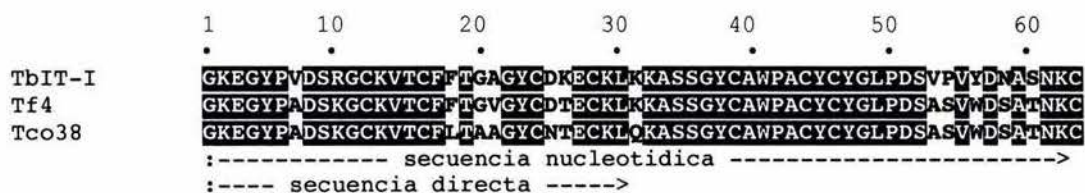


Figura 6. Comparación de secuencias con el péptido Tco38.32-2 (Tco38, abreviado "insect-toxin like") y la secuencia de aminoácidos completa correspondiente a la secuencia deducida de la clona 11 proveniente del banco de cDNA de *T. costatus*. Tf4, neurotoxina de *T. fasciolatus* (Wanger et al., 2003); TbIT-I, toxina de *T. bahiensis* toxica a insectos (Pimenta et al., 2001); la parte baja en líneas indican la secuencia del péptido obtenida de manera directa del componente Tco38 y la secuencia de aminoácidos deducida de la clona 11.

Componentes con actividades no descritas

La obtención de secuencias de aminoácidos y nucleótidos con homología a componentes antimicrobianos descritos en la literatura permitió la identificación y consecuente re-cromatografía para purificación de un componente con posible

actividad antibacteriana. Este componente presentó similitud con la defensina *Scorpine* de *P. imperator* (Conde et al., 2000), por lo que fue llamado péptido scorpine-like (figura 7). El péptido scorpine-like (Tco41.46-2) no mostró actividad biológica en los cultivos de *E. coli* y *B. subtilis* (0.5 y 2.0 µg).

```

      1      10      20      30      40      50      60      70
      .      .      .      .      .      .      .      .
Scorpi G W I N E E K I Q K K I D E R M G N T V L G G M A K A I V H K M A K N E F Q C M A N M D M L G N C E K H C Q T S G E K G Y C H G T K C K C G T P L S Y
Tco41  G L R E K H V - Q K L V A L I - P N D Q L R S I L K A V V H K V A . . .
      :-----secuencia directa ----->

```

Figura 7. Alineamientos de la secuencia peptídica del componente del veneno Tco41.46-2 (abreviado como Tco41) con la defensina *Scorpine* de *P. imperator* (*Scorpi*).

VI. DISCUSION

***Tityus costatus* : Genes, peptidos y función**

El análisis de los componentes realizados en nuestro trabajo demostró que el veneno de *T. costatus* presenta componentes tóxicos a mamíferos, se observó la existencia de componentes homólogos a toxinas moduladoras de canales de sodio y potasio, además de componentes con posible actividad antimicrobiana.

La búsqueda de clonas en el banco de cDNA permitió encontrar 14 genes a partir de una selección de alrededor de 500 clonas. Algunas de las secuencias obtenidas correspondieron a variantes que mostraron la misma secuencia madura correspondiente a los péptidos de veneno o a las 14 clonas reportadas. Esto significó una eficiencia mayor en nuestro sistema con respecto a la obtenida para *T. serrulatus* (Martin-Euclaire et al., 1992), donde se obtuvieron 24 clonas positivas de 2,000 clonas a partir de la búsqueda por métodos de hibridación equivalentes a los empleados en este trabajo.

La amplificación de secuencias con baja identidad a las secuencias de DNA utilizadas como sondas específicas puede deberse a la abundancia de estos mensajeros y a la baja severidad utilizada durante las técnicas de hibridación tipo Southern. Es importante mencionar que la búsqueda dirigida en la librería de cDNA en condiciones de hibridación con baja astringencia, nos permitieron encontrar secuencias de menor tamaño que codifican péptidos pequeños y nuevas secuencias que no presentaron similitud con la secuencias depositadas en las bases de datos. Aunque nuestra estrategia restringe la búsqueda de secuencias nucleótídicas (por el uso de sondas específicas), se obtuvieron nuevos componentes no descritos que presentaron homología con posibles componentes antimicrobianos. Este resultado demostró que el uso de diferentes temperaturas de hibridación en nuestra búsqueda de clonas fue clave para la obtención de las nuevas secuencias (baja severidad).

Toxinas de canales de sodio

La toxina bloqueadora de canales de sodio, Ts1 del alacrán *T. serrulatus*, es considerada uno de los componentes más activos del veneno de esta especie (Nunan et al., 2004). Esta toxina presenta péptidos homólogos en otras especies del género *Tityus*. En nuestro trabajo encontramos secuencias que correspondieron a dos toxinas de canal de sodio (clonas 1 y 11), con identidad mayor al 90% con Ts1. Las secuencias encontradas presentan residuos que pueden ser parte de procesamientos postraduccionales en las regiones del C-terminal.

Los procesamientos postraduccionales presentados en las toxinas de canales de sodio muestran en su secuencia precursora, un extremo carboxilo-terminal con la secuencia adicional Gly-Lys-Lys. El residuo de lisina es removido por una carboxipeptidasa residuo-específica (actividad CPAse B-like); posteriormente el residuo de glicina permite la formación de péptido des-Gly amina por la reacción de amidación de la enzima α -amidasa (Bradbury et al., 1982; Martin-Euclaire et al, 1992). El resultado genera un residuo Cys-amida cuya secuencia se correlaciona con la secuencia madura del componente del veneno. Las clonas 1 y 11 mostraron esta región adicional, sugiriendo que este tipo de procesamiento postraducciona l puede estar ocurriendo en *T. costatus*.

Toxinas de canal de potasio

La Butantoxina encontrada en *T. costatus* mostró tamaño y masa molecular muy parecidas a la Butantoxina reportada para *T. serrulatus* (α -KTx12.1), además de que presenta identidad mayor del 90% con otras Butantoxinas homólogas de venenos de *T. bahiensis*, *T. stigmurus* (Holaday et al., 2000) y *T. trivittatus* (Corona et al., 2003). La figura 8 muestra la estructura tridimensional de la Butantoxina de *T. serrulatus* o α -KTx12.1, además de la secuencia primaria que muestra el único cambio al ser comparada con la secuencia Butantoxina-like de *T. costatus* (residuo 9). Según la nomenclatura propuesta por Tytgat y colaboradores (1999), el nombre correspondiente para nuestra secuencia Butantoxina de *T. costatus* es toxina α -12.2/ α -KTx12.2.

Rodríguez de la Vega (2003), muestran el modelo de interacción con los canales de potasio tipo *Shaker* B, $K_{Ca}2.2$ y $Kv11.1$. Este modelo resalta los residuos de toxina α KTx 3.2 que interaccionan con el canal *Shaker* (K19, R24, K27 y N30), los cuales son mostrados en la figura 8. La figura 8 muestra adicionalmente la homología de secuencia y estructura de la toxina α -4.5 (VFIN) de *T. costatus* y α -4.1 (TsTxK α) de *T. serrulatus*. Las secuencias de las toxinas de canales de potasio α -4.5 y α -12.2 reportadas en nuestro trabajo muestran residuos en posiciones homólogas, estas posiciones podrían tener la interacción con el canal de manera similar a la interacción de la toxina α -3.2 mostrada en el modelo de la figura 8. La toxina α -12.2 muestra los residuos propuestos en el modelo aunque presentan distinta posición conservan la separación entre residuos (figura 8-D, ver en el alineamiento K22, R26, K30 y N33).

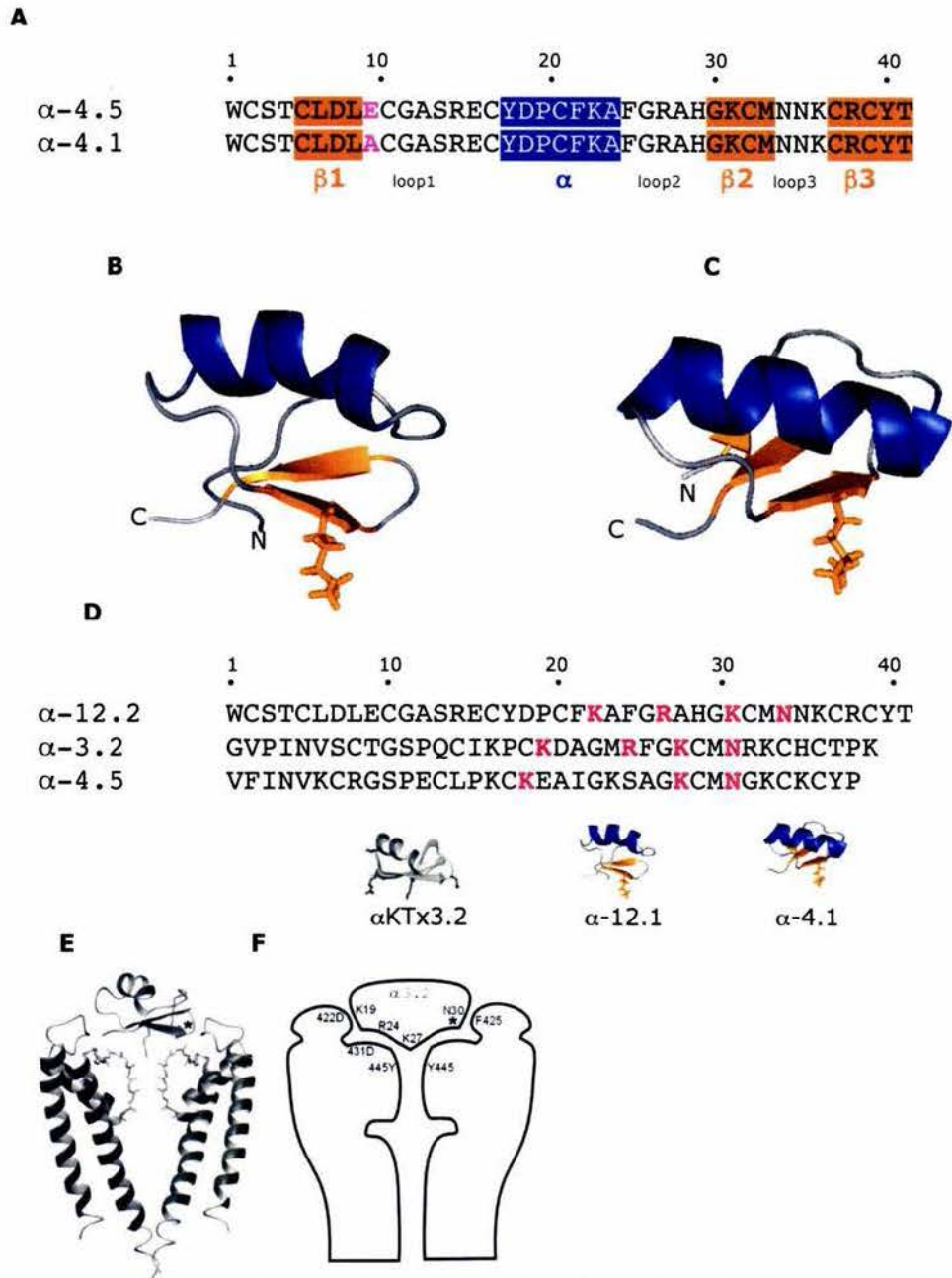


Figura 8. Comparación de estructura de las toxinas de potasio de *T. costatus* y el modelo bidimensional de las interacciones toxina de alacrán y el canal de potasio, tomado de Rodríguez de la Vega et al. (2003), se muestran los residuos de la toxina que interactúan con el canal *Shaker*. A, Estructura primaria y secundaria de la Butantoxina de *T. serrulatus* (α -12.1) según Oyama et al. (2005), y su comparación con la secuencia de la Butantoxina de *T. costatus* (α -12.2); se resalta en rosa el único cambio presente entre las secuencias (residuo 9 Ala/Glu). B y C, estructuras de la toxina α -12.1 (PDB 1C56) y la toxina α -4.1 de *T. serrulatus* (PDB 1HP2); en ambas estructuras se resalta la Lys 27 que interactúa con el canal de potasio. D, secuencias de las toxinas de potasio α -12.2, α -4.5 de *T. costatus* (Este trabajo) y α KTx3.2 (Agitoxina 2); en rojo se resaltan los residuos importantes en la interacción con el canal *Shaker* mostrados en la parte F de esta figura. E, Modelo bidimensional de la interacción de α KTx1.1 (Charybdotoxina) y dos de los cuatro segmentos que forman la región del poro basado en canal *Shaker*. F, Modelo de interacción entre la toxina α KTx3.2 y el canal *Shaker*, se muestran las estructuras de las toxinas Butantoxina y TsTxK α de *T. serrulatus*.

¿Defensina o toxina de canal de potasio?

El análisis proteómico mostró la presencia de componentes del veneno cuya secuencia de aminoácidos también aparece incluida como parte de la secuencia de otro componente. Es decir, la secuencia directa del componente Tco41.46-2 ("scorpine-like") mostró la misma secuencia del péptido correspondiente al componente Tco42.16, sin embargo, el componente Tco41.46-2 presenta una región de 8 residuos adicionales en el extremo N-terminal (ver figura 3, datos publicados Diego-García et al, 2005). También se obtuvieron dos secuencias del banco de cDNA (clonas 12 y 13) que mostraron una correspondencia con las secuencias peptídicas secuenciadas de manera directa de los dos componentes Tco41.46-2 (masa molecular 7678.0) y Tco42.14 (6730.0). Nuestros datos nos permiten hacer especulaciones sobre procesamientos postraduccionales, que enfatizan el posible papel de la región del péptido señal en estas secuencias.

El péptido Tco 41.46-2 fue considerado previamente como scorpine-like por su similitud con secuencias de defensinas; al realizar ensayos biológicos con este componente no se observó actividad antimicrobiana. La cantidad de componente Tco41.46-2 utilizada en los ensayos biológicos (0.5 y 2.0 $\mu\text{g/ml}$) se encuentra dentro de los valores mínimos inhibitorios reportados de los péptidos cationicos antimicrobianos más activos (0.25 y 4 $\mu\text{g/ml}$, Hancock & Lehrer, 1998). Esto significa que no queda descartada la posibilidad de que sea un péptido con actividad antimicrobiana.

La obtención de la secuencia completa del péptido scorpine-like, mostró ser semejante a la secuencia del componente Tco42.14 y la secuencia peptídica derivada de las clonas 12 y 13 mostró una identidad del 64% con toxinas de cadena larga bloqueadoras de canales de potasio, familia β -KTx. Las toxinas de canales de potasio de cadena larga contienen 60-70 residuos de aminoácidos y característicamente cuatro puentes disulfuro. La toxina β -1/TsTXK β (64 aa) es el único péptido reportado como toxina de canal de potasio beta de cadena larga para el género *Tityus* (Legros et al., 1998); esta toxina es completamente diferente a las toxinas reportadas de canales de potasio de cadena corta (tabla 2).

La similitud de la toxina β -1/TsTXK β con la secuencia de aminoácidos derivada de las clonas 12 y 13 (figura 10-A) obtenida en *T. costatus*, muestra 97% identidad (dos residuos diferentes). Consideramos que nuestra secuencia corresponde a una nueva toxina de cadena larga bloqueadora de canales de potasio. El péptido Tco42.14

y la secuencia de aminoácidos derivada del banco de cDNA se denominó siguiendo la nomenclatura TcoTXKβ en los análisis de similitud mostrados en la figura 10.

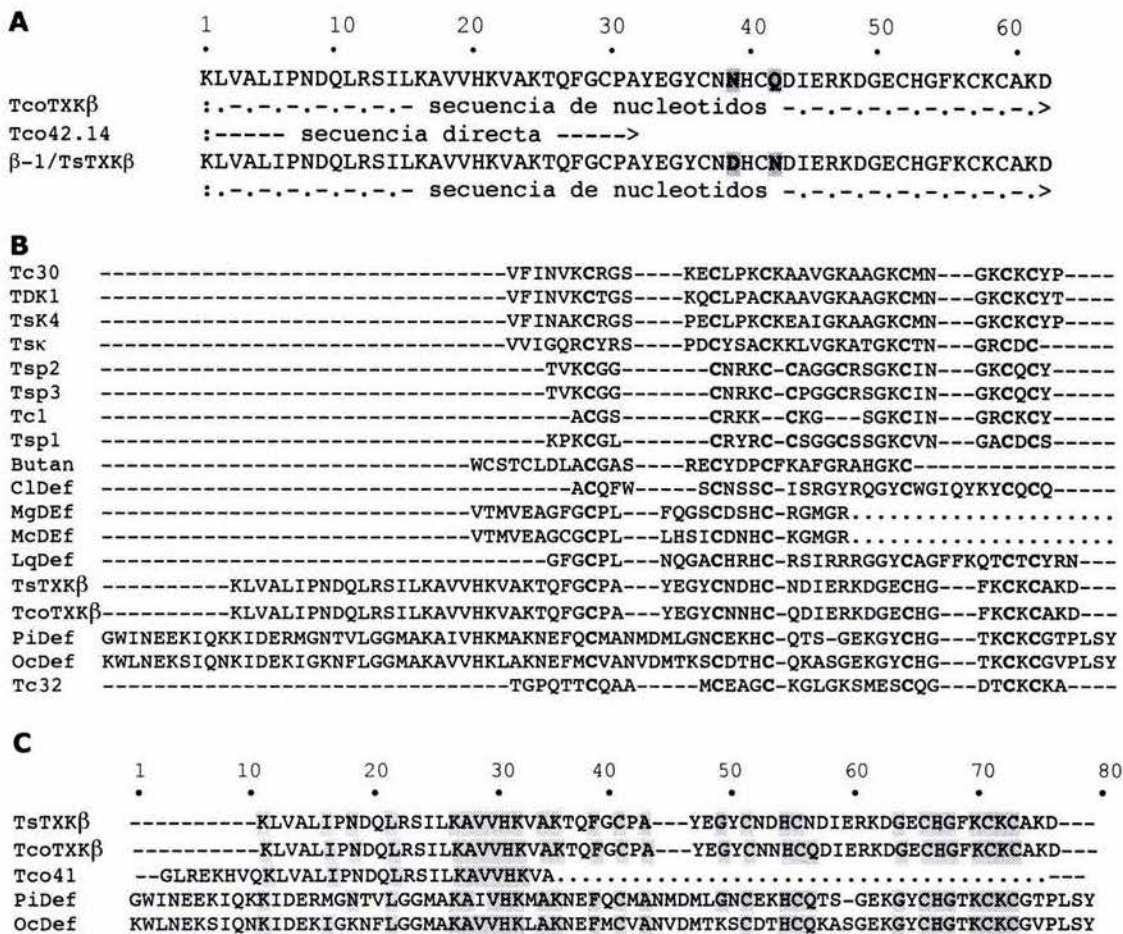


Figura 9. Comparación de las secuencias de aminoácidos del componente Tco42.14 llamado TcoTXKβ (clona 12 y 13), β-1/TsTXKβ (Legros et al, 1998), toxinas de cadena corta bloqueadoras de canales de potasio y algunas defensinas de alacrán. A, secuencias de aminoácidos deducidas de las secuencias nucleotídicas; las letras rojas en la secuencia resaltan la ubicación de cisteínas, las letras resaltadas muestran los residuos diferentes en ambas secuencias; Las líneas de la parte baja indican las regiones correspondientes a la secuencia directa obtenida por degradación de Edman y la secuencia nucleotídica. B, alineamiento de las secuencias de toxinas para canales de potasio (tabla 2) y algunas defensinas reportadas de alacrán; Cl, *Centruroides limpidus limpidus* (P83738); Mg, *Mesobuthus gibbosus* (CAE55151); Mc, *Mesobuthus cyprius* (CAE55117); Pi, *Pandinus imperator* (CAB96789); Oc, *Opisthophthalmus carinatus* (AAQ94358). Las secuencias con puntos se reportan incompletas. C, similitud de secuencia con defensinas de alacranes de África y el componente Tco41.46-2 de *T. costatus* (abreviado Tco41); los residuos iguales entre las secuencias son resaltados en gris.

Zhu & Tytgat (2004) compararon secuencias de opiscorpinas y toxinas de K⁺ de cadena larga. Estos autores encontraron similitud entre secuencias precursoras (56%) y de manera importante dos sitios de corte propuestos en la secuencia madura; uno de los sitios se encuentra inmediatamente después del péptido señal y el segundo ocho

residuos después de éste. Los péptidos Tco 41.46-2 y Tco42.14 muestran esta característica (figura 9-C).

La similitud con las secuencias de péptidos tipo defensinas sigue siendo un hecho interesante. Legros et al. (1998), observaron la similitud de la toxina β -1/TsTXK β con secuencias correspondientes a defensinas de insectos. Este análisis le permitió considerar a esta secuencia como una nueva familia de toxinas para canales de potasio, además de estar relacionadas con defensinas.

La distribución de los diferentes géneros de alacranes de la familia Buthidae fue revisada por Possani y colaboradores (1999), describiéndose a los géneros más estudiados. Entre éstos se encuentra el género *Centruroides* con distribución en la parte sur de USA, México y América Central y al género *Tityus* distribuido en Trinidad y Tobago y Sudamérica, principalmente en Brasil, Venezuela, Colombia y Argentina. La distribución biogeográfica del género *Tityus* muestra las relaciones de parentesco evolutivo que presentan con especies Africanas como las de los géneros *Pandinus* y *Opisthophthalmus* desarrollados de manera ancestral en ambientes similares. Una diferencia importante se observa con las especies del género *Centruroides*, que posiblemente derivaron más recientemente por lo que la similitud de componentes del veneno y secuencia nucleotídicas cambian al realizarse una selección natural en un ambiente diferente.

La relación filogenética establecida entre toxinas para canales de potasio y componentes tipo defensina explica la similitud entre este tipo de componentes, además de que se ha observado que las secuencias de péptidos y genes que corresponden al género *Tityus* muestran mayor similitud a las secuencias de alacranes Africanos (figura 10-C). Zhu & Tytgat (2004), encuentran e identifican componentes de la familia que muestran dos dominios (compuesta de defensinas y toxinas de canal K⁺ de cadena larga). El análisis filogenético revela relaciones co-evolutivas entre estos dominios. Las relaciones filogenéticas entre alacranes de Sudamérica y África permiten especular que el parecido encontrado en el péptido Tco41.46 (llamado "scorpine-like") puede deberse a estas relaciones de co-evolución, lo que significa que en *T. costatus* existió este proceso y se favoreció muy probablemente la actividad de toxina de canal K⁺ como lo observó Legros et al (1998) en la secuencia la toxina TsTXK β *T. serrulatus*. Sin embargo, esta observación se basa en las pocas secuencia nucleotídicas por lo que resulta ser muy especulativo.

Para la realización de este trabajo doctoral se contó con solo un ejemplar de *T. costatus*, el cual fue sacrificado para la obtención del telson y con ello la generación del

banco de cDNA. Debido a las restricciones y penalización sobre la extracción de la fauna Brasileña de su hábitat original, no permitió la obtención de otros ejemplares para el análisis genómico enfocado en la organización de los genes obtenidos a partir del banco, por lo que el trabajo de organización de genes no se llevó a cabo.

La huella proteómica de *T. costatus*

Considerando la información sobre componentes y propiedades bioquímicas del veneno de especies de *Tityus*, mostramos los valores de las LD₅₀ descritos por Wagner et al. (2003), los cuales pueden ser referencia como parámetros de toxicidad en algunas de las especies. La LD₅₀ fue: 1.590 mg kg⁻¹ para *T. costatus*, 1.160 mg kg⁻¹ para *T. serrulatus* y 12.136 mg kg⁻¹ para *T. cambridgei*. Este último es considerado como moderadamente tóxico. Estos valores de LD₅₀ son muy similares a los reportados para alacranes Brasileños considerados altamente tóxicos (Nishikawa et al., 1994). Hay que mencionar que la toxicidad *in vivo* puede ser diferente debido a que la cantidad de veneno producida es diferente en cada especie.

La información de secuencias de aminoácidos obtenida de manera directa a partir del resto de los componentes del veneno no secuenciados será la base para la búsqueda dirigida de las secuencias nucleótídicas correspondientes. Sin embargo, el uso de sondas heterólogas en esta y otros bancos de cDNA de alacrán puede ser una alternativa para encontrar las secuencias correspondientes a los componentes homólogos en los venenos, nuestros datos mostraron que existen componentes homólogos en las especies del género *Tityus* (tabla 4). La figura 10 muestra la comparación de la composición y características comunes de los componentes del veneno en el género, permitiendo observar el patrón general en los diferentes proteomas reportados de *Tityus* respecto a los componentes caracterizados en *T. costatus*.

La figura 10 muestra el número de los componentes del veneno y la masa molecular reportados para las especies de *Tityus*. Esta figura muestra que los componentes cuyo rango de masa molecular es de 3,000 a 8,000 una son más abundantes (además de los componentes de bajo peso molecular). Estos valores de masa molecular corresponden a toxinas específicas para canales de sodio y potasio, incluyéndose en este rango a las toxinas de cadena larga para canales de potasio. La mayoría de los componentes correspondientes a otras actividades se ubican en rangos de menor y mayor masa molecular (ejemplo: fosfolipasas). Es importante mencionar que en *T. serrulatus* sólo se toman en cuenta a los componentes de la fracción II, ya que los autores del trabajo realizan una diálisis previa del veneno, descartando

componentes pequeños. Se observa que la composición general de venenos del género *Tityus* tienen una estructura similar en el patrón de componentes.

Tabla 4. Comparación de componentes homólogos encontrados y caracterizados en el género *Tityus*.

Toxina/nombre	Componente (RT)	MW	Secuencia madura (no. de aa)	Modulación de canal	Referencia'
α -4.5/TcoVFIN ¹	Tco27.70	3986.0	VFINA...(37)	nd	Este trabajo
α -4.1 ²	-	3942.80	VFINA...(37)	Kv1.2 (ratón)	P46114
α -4.3 ³	-	3816.8	VFINV...(37)	Shaker K'	D'Suze et al., 1999
α -4.4 ⁴	-	3871.8	VFINV...(37)	Shaker K'	Batista et al., 2002
α -12.2/BuTxc ¹	Tco30.58	4564.0	WCSTC...(40)	Shaker K'	Este trabajo
α -12.1/BuTxs ²	-	4507.24	WCSTC...(40)	Shaker K'	P59936, Oyama et al., 2005
β -5/K' long chain ¹	Tco42.14	6730.0	KLVAL...(64)	nd	Este trabajo
β -1/TsK β ²	-	6717.77	KLVAL...(64)	nd	Legros et al., 1998

El número superíndice corresponde a la especie de la secuencia reportada: *T. costatus*¹, *T. serrulatus*², *T. discrepans*³, *T. cambridgei*⁴. nd, no determinado. 'Número de acceso a la secuencia según la base de datos (www.ncbi.nih.gov/entrez).

Los componentes con mayor porcentaje respecto al veneno total y mayor actividad tóxica, son los que corresponden a toxinas de canales de sodio (6000-8000 u.m.a). Sin embargo, existen una mayoría de componentes que corresponden a toxinas de canales de potasio (3,000-5,000 u.m.a.), además de los componentes que posiblemente correspondan a toxinas de canales de potasio de cadena larga que se encuentran en los rangos de 6,000-8,000 u.m.a, similares a las masas moleculares de algunas toxinas de sodio.

El resto de los componentes de los venenos pueden corresponder a actividades poco estudiadas del género, como los componentes antimicrobianos, efecto analgésico, hemolítico, anticoagulante, hyaluronidasa, entre otros observados para otras especies de alacrán, que aún no han sido exploradas en *Tityus*. Este trabajo representa una contribución base para consideraciones más específicas y profundas de las actividades, procesamientos y organización de genes de los distintos componentes del veneno de *T. costatus*.

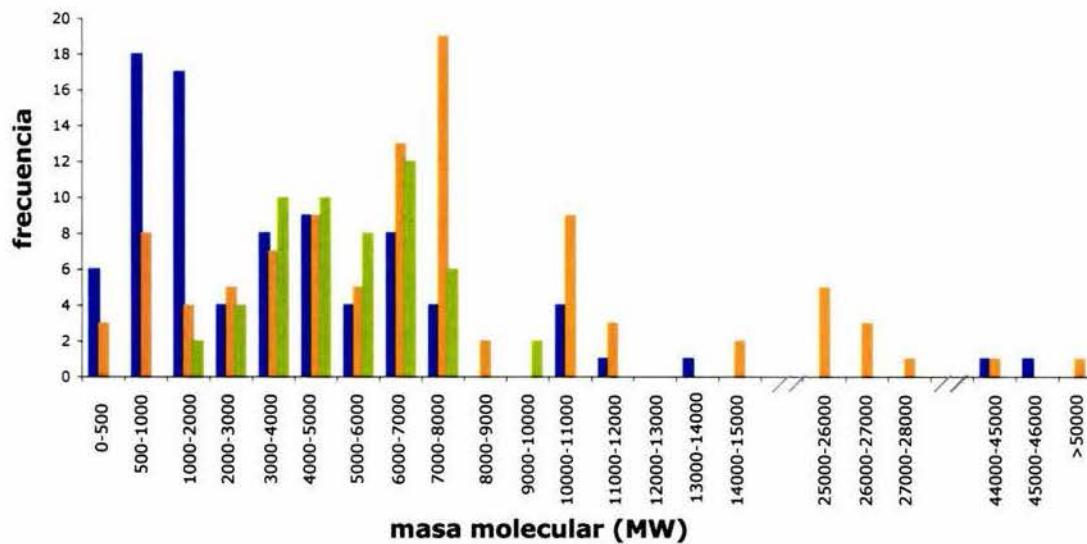


Figura 10. Número de componentes en los rangos de masa molecular de los proteomas reportados para los venenos de especies del género *Tityus*. Los símbolos corresponden: ■, *T. costatus* (Diego-García, 2005); ■, *T. cambridgei* (Batista et al., 2004); ■, *T. serrulatus* fracción II (Pimenta et al, 2001). El valor de frecuencia corresponde al número de componentes.

VI. Conclusiones y Perspectivas

El veneno del alacrán *T. costatus* Karsch presenta diversos componentes que corresponden a toxinas específicas de canales de sodio y potasio, además de componentes con posible actividad antimicrobiana. Fue comprobado que el veneno de *T. costatus* contiene componentes con actividad tóxica para mamíferos.

Es importante mencionar que aún queda información por obtenerse a partir del banco de cDNA generada en este trabajo. La estrategia para la nueva búsqueda puede ser complementada con la secuenciación de clones al azar del banco, permitiendo la posible obtención de secuencias correspondientes a los 90 distintos componentes obtenidos que corresponden a la huella proteómica (por masa molecular) de *T. costatus*.

La actividad antimicrobiana no fue observada en componentes de *T. costatus*, sin embargo, es necesario obtener más veneno para realizar pruebas con fracciones del veneno. Los resultados y secuencias obtenidas permiten especular que es probable la obtención a futuro de los componentes con estas actividades. Es necesario obtener las secuencias de aminoácidos de los componentes del veneno que corresponden a las secuencias nucleotídicas obtenidas a partir de la librería, corroborando posteriormente la actividad fisiológica.

En la estrategia de hibridización, las condiciones de baja y alta severidad fueron las adecuadas en la búsqueda de las secuencias completas en el banco de cDNA. Esta búsqueda fue eficiente y nos permitió generar, por primera vez, información relevante sobre la composición del veneno de este género, contribuyendo a la escasa información en proteómica y genómica de arácnidos.

Las condiciones empleadas durante nuestra búsqueda nos permitieron encontrar en repetidas ocasiones las secuencias que correspondieron a dos clones reportadas en datos publicados. La búsqueda de otras secuencias correspondientes a clones de toxinas de sodio, así como los componentes tóxicos para mamíferos deberá realizarse en otras condiciones de severidad durante el protocolo de hibridización.

Se demostró la existencia de componentes con actividad moduladora de canales de potasio tipo *Shaker* K⁺ (componente Tco32 o toxina α -12.2). La obtención de las cuatro clones con similitud a toxinas de canales de potasio incluyeron un nuevo miembro de la subfamilia α -KTx4, una secuencia de toxina de cadena larga y el representante de una nueva familia de toxinas de potasio; estos datos son relevantes para el acervo de información sobre estas familias de toxinas.

Parte II

Publicación complementaria y organización de genes que codifican componentes tipo defensinas de alacrán.

Una parte de los resultados adicionales de nuestro trabajo sobre la organización de los genes de defensinas, fue publicada en la revista Cellular and Molecular Life Sciences en el artículo "Antimicrobial peptide induction in the haemolymph of the Mexican scorpion *Centruroides limpidus limpidus* in response to septic injury", volumen 61:1507-1519 (2004).

VII. Organización de genes *Cll-dlp* y *Scorpine*

7.1 INTRODUCCIÓN

La escasa información de secuencias genómicas y de organización de genes de alacrán fueron el principal motivo para la realización de la segunda parte de esta tesis doctoral. En la sección introductoria de esta tesis (parte I), se citaron brevemente los reportes de defensinas de alacrán. El trabajo de Zhu & Tytgat (2004) muestra la organización de genes de las opiscorpinas del alacrán *Opisthophthalmus carinatus*. Estos genes son considerados homólogos a la defensina *Scorpine* de *Pandinus imperator*. En ese trabajo se mostró una organización similar en secuencias de regiones promotoras de neurotoxinas del veneno y opiscorpinas, además de una similitud de 56% con secuencias de toxinas de canal de K⁺ de cadena larga (TsTXKβ, AaTXKβ y BmTXβ2). Trabajos previos en nuestro laboratorio mostraron la organización del gene de la toxina Ts1 (Becerril et al., 1997; Froy et al., 1999), posteriormente se tomó como modelo a secuencias de cDNA de genes tipo defensina previamente caracterizados (*Cll-dlp* y *Scorpine*).

El objetivo de este trabajo fue obtener las secuencias correspondientes a las regiones de intrones para ambos genes, con la idea posterior de obtener las regiones corriente arriba de los genes y determinar la región reguladora para cada gene (*Cll-dlp* y *Scorpine*).

Para llevar a cabo nuestro objetivo fue necesario la búsqueda de un método eficiente para en la obtención de estas secuencias. Liu & Whitter (1995) reportan el método de TAIL-PCR (thermal asymmetric interlaced polymerase chain reaction) para la obtención de segmentos de DNA a partir de cromosomas artificiales (YAC). Esta metodología es muy adecuada para caminar por cromosomas y obtener por PCR las secuencias corriente arriba de un gene así como los intrones. En la estrategia de TAIL-PCR se utilizan oligonucleótidos degenerados de tamaño corto y secuencia arbitraria degenerada, que en conjunto con oligonucleótidos de secuencia conocida (correspondiente a las regiones del gene de interés), permiten la amplificación de fragmentos por PCR que corresponden a secuencias no conocidas. Esta metodología ha sido empleada en diversos sistemas como plantas y previamente alacranes (Sessions et al., 2002 ;Zhu & Tytgat, 2004)

Este trabajo adicional nos permitió generar una segunda publicación relacionada a la organización de genes de alacrán. La parte II de este trabajo incluye avances y datos preliminares en la organización genética de ambas defensinas.

7.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Para la obtención de los intrones de los genes *Cll-dlp* (Rodríguez de la Vega et al., 2004) y *Scorpine* (Conde et al., 2000), fue necesario estandarizar la obtención de DNA

genómico modificando el protocolo sugerido por kit Dneasy Plant (Quiagen) (Rodríguez de la Vega et al., 2004). El DNA genómico fue obtenido a partir del segmento correspondiente a la región abdominal de alacranes *P. imperator* y *C. limpidus limpidus*.

Se implementó la técnica de TAIL-PCR para la obtención de intrones y regiones corriente arriba de los genes mencionados previamente. Fue necesario el diseño de oligonucleótidos para la amplificación de las secuencias específicas de los genes utilizados en el TAIL-PCR (figura 11, tabla 5). Se utilizó el protocolo reportado por Liu & Whittier (1995) modificando las condiciones de temperatura, ciclos y dilución de las reacciones de PCRs (tabla 6). Los productos amplificados fueron purificados por columna Microcon (Amicon Bioseparations, Millipore) o extracción de geles de agarosa (QIAquick, Qiagen), posteriormente fueron clonados en el vector *pGEM* (Promega) y secuenciados de manera automática (Model 3100, Applied Biosystems, Foster city, CA) para su análisis y comparación de secuencias de las bases de datos.

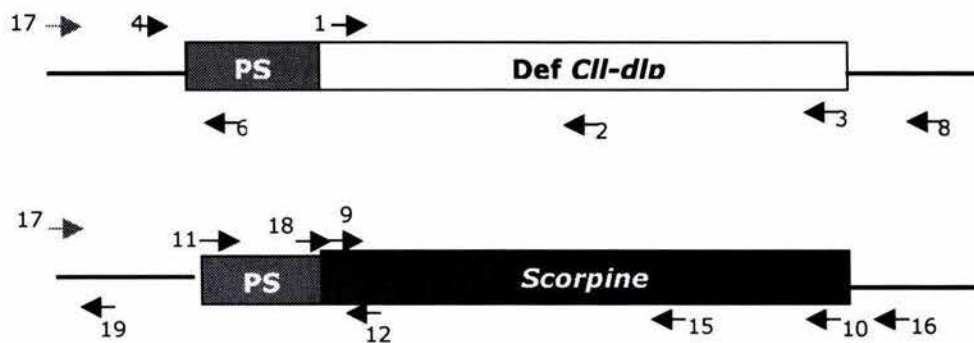


Figura 11. Representación de la ubicación de secuencias correspondientes a los oligonucleótidos utilizados en la amplificación de intrones y TAIL-PCR en genes de defensinas de alacranes. Las flecha indican la posición y sentido del oligonucleótido en el gene y su número de referencia en la tabla 3.

Tabla 5. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en el análisis de organización de genes de *Cll-dlp* y *Scorpine* de alacrán. Las secuencias de oligonucleótidos no publicadas generadas en este trabajo se muestran con el símbolo (-).

oligonucleotido	Secuencia (5' → 3')	Referencia
1. InDef5 ⁺	ATG AAA GCA ATC GTT GTT CTT	Rodríguez de la Vega et al, 2004a
2. Def4-3 ⁺	CTC GAA ATA CAA CTA CTG TTG C	-
3. InDef3 ⁺	GGC AAT ATT TAT ACT GTA TTC	Rodríguez de la Vega et al, 2004a
4. cDef8-5 ⁺	GGA TAG AAG ACC TGT TGG TTT G	-
5. Def4-5 ⁺	GCA ACA GTA GTT GTA TTT CGA G	-
6. Cll-dlp3 ⁺	AAG AAC AAC GAT TGC TTT CAT	-
7. Cll-dlp4	CAA AAA ATG TCC TTA CCA TAA	-
8. Def5-3	GCA AGA CGT TAC AAC ATT GAG	-
9. Scorp5 ⁺	CGG ATG GAT TAA CGA AGA GAA G	-
10. ScorpStop3 ⁺	CAA TTA ATA AGA TAA GGG CG	-
11. Scorp5Int	GAT GAA CAG CAA GCT TAC TGC CC	-
12. ScorpWI3 ⁺	CTT CTC TTC GTT AAT CCA TCC	-
13. ScoInt1	GAA TTA GTG CCC AAC GAA TCA C	-
14. ScoInt2	GCC AAT AAG ATC TAG TGC C	-
15. Scorp3Int	CGC CTT AGC CAT TCC TCC AAG G	-
16. Scorp3 ⁺	CGC TGG GCA CTA ATT TAT TGG	-
17. AD1	NGT CGA SWG ANA WGA A	Liu & Whitter, 1994
18. AIAY5 ⁺	GCG ATT GCC TAC TGC GGA TGG	-
19. ScorpInt30	GGT TTG CGT AGA GGT GAC GGC	-

Tabla 6. Condiciones optimizadas para TAIL-PCR de DNA genómico de alacrán.

Reacción	Número de paso	Número de ciclos	Condición térmica
Primaria	1	1	a) 93°C (1 min), 95°C (1 min)
	2	5	b) 94°C (30 seg), 62°C (1 min), 72°C (2:30 min)
	3	1	c) 94°C (30 seg), 25°C (3 min), 72°C (3 min), 72°C (2:30min)
	4	15	d) 94°C (10 seg), 64°C (1 min), 72°C (2:30 min) 94°C (10 seg), 64°C (1 min), 72°C (2:30 min) 94°C (10 seg), 45°C (1 min), 72°C (2:30 min)
	5	1	e) 72°C (5 min)
Secundaria	6	1	a) 94°C (3 min)
	7	35	b) 94°C (40 seg), 60°C (1:30 min), 72°C (2:30 min) 94°C (30 seg), 44°C (1 min), 72°C (2:30 min)
	8	1	c) 72°C (10 min)
Terciaria	9	1	a) 94°C (3 min)
	10	32	b) 94°C (20 seg), 48°C (1 min), 72°C (2:30 min)
	11	1	c) 72°C (10 min)

7.3 RESULTADOS Y DISCUSION (Datos Publicados)

Defensina *Cll-dlp* de *Centruroides limpidus limpidus*

Los datos publicados adicionales, mostraron la secuencia genómica del gene *Cll-dlp*. Esta secuencia corresponde a la secuencia obtenida a partir de cDNA y a la región genómica que incluye un intron de 128 pb (Rodríguez de la Vega et al., 2004). La amplificación de la secuencia completa a partir del DNA genómico que se obtuvo en experimentos posteriores (figura 12-A). Corroboró la organización del gene reportada, incluyendo adicionalmente la región 3' no-traducida.

Research Article

Antimicrobial peptide induction in the haemolymph of the Mexican scorpion *Centruroides limpidus limpidus* in response to septic injury

R. C. Rodríguez de la Vega^a, B. I. García^a, C. D'Ambrosio^b, E. Diego-García^a, A. Scaloni^b and L. D. Possani^{a,*}

^a Department of Molecular Medicine and Bioprocesses, Institute of Biotechnology, National Autonomous University of Mexico, Avenida Universidad 2001, Cuernavaca 62210 (Mexico), Fax + 52 777 3172388, e-mail: possani@ibt.unam.mx

^b Proteomics and Mass Spectrometry Laboratory, I.S.P.A.A.M., National Research Council, via Argine 1085, Naples 80147 (Italy)

Received 5 March 2004; received after revision 2 April 2004; accepted 22 April 2004

Abstract. Antimicrobial peptides (AMPs) are essential components of host defenses against infectious microorganisms. In chelicerate organisms they have been implicated in three alternative defensive systems: one is defined by the immediate up-regulation of genes encoding AMPs, another is characterized by the inducible systemic release of AMPs from cellular reservoirs and the third alternative is the systemic constitutive production of AMPs. In this work we used a differential high-performance liquid chromatography and mass spectrometry approach to show that septic injury elicits an immune re-

sponse in the haemolymph of the Mexican scorpion *Centruroides limpidus limpidus*. We isolated several haemolymph components, one of which was characterized extensively (amino acid sequence, disulphide pairing, cDNA and genomic clones) and demonstrated to be a novel member of the invertebrate defensin family and consequently named *C. limpidus limpidus* defensin-like peptide (Cll-dlp). This peptide accumulates in the haemolymph in response to septic injury, independently of transcriptional regulation.

Key words. Antimicrobial peptide; cysteine-stabilized $\alpha\beta$ motif; defensin; haemolymph; innate immunity; scorpion.

Arthropods are the mostly widely spread phylum among living animals, comprising at least 75% of all extant metazoans and inhabiting an outstanding variety of ecological niches, where they cohabit with a huge diversity of potentially harmful microorganisms. This evolutionary success can be associated, in part, with their relatively simple but highly effective innate immune system [1, 2]. Their effectiveness relies primarily in the recognition of infectious non-self organisms and consequent activation of cellular and humoral responses leading to the clearance of foreign invaders [3–5]. Analysis of invertebrate

immunity reveals striking similarities between their strategies of non-self recognition and the early immune responses of vertebrate organisms [6–8]. Antimicrobial peptides (AMPs) are a highly diverse category of gene-encoded molecules that critically participate in the clearance phenomenon by humoral processes, mainly due to their antibiotic properties, but also as effectors that can drive the whole process [9–12]. Apart from their diversity, AMPs share a few important structural characteristics, like the presence of several basic residues and the amphipathic character of the functional conformation of their polypeptide chains. Four families of AMPs have been recognized on the basis of structural

similarities [9], namely: linear peptides that can adopt amphipathic α -helical structures in membrane environments; cysteine-rich peptides, closely packed by disulphide bridges; linear peptides with an unusually high content of certain amino acids (e.g. Pro, His or Trp), and relatively long polypeptides rich in Gly residues (a comprehensive list is available in the Antimicrobial Peptides Database at www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/pag1.htm).

Among cysteine-rich AMPs, the largest family corresponds to the invertebrate and plant defensins with the cysteine-stabilized $\alpha\beta$ (CS- $\alpha\beta$) motif, which is defined by the presence of two disulphide bridges that join the consensus sequence...Cys₁-Xaa-Xaa-Xaa-Cys₄...Cys₇-Xaa-Cys₂... through a Cys₁-Cys₇ and Cys₄-Cys₂ pairing [13, 14]. The CS- $\alpha\beta$ motif is a remarkably versatile framework shared by a variety of peptides with different functions, including the antimicrobial defensins from invertebrates [1, 15] and plants [16], the scorpion toxins, which are ion channel modulators [17], the sweet-tasting protein brazzein [18] and the rapeseed class of plant serine protease inhibitors [19]. Defensins containing the CS- $\alpha\beta$ motif have been found in three different phyla of invertebrates: arthropods [15], molluscs [20, 21] and nematodes [22–24]. At present, the most representative group comes from arthropods of the insect class, particularly from different orders of the subclass Neoptera.

From the best-characterized models of invertebrate immunity, in particular from the Diptera (Insecta) order [4, 5] and the Xiphosura (Merostomata) [3], two alternative mechanisms of systemic immune activation have been found. One is characterized by the inducible transcription of genes encoding AMPs in response to an immune challenge. The other is defined by the storage of AMPs in haemocyte granules which are either fused with phagocytosed microbes or delivered to the haemocoel after non-self recognition. Many insect orders appear to follow the first strategy [4, 5, 25–27], whereas some arachnids (the spider *Acanthoscurria gomesiana* [28, 29]), merostomans (the horseshoe crab *Tachypleus tridentatus* [3]), malacostracans (the shrimp *Litopenaeus vannamei* [30, 31]) and molluscs (the edible mussels *Mytilus* spp. [32]) seem to adopt solely the second mechanism. However, at least in termites [33] and scorpions [34, 35], a third mechanism seems to be present, by which the AMPs are systemically constitutive and independent of an exogenous immune challenge. Intriguingly, the production of AMPs in the Ixodida (Arachnida) [36–39] and the relatively distant class Chromadorea (Nematoda) [40] are inducible by immune challenge.

In the subphylum Chelicerata the three different mechanisms of AMPs production were shown to exist [3, 28, 29, 34–39, 41]. Specifically regarding AMPs from scorpions, 9 different peptides have been documented, 5 were isolated from the venom of 4 different species of the

Scorpionoidea superfamily [41] and 4 were found in the haemolymph of 2 Buthoidea species [34, 35]. In all the cases, AMPs appear as constitutive components. Four of such peptides present the consensus sequence of CS- $\alpha\beta$ motif.

In the present work, we describe the immune response caused by septic injury in the Mexican scorpion *Centruroides limpidus limpidus* (Buthidae, Scorpiones, Arachnida, Chelicerata). We isolated and characterized several components from the haemolymph of control and experimentally challenged organisms, using a combined differential high-performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MS) approach, as well as a semi-quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). One of the inducible components was studied in detail, and shown to be a novel member of the invertebrate defensin family.

Material and methods

Animals, septic injury and haemolymph collection

Adult scorpions of the species *C. limpidus limpidus* were collected in the field (state of Guerrero, Mexico) and maintained in the laboratory with water and food (*Tenebrio* larvae and crickets) for several months. Experimental and control groups consisted of female animals (approximately 1 g body weight each), which were deprived of food (water ad libitum) for 2 weeks before experimentation. Scorpions can live perfectly well and healthily in captivity for up to month without solid food, but with water. Individuals from test groups were pricked with a fine needle soaked in a mixture of bacteria (*Escherichia coli* DH5 α and *Bacillus subtilis*). Two control groups were either kept untreated (naïve scorpions) or pricked with a sterile needle. Haemolymph (25–35 μ l per scorpion) was collected by a puncture between the second and third segments of the scorpion metasoma, and collected into ice-cooled plastic tubes. Haemolymph was extracted from control and infected groups (50 specimens each) at 6, 12, 24 and 48 h. To obtain sufficient polypeptide amounts for further biochemical characterization, haemolymph was collected in a separate experiment from 1000 scorpions (male and female individuals) 24 h after bacterial inoculation.

Haemolymph fractionation and peptide purification

The following procedure was adapted from Hetru and Bulet [42]. After collection, haemolymph was immediately centrifuged (Beckman OptimaTL ultracentrifuge) for 30 min at 4°C and 30,000 g to remove cellular content. The supernatant was then diluted 1:1 with 0.10% trifluoroacetic acid (TFA) (v/v), kept in an ice-bath with agitation for 30 min to improve cationic extraction, and again centrifuged for 30 min at 4°C and 30,000 g. This

* Corresponding author.

acidic extract (indicated here as HCII) was loaded onto Sep-Pack Vac C18 cartridges (Waters Associates) equilibrated with 0.10% TFA (v/v). The first fraction collected was the washing with 0.10% TFA (v/v). Thereafter, cartridge elution was performed stepwise with solutions containing 50 and 100% acetonitrile in 0.10% TFA (v/v). The fraction eluted at 50% acetonitrile is indicated here as HCII-II. All fractions were freeze dried under vacuum (Speed Vac; Savant Instruments), except for those derived from the large infected group, which due to their quantity were lyophilized.

The three Sep-Pack fractions (washing, 50% and 100% acetonitrile) were reconstituted in MilliQ water, and applied on a semi-preparative reverse phase (RP) C18 column (10 × 250 mm, Vydac TM) equilibrated with 0.12% TFA (v/v) (solution A) and eluted with acetonitrile containing 0.10% TFA (v/v) (solution B). Elution was performed with a triphasic acetonitrile gradient (0–30% solution B for 15 min, 30–50% solution B for 20 min and 50–100% solution B for 15 min), at a flow rate of 2 ml/min. Active subfractions (see below) were further loaded onto an analytical C18 column (4.6 × 250 mm, Vydac TM) equilibrated with solution A, and eluted with a triphasic solution B gradient (0–25% for 12.5 min, 25–40% for 22.5 min and 40–100% for 15 min), at a flow rate of 1 ml/min. Final peptide purifications were performed on the same analytical C18 column, equilibrated with 15% solution B and eluted with a linear 15–40% gradient of solution B for 45 min, at a flow rate of 0.75 ml/min. All experiments were carried out using a Waters HPLC system model 600E coupled with a tunable absorbance detector model 486. The column effluent was monitored by absorbance at 230 nm.

Antibacterial and haemolytic assays

Two Gram-positive (*B. subtilis* and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) and two Gram-negative (*E. coli* DH5 α and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883) strains were used for antibacterial assays. The HCII extract and fractions from Sep-Pak and RP-HPLC steps were qualitatively proven according to the classical growth inhibition assay in solid medium [43]. Briefly, circa 10 μ g of total proteins resuspended in 10 μ l of sterile ultra-pure water were placed in dishes over plates of Luria-Bertani medium with agar containing 5 × 10⁸ bacteria. Antibacterial activity was visualized as clear zones (no bacterial growth) after overnight incubation at 37°C.

To determine minimal inhibitory concentration (MIC) values, pure peptides and reconstituted HPLC subfractions were tested in a liquid growth inhibition assay following an adapted microdilution protocol of the National Committee of Clinical and Laboratory Standards [44] performed in polypropylene plates with 96 wells (Corning). Briefly, 50 μ l of sample (50 μ g/ml final concentration) was mixed with 50 μ l of Mueller-Hinton medium

(Becton Dickinson), serial dilutions were performed and each well was inoculated with 5 μ l of saline buffer containing 5 × 10⁴ bacteria. The plates were incubated overnight at 37°C.

Haemolytic activity was assayed as described in Torres-Larios et al. [45]. Freshly collected human blood was washed several times and aliquots of resuspended cells in phosphate buffer saline (PBS) were incubated with a final concentration of 100 μ g/ml of total protein from HCII-II subfractions or pure peptides. Haemolysis was estimated by absorbance at 541 nm of the supernatant after 1 h incubation at 37°C. Positive and negative controls were obtained using 1% Triton X-100 (v/v) and cells without treatment kept in the appropriate buffer, respectively.

Structural characterization

Amino acid composition of the native peptide was obtained after acid hydrolysis using a Beckman 6300 analyser, essentially as previously described [45]. Sequence analysis was performed using a Beckman L300 instrument on in situ alkylated native peptide samples (propionamide-cysteine derivatives obtained as described by the manufacturer) or a Procise 491 instrument (Applied Biosystems) on peptides generated from enzymatic hydrolysis of carboxamidomethylated or native species. Cystine-containing peptides were analysed according to Haniu et al. [46]. Mass analysis of native peptide or enzymatic digests was obtained using a Thermo Finnigan LCQ DUO electrospray ionisation-ion trap (ESI-IT) mass spectrometer or a MALDI-TOF mass spectrometer, as reported below.

Purified peptide samples were eventually treated with 10 mM dithiothreitol in 0.25 M Tris-HCl, pH 8, for 45 min at 55°C, before alkylation, or directly alkylated with 55 mM iodoacetamide in 0.25 M Tris-HCl, 1.25 mM EDTA, 6 M guanidinium chloride, pH 7, for 30 min at 25°C. Peptide products were freed from salt and reagent excess by passing the reaction mixture through an analytical C18 column (4.6 × 250 mm, Vydac TM), as previously reported [47], manually collected and dried for further characterization. Native or carboxamidomethylated peptide samples were digested with trypsin in 50 mM ammonium bicarbonate, pH 6.5, overnight. Tryptic digests were directly analysed by MALDI-TOF MS or resolved on a microbore C18 column (1 × 250 mm, Vydac TM) equilibrated with 5% solution B and eluted with a linear 5–40% gradient of solution B for 45 min, at a flow rate of 0.06 ml/min. Peptide fractions were manually collected for further characterization.

Differential MALDI-TOF MS analysis

Samples of cell-free haemolymph and the HCII-II fraction were obtained as described above and used for MS analysis following the addition of 200 pmol fragment

(1–17) from adrenocorticotrophic hormone (ACTH), used as internal standard. The analysis of cell-free haemolymph (30 μ l) was conducted on six independent samples, each obtained from a single individual. Three control (sterile injured) and three 24-h post-infection samples were investigated, all presenting a similar protein content as determined with the Bio-Rad Protein Assay. These samples were filtered through sterilized 0.45- μ m filters before mass spectrometric analysis. The HCII-II fractions were obtained from a pool of haemolymph from about 30 scorpions in each sample (three control and three infected), normalized to contain the same amount of protein.

Differential MALDI-TOF MS analyses were performed using a Voyager-DE PRO mass spectrometer (Applied Biosystems). Samples (1 μ l) were loaded on the instrument target, using the dried-droplet technique and α -cyano-4-hydroxycinnamic acid [5 mg/ml in 50% acetonitrile, 5% formic acid (v/v)] as matrix, as previously reported [47]. Spectra were acquired either in reflectron or linear mode with delayed extraction. Spectra were calibrated either by external or internal calibration using the molecular ions from angiotensin I, ACTH (18–39), ACTH (7–38) and bovine insulin. Data are reported as average masses.

Genomic and cDNA cloning

To prevent excessive cuticle debris and to avoid venom gland contamination, total RNA was obtained only from the first six tergites of the scorpion opisthosoma. Total RNA was isolated from infected *C. limpidus* scorpions (females of same weight), after 12 h of infection, using the Promega TotalRNA isolation system. First-strand synthesis was achieved with SuperScriptII Moloney murine leukaemia virus (M-MLV) RT (Gibco-BRL) in the presence of RNase inhibitor (Roche Diagnostics), using poly(T)₂₂NN as primer. The PCR was performed with Vent DNA polymerase (New England Biolabs), using first-strand cDNA as template and 25-mer degenerated oligonucleotide (5'-GCNTGYCARTTYTGWSYTGAAAY-3') and poly(T)₂₂NN as primers. The cloning and sequencing were obtained using PCR products purified in a Centricon 100 column (Millipore), following the manufacturer's instructions and then ligated into the *EcoRV* site of the pKS plasmid (Stratagene). This construct was used to transform *E. coli* DH5 α cells. Plasmid DNA was isolated from clones carrying the insert and sequenced from both strands in an Applied Biosystems 3100 apparatus, as described by the manufacturer. The 5' cDNA sequence was obtained by the rapid amplification of cDNA ends (RACE) method using 5'RACE system version 2.0 (Invitrogen). Briefly, first-strand cDNA was synthesized from total RNA using a gene-specific primer (5'-TTATTGACACTGGCAATATTT-3') and M-MLV RT. A homopolymeric tail was added to the

3' end of the cDNA using TdT and dCTP. PCR amplification was accomplished using Taq DNA polymerase, an anchor oligonucleotide provided in the kit as sense primer and a nested gene-specific antisense primer (5'-TTTAT-CTGTATTCCCCAGCAATA-3'). The 5'RACE products were cloned into an appropriate vector for subsequent characterization as described above.

The genomic DNA was obtained from scorpion females with the DNeasy mini kit (Qiagen). Two specific oligonucleotides were used as primers for PCR amplification (sense, 5'-ATGAAAGCAATCGTTGTCTT-3'; antisense, 5'-GGCAATATTTACTGTATTC-3'), using Taq DNA polymerase. Products visualized in agarose gel electrophoresis were purified with a QIAquick gel extraction kit (Qiagen) and cloned into the pGEM vector (Promega). Sequencing was determined as described above.

Semiquantitative RT-PCR analysis

Gene expression was analysed by RT-PCR. Total RNA extraction and first-strand cDNA synthesis from two naïve and two bacteria-challenged scorpions were performed as described above, except that random decamers (Ambion) were used as primers. Equal amounts of each cDNA were used in the subsequent PCR, carried out with Taq DNA polymerase and two specific primers (sense, 5'-CATGACAACCGTGGAAAGG-3'; antisense, 5'-TTATTGACACTGGCAATATTT-3'), which resulted in an expected 117-base pair product. The primers for the housekeeping gene of 18S rRNA were used according to the QuantumRNA Universal 18S Internal Standards Kit (Ambion). PCR samples were performed for 26, 29, 32 and 35 cycles; the products stained with ethidium bromide were analysed in 2% agarose gel electrophoresis.

Similarity searches and sequence analysis

The sequences obtained in this work were deposited at SWISS-PROT (P83738) and GenBank (AY520534) databases. Similarity searches were performed using BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) and FASTA 3 (www.ebi.ac.uk/fasta33) against non-redundant databases, using BLOSUM 62, PAM 70 or PAM 120 weight matrices. Sequence alignments were performed with CLUSTAL_X [48]. The signal peptide was predicted using the SignalP server (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP).

Results

Antibacterial activity in fractions of *C. limpidus* limpidus haemolymph

Earlier work conducted with haemolymph of two Old World scorpions, *Leiurus quinquestriatus hebraeus* [34] and *Androctonus australis* [35] showed the presence of constitutive antibacterial peptides. This motivated our re-

search with haemolymph of the New World species *C. limpidus limpidus*. At the starting point of this work, 500 naive individuals were used for haemolymph extraction and analysis. The animals were kept and fed in captivity for several months. Five groups of individuals were separated containing 50–250 individuals each. The haemolymph from each group was treated independently, as reported in Materials and methods. Each fraction from the C18 cartridge extraction was tested for antibacterial activity, using a solid-medium assay [43]. In all cases, only the HCII-II fraction contained antibacterial activity. These fractions were further separated on a semi-preparative RP-HPLC column, from which three positive sub-fractions were found and called HCII-II.10, -II.11 and

-II.12 (fig. 1, table 1). The chromatographic profiles obtained with haemolymph of the different scorpion groups was quite reproducible, except for the subfraction labelled with an asterisk in figure 1 (subfraction II.11). The relative concentration of this subfraction was not constant when compared with various haemolymph samples from other scorpion groups (data not shown).

Components of *C. limpidus limpidus* haemolymph involved in the septic injury response

The unexpected finding that the subfraction indicated with an asterisk in figure 1 was variable within different haemolymph batches prompted us to examine if these differences could be due to extrinsic factors, rather than to

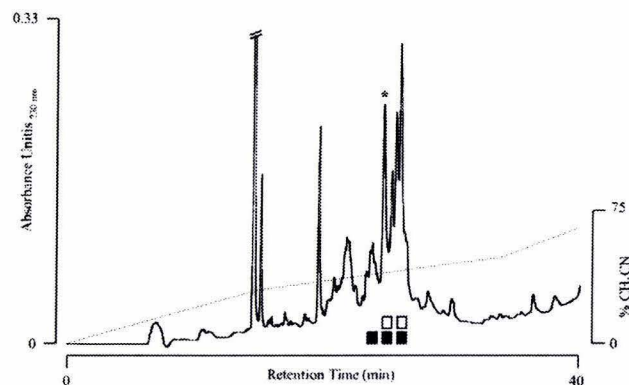


Figure 1. Chromatographic separation of HCII-II. One milligram of total protein from the HCII-II fraction was loaded on a C18 semi-preparative column and eluted with the acetonitrile gradient displayed (broken line). Squares under the chromatogram profile indicate sub-fractions with antibacterial activity in a solid-medium assay against *E. coli* (empty) or *B. subtilis* (closed). Asterisk indicates a variable sub-fraction called HCII-II.11 (see text for details).

Table 1. Antibacterial assays.

	<i>E. coli</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>S. aureus</i>	
	solid	liquid	solid	liquid	solid	liquid	solid	liquid
HCII-II	+	NT	+	NT	+	NT	+	NT
CII-dlp	-	> 50	-	> 50	-	> 50	-	> 50
HCII-II.12a	+	50–25	NT	NT	+	NT	NT	> 50
HCII-II.12b	+	50–25	NT	NT	+	NT	NT	> 50
12a + 12b	+	50–25	NT	NT	+	NT	NT	NT
CII-dlp + 12a + 12b	NT	20*	NT	20*	+	20*	NT	20*

Solid-medium assay [43]: +, presence of inhibition zones; -, no inhibition.

Liquid growth inhibition assay [44], concentrations are given in $\mu\text{g/ml}$; MICs are expressed as intervals between the minimum concentration at which no growth was observed and the maximum at which bacterial growth was still present.

NT, not tested.

* No serial dilutions were performed.

constitutive determinants. The idea was that a mechanism of innate defence could be associated with these variations, depending on the environmental conditions used to maintain and feed the scorpions. To test this hypothesis, we selected three independent groups of 350 female scorpions of the same weight (around 1 g), kept starved for 2 weeks to avoid feeding interferences, and injected with the bacteria described in Materials and methods. Haemolymph collected from control and test groups was analysed using the same protocol described above. Samples were separated by a stepwise elution on the C18 cartridge and the respective HCII-II fractions (normalized to contain 1 mg of total protein) were loaded onto a C18 semi-preparative column. The results indicated that the animals challenged with bacteria injections showed a higher relative content of the subfraction eluting at 24 min (data not shown). This increment was visible from 6 to 24 h after injection, but returned to the basal level after 48 h. The highest value was obtained at 24 h after injection. This suggested that septic injury could elicit an increment of the relative abundance of this subfraction in the haemolymph. The remaining components showed comparable relative concentrations, independent of the treatment applied. The control groups did not show the inducible increment of this specific subfraction in the same time intervals. These experiments were performed on three independent groups, with duplicate analysis of each.

The corresponding subfractions of HCII-II from the control and bacterial-challenged group of scorpions were separated by analytical RP-HPLC. The chromatographic profile of the injured animals showed comparable sub-components, except for the one shown with an asterisk in figure 2A, which increased from 6 to 12 and to 24 h after infection (highest level), decreasing to normal levels at 48 h after injury. This component was purified to homogeneity after a third RP-HPLC step (inset in fig. 2A), and its molecular mass was estimated by ESI-IT MS, showing a monoisotopic signal at 3816.5 atomic mass units. This peptide corresponded to 0.018% of the total protein content for haemolymph extracts of challenged scorpions. On the basis of our chromatographic and MS determinations we estimated that induction by septic injury would double or triple the relative concentration of this component in the circulating haemolymph. To proceed with its chemical characterization, the haemolymph of 1000 infected scorpions was obtained and the corresponding peptide isolated as described above. About 180 μg was used for final characterization. This peptide was named CII-dlp, meaning *C. limpidus limpidus* defensin-like peptide.

Amino acid sequence and disulphide bridges of CII-dlp
The polypeptide sequence was obtained by direct Edman degradation of the native species (first 31 amino acids)

and mass mapping measurement and sequencing of overlapping fragments generated following tryptic digestion of a reduced and alkylated peptide sample (fig. 2C). The sequence obtained is consistent with the amino acid composition determined by acid hydrolysis (data not shown). The peptide presented six cysteine residues, all involved in disulphide bridges, as determined by ESI-IT MS and MALDI-TOF MS analysis of native and carboxamidomethylated peptide samples, following alkylation in reducing or non-reducing denaturing conditions (data not shown).

CII-dlp disulphide bridge pairing was investigated by a combined mass spectrometric-Edman degradation approach. Native CII-dlp was digested with trypsin and the resulting peptide mixture was directly analysed by MALDI-TOF MS, producing the spectrum shown in figure 2B. A series of signals were assigned to S-S-bridged peptides on the basis of their unique mass values and their disappearance following incubation with dithiothreitol. The signal at 3475.6 m/z was associated with a three-peptide cluster involving fragments (1–14), (18–27) and (28–32) (theoretical value: 3475.9 m/z) linked by three disulphides. The remaining peaks were assigned to S-S-containing peptides originating from the mentioned above one, following non-specific hydrolysis at Trp5. In fact, the signal at 1897.6 m/z was interpreted as arising from peptides (1–5) and (18–27) linked by the disulphide Cys2-Cys21 (theoretical value: 1897.4 m/z). Similarly, the signal at 1595.7 m/z was associated with a complementary peptide cluster involving fragments (6–14) and (28–32) (theoretical value: 1596.1 m/z) linked by two disulphides. The final S-S assignment was obtained by direct Edman degradation of these latter Cys-containing peptides, following chromatographic purification and identification of the PTH-cysteine at the expected degradation cycles [46]. This analysis led to the expected sequence in the case of the component with (M+H)⁺ at 1897.6 m/z, with a straightforward identification of the disulphide Cys2-Cys21. Similarly, the peptide at 1595.7 m/z, associated with the peptide cluster (6–14) + (28–32) showed the presence of PTH-cysteine at the second and the sixth cycle during Edman degradation, thus demonstrating the occurrence of the disulphides Cys7-Cys29 and Cys11-Cys31. On the basis of these results, the determined CII-dlp disulphide pairing (fig. 2C) was equivalent to that already reported for other invertebrate defensins (CS- $\alpha\beta$ motif signature pairing). Moreover, BLAST and FASTA 3 searches grouped the sequence of CII-dlp with other invertebrate defensins and CS- $\alpha\beta$ motif-containing peptides (see below).

CII-dlp systemic liberation in response to septic injury

To present an additional semi-quantitative measurement of this phenomenon, haemolymph samples from control animals and septic-injured scorpions were also analysed by

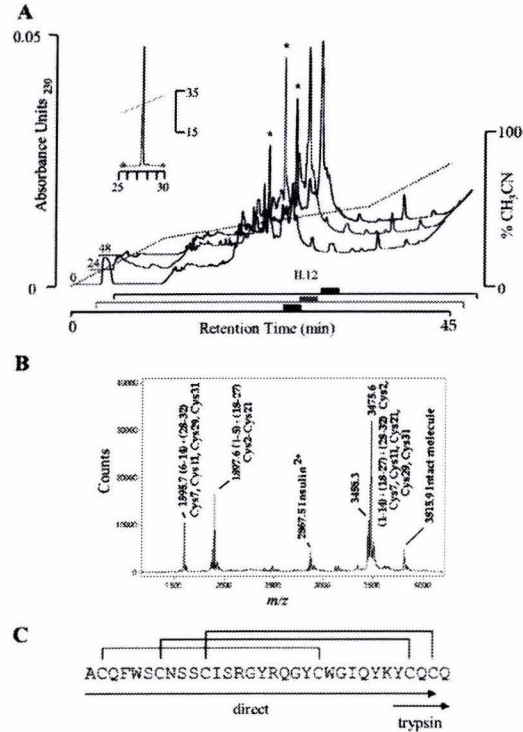


Figure 2. Purification and characterization of CII-dlp. (A) The variable subfraction (HCII-II.11) in semi-preparative HPLC from naive (0) and bacterial-challenged scorpions after 24 (24) and 48 (48) h were further fractionated on an analytical C18 column eluted with the acetonitrile gradient displayed (broken line). The retention times over which the components HCII-II.12a and HCII-II.12b elute are indicated by solid rectangles. The inset shows the final purification of CII-dlp from pooled peaks indicated with an asterisk in the main figure. (B) MALDI-TOF mass spectrum of native CII-dlp following tryptic hydrolysis. Signals corresponding to the disulphide-bridged peptides are reported. Each signal was assigned to the corresponding peptide pair or triplet on the basis of its mass values, peptide sequence and enzyme specificity. The cysteine residues involved in S-S bonds are indicated. (C) Amino acid sequence of CII-dlp as determined by Edman degradation and MS analysis. The fragments considered to assemble the full sequence are indicated below. Disulphide pairing is also displayed. The CII-dlp sequence is in the SWISSPROT database under accession number P83738.

MALDI-TOF MS procedures (fig. 3). Two kinds of samples were used in these experiments: cell-free haemolymph extracts (fig. 3A) and fraction HCII-II (fig. 3B). Consistently, the MS spectra of cell-free haemolymph showed the same set of components in samples from both control and bacterial-challenged groups; however, a clear induction of at least four components with a molecular mass ranging from 3100 to 4100 m/z was registered in experimentally infected scorpions (compare lower and upper panels in fig. 3A). As a result of a stepwise purifica-

tion, fractions HCII-II from control and septic-injured animals seemed to be enriched in the component with the molecular mass at 3816.9 m/z. This species showed a clear apparent increase in samples from septic-injured scorpions (fig. 3B). The weaker signals occurring in the spectra were not considered to be statistically significant (experiments done in triplicate). Important to note is that the component CII-dlp with an (M+H)⁺ signal at 3816.9 m/z was the most conspicuously inducible.

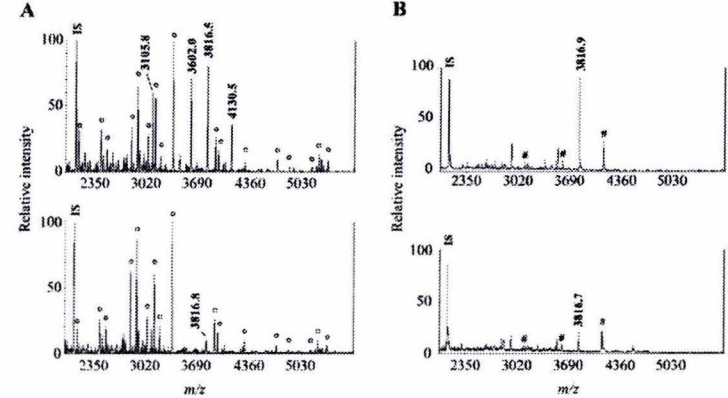


Figure 3. Differential MALDI-TOF MS analysis. (A) The cell-free haemolymph was collected from a single-bacterial challenged scorpion (upper panel) or sterile injured (lower panel), to which with the ACTH (1-17) internal standard was added and analysed as reported in Materials and methods. Circles indicate molecular components common to both samples, whereas indicated m/z values correspond to the signals variable between both kinds of samples. (B) The fraction HCII-II was collected from the stepwise purification of challenged (upper panel) or sterile-injured (lower panel) scorpions, to which with the internal standard was added, and analysed as mentioned above. Indicated with # are the peptides with (M+H)⁺ at 3105.8, 3602.0 and 4130.5 m/z, already reported in (A). All analyses were performed in duplicate for three independent sterile-injured or bacterial-challenged scorpion samples; all samples were prepared in parallel under the same experimental conditions. IS means the internal standard.

CII-dlp gene structure and mRNA expression after septic injury

The apparent increase in CII-dlp in response to septic injury could be associated with its de novo synthesis (as in some insects, nematodes and arachnids [4, 5, 25-27, 36-40]), or to the release of pre-synthesized and stored peptide in special reservoirs, which could liberate the peptide upon stimulation (as in mussels, shrimps and some chelicerates [3, 28-32]). To solve this question, we cloned the gene from cDNA and studied the expression of mRNA in response to septic injury.

The cDNA sequence encoding mature CII-dlp was obtained by classical 3' and 5'RACE protocols. This clone consisted of 363 base pairs (bp), comprising 61 at the 5' untranslated region, a putative 24-residue-long signal peptide, the full mature sequence for CII-dlp followed by a stop codon and 131 bp at the 3' untranslated region, including a putative polyadenylation signal (fig. 4). The genomic sequence was determined by PCR and cloning. The sequence overlaps with cDNA from position -72 to position +88. This clone included a single phase I intron of 128 bp with canonical splicing sites splitting an Ala codon within the putative signal peptide region (fig. 4). Determination of the nucleotide sequence provided the information needed to synthesize the appropriate oligonucleotides for mRNA expression analysis. RT-PCR assays were performed with mRNA isolated from naive

and bacterial-challenged scorpions (10 h post-infection), using specific primers for CII-dlp and the housekeeping rRNA of ribosomal subunit 18S (see Materials and methods). No significant differences in relative abundance of the CII-dlp transcript were observed between these two conditions (data not shown).

Cooperative antibacterial effect of CII-dlp

The HCII-II subfraction from which CII-dlp was isolated (asterisk in fig. 1), showed antibacterial activity against *E. coli* and *B. subtilis* in solid-medium qualitative assays (table 1). However, for the pure peptide CII-dlp, only marginal activity was observed at relatively high concentrations (maximum concentration tested was 70 µg/ml, due to scarcity of sample). Nevertheless, almost one-half of the CII-dlp-containing HCII-II subfraction consisted of two other major components: peptides HCII-II.12a and HCII-II.12b, which coelute in the HPLC conditions used (labelled HCII-II.12 in fig. 2A). These two peptides were isolated in homogeneous form after a third HPLC step and are now being analysed. These components were tested for their antibacterial activity: the MIC values against *E. coli* were 50-25 µg/ml (table 1). When a mixture of HCII-II.12a and HCII-II.12b, at a ratio of 1:1, was prepared, the measured MIC was practically the same. Thus, apparently no cooperative antibacterial effect existed for these peptide species. This situation was quite different when a pep-


```

          *****
ACACTGAAAGTTTCGGATAGAAGACCTGTTGGTTTGATAAATTTGATFAAAATCGTTAAAAATGAAA -67
          M K
          -23
          *****
          GC AATCGTTGTTCTCTTATCTTGGCTCTCATCTTATGCCCTTATGgaagacatttttgaattt -21
          A I V V L L I L A L I L C L Y A-- - 7
          Taaaaactttctatctgtaaatgtgcattgtttaagaaataatacatttgggtattgaaaatata
          -----
          atttaaatgtctaaaaagagaataatttttccgaacCCATGACACCCGTGGAAGGTGCTTGCC 7
          ----- M T T V E G A C Q 3
          -----
          AATTTTGGAGTTGCAACAGTAGTTGATTTCGAGAGGATATAGACAAGGTTATGCTGGGGAATACA 74
          F W S C N S S C I S R G Y R Q G Y C W G I Q 25
          -----
          *****
          GTATAAATATTGCCAGTGTCAATAAAATCTTTCTTAATATCTGTAGTTGATTACCACGTGAAATTT 141
          Y K Y C Q C Q end 32
          -----
          GTTTAAGTAACCTCAATGTTGTAACGCTTTCAGATATGTATAACCCGAAATATAGTTTGTAAATTA 208
          -----
          TAAAGAAATATCTTTAAACTTA 231
    
```

Figure 4. Nucleotide sequences encoding CII-dlp. The cDNA encoding CII-dlp was obtained with standard 3' and 5'RACE protocols, molecular cloning and sequencing. Specific primers flanking the cDNA of the mature region (indicated by forward and reverse arrows) were used to amplify a partial genomic clone. Asterisks above the sequence indicate the overlap between the cDNA and genomic clones. Exons are in uppercase letters. Splice donor and acceptor sites are grey shaded. The polyadenylation signal is double underlined. The translated amino acid sequence is below the nucleotide sequence and the putative signal peptide is on italics. Numbers on the right correspond to the full cDNA clone taking the first nucleotide of mature sequence as position +1. The sequence from the cDNA clone is available in the GenBank database under accession number AY520534.

title mixture was prepared including CII-dlp. Equal amounts of pure components (CII-dlp, HCII-II.12a and HCII-II.12b) were mixed and assayed in a liquid growth inhibition assay. The rationale for choosing this proportion of components was based on the fact that it resembles the one present in the semi-preparative HPLC subfraction from which the CII-dlp was obtained. When a total peptide content of 20 µg/ml was tested, the *E. coli* growth was null. We extended these results by testing the same mixture with other bacterial strains and found that this preparation was active at the same concentration against *B. subtilis*, *K. pneumoniae* and *S. aureus*. Thus, an apparently cooperative antibacterial activity existed between constitutive (HCII-II.12a and 12b peptides) and inducible (CII-dlp) haemolymph components. Because other AMPs isolated from scorpion [41] have been reported to have an intrinsic haemolytic activity, we needed to verify if any of the peptides we isolated could have similar activities on erythrocytes. The effect of all the fractions purified, including the cell-free haemolymph, did not show any haemolytic activity in human erythrocytes, assayed in the conditions described in Materials and methods.

Discussion

As described in the Materials and methods and results, this work required the use of several thousand scorpions. The handling of live dangerous animals to obtain the haemolymph was not a trivial task. Nevertheless, the purification of the haemolymph soluble peptide fractions was relatively simple, comprising a centrifugation followed by a reverse-phase extraction step on Sep-Pack cartridges and a couple of HPLC separations. The complete covalent structure of CII-dlp was successfully obtained. Regarding its biological activity, CII-dlp seemed to be a poor antibacterial agent; however, we were able to demonstrate a cooperative effect between this peptide and the constitutive components HCII-II.12a and 12b. After incubation with the mixture, no bacterial growth was recovered for four bacterial strains (table 1). This situation is similar to that already reported for mammalian antibacterial peptides (some of which are immune inducible) and lysozyme (which is constitutive) [49]. CII-dlp and the other peptides shown to be present in subfraction HCII-II.11 (fig.1, labelled with asterisk) were also assayed for possible membrane lytic activity on hu-

man erythrocytes and ovarian insect cells obtained from *Spodoptera frugiperda* (cell line Sf9); in neither cases was disruptive activity recorded (data not shown). Taking together these results suggest that CII-dlp is preferentially active against bacterial cells, but whether CII-dlp acts like other invertebrate defensins, which display a membrane lytic activity [50–52], remains unclear. Further experiments are needed to explore if CII-dlp follows a similar mode of action.

Comparison of the amino acid sequence of CII-dlp with known invertebrate defensins

The CII-dlp sequence resembles the known scaffold of the invertebrate defensins and most scorpion toxins [17]. Several authors have proposed a close relationship between the primary structure of some scorpion toxins and invertebrate defensins [53, 54]. The results of BLAST and FASTA 3 searches grouped the CII-dlp sequence with both kinds of peptide, although with low scores. When all available sequences of short chain scorpion toxins (121 to

date) and invertebrate defensins (a total of 60) were taken into consideration for analysis, the alignment obtained with CLUSTAL_X [48] confidently clustered the CII-dlp sequence within defensins, whereas all the scorpion-venom-derived peptides were grouped with toxins (not shown). In figure 5, the CII-dlp sequence is aligned with other invertebrate defensins; this figure clearly shows that the only fully conserved residues are cysteines. Two main defensin groups can be identified on the basis of this alignment. The largest one includes defensins from different orders of the subclass Neoptera (Diptera, Coleoptera, Hemiptera and Hymenoptera), although the defensins from lepidoterans are more diverse. A second group, often referred to as ancestral, contains defensins from phylogenetically distant invertebrates (molluscs, arachnids and the dragonfly *Aeschna cyanea*) [1, 15, 20, 21, 34–36, 39]. This analysis reveals that the CII-dlp sequence is quite distant from both groups, but remains closer to the defensins than to the scorpion toxins.

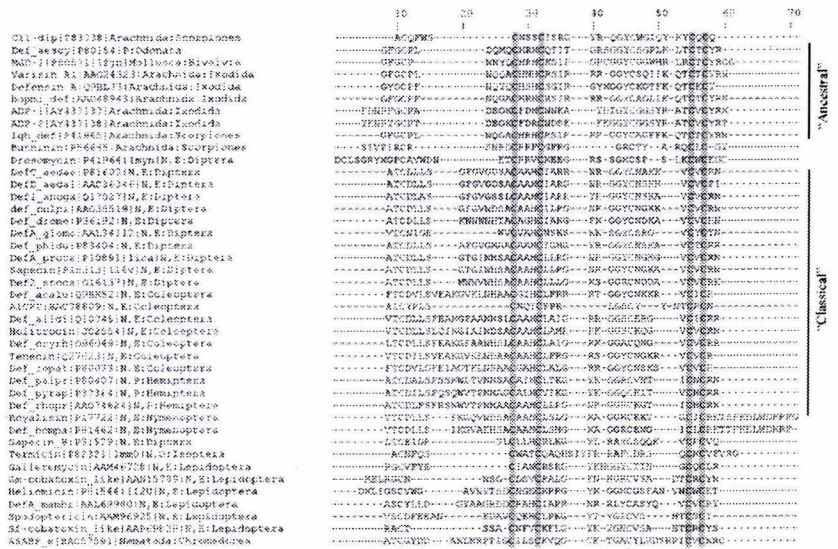


Figure 5. Multiple sequence alignment of some invertebrate defensins. Amino acid sequences of invertebrate defensins were retrieved from public databases and aligned with CLUSTAL_X [48]. Fully conserved amino acid residues are indicated by asterisks (*) below the alignment. Cys residues of the CS- α B motif signature sequence are grey shaded. Names, accession numbers and sources are indicated in the left column. In defensins from the class Insecta, the subclass (N, Neoptera; P, Palaeoptera), the infraclass (E, Endopterygota; O, Orthopteroidea; P, Paraneoptera) and the order are indicated. In defensins from other arthropods, only the class and order are indicated. For defensins from organisms of other phyla (molluscs and nematodes), the phylum and the class are indicated. Vertical lines on the right indicate the two main groups of invertebrate defensins: ancestral and classical.

Genomic organization of the CII-dlp gene and the evolution of the CS- $\alpha\beta$ structural family

The structure of the gene coding for CII-dlp, found in this work, seems similar to those of scorpion toxins. There is a signal peptide, interrupted by a short intron of variable length, followed by the sequence coding for the mature peptide and ending with a stop codon. Our results are consistent with the suggestion given by Froy and Gurevitz [55] for the gene encoding a defensin obtained from the North African scorpion *L. quinquistriatus hebraeus*, although these authors did not report any sequence or give any database reference useful to compare experimental results.

When comparing scorpion toxins and defensins with the CS- $\alpha\beta$ motif, due to their low sequence similarity (only cysteines were conserved at identical positions), it is difficult to make any valuable evolutionary predictions about the two types of peptides. However, taking into account the CII-dlp gene organization and the common conservation of the CS- $\alpha\beta$ signature among the two peptide groups, there does seem to be an evolutionary relationship between these two classes of peptide. The very wide phylogenetic distribution of defensins suggests that they might be the ancestors of the CS- $\alpha\beta$ motif-containing peptide family.

Defensin gene organization is highly variable both at the genomic and transcript levels. Apart from scorpion defensins, all the other cloned transcripts for defensins contain a pro-sequence [55, 56]. The pro-segment of the sequence in other arthropods is situated at the N-terminal side of the mature peptide, whereas in molluscs and nematodes the pro-segment is at the C-terminal side. Unfortunately, there is a reduced number of known genomic clones available for defensins, and yet they show great variability [55–58]. The tick defensin genes contain two introns, one in the signal peptide, the other at the pro-sequence; mussels have a single intron interrupting the signal peptide, and for some dipterans and lepidopterans an intron is situated at the pro-sequence. For *Drosophila* and other insects there are no introns. Such variations are hard to reconcile with a divergent evolutionary process, although they could be achieved as a result of exon-shuffling of the mature region, as recently proposed by Froy and Gurevitz [55].

Inducible liberation of CII-dlp in the context of invertebrate immune systems

Two previous reports on scorpion defensins [34, 35] showed that there is no difference in the level of these peptides when comparing the control with challenged animals. In both cases, the time elapsed between infection and haemolymph extraction was 1 week. These results could be contradictory to our report here. However, in our opinion this is not the case because different time intervals were used for the experiments. We performed a kinetic investigation with shorter time intervals. At 24 h,

the amount of CII-dlp was maximal, and this value decreased after 48 h (figs. 2A, 3). Thus, if measured 1 week later we would expect to find the same basal peptide level, as already reported for the other scorpion defensins. Our results on the relative amount of CII-dlp transcripts (mRNA measured by RT-PCR) also support the idea that this peptide is not synthesized in response to septic injury, but is, rather, liberated from a still uncharacterized cell reservoir. In this way, the systemic accumulation of CII-dlp is similar to that already reported for AMPs from horseshoe crab [3], mussels [32], shrimps [30, 31] and spiders [28, 29]. The phylogenetic variety of organisms whose innate immune responses depend on the systemic release of AMPs, independently of transcriptional regulation, suggests that this strategy is ancestral to that followed by recent insect orders [3, 5, 32]. In the latter, the AMPs are often transcriptionally inducible. However, there are other arachnids of the order Ixodida [36–39] as well as the distant nematodes Chromadorea [40], in which the response is also via transcriptional activation of AMP genes. Thus, the documented cases show two distinct strategies for immune activation in invertebrates, on the one hand, the liberation of AMPs, pre-stored in haemocytes, and on the other, the transcriptional activation of AMP genes. However, still not clear is whether an evolutionary relationship exists between the two strategies. Additional studies with phylogenetically diverse organisms are needed before a better and clearer idea of the evolutionary history of innate immune systems can be fully comprehended.

Acknowledgements. This work was partially supported by grant No. 40251-Q from the National Council of Science and Technology, Mexican Government to L. D. P. and scholarship to R. C. R. V. (134433). Additional grants came from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico of the National Autonomous University of Mexico (grant number IN 206003) to L. D. P. and from the Italian National Research Council to A. S. The authors would like to acknowledge Dr. J. Silva of Instituto Nacional de Salud Pública, Ministry of Health, Mexican Government, for the bacterial strains used in this study and advice with antibacterial assays. The expert assistance of Dr. C. Batista, B. Carrillo (INSP), F. Coronas and Dr. F. Zamudio is also greatly acknowledged.

- 1 Hetru C., Hoffmann J. A. and Hancock R. E. W. (2002) Insect cationic antimicrobial peptides. In: *Peptide Antibiotics*, pp. 117–144. Dutton C. J., Haxell M. A., McArthur H. A. I. and Wax R. G. (eds), Dekker, New York
- 2 Dimarcq J. L. and Hunneyball I. (2003) Pharma-entomology: when bugs become drugs. *Drug Discov. Today* **8**: 107–110
- 3 Iwanaga S. (2002) The molecular basis of innate immunity in the horseshoe crab. *Curr. Opin. Immunol.* **14**: 87–95
- 4 Dimopoulos G. (2003) Insect immunity and its implication in mosquito-malaria interactions. *Cell. Microbiol.* **5**: 3–14
- 5 Hoffmann J. A. (2003) The immune response of *Drosophila*. *Nature* **426**: 33–38
- 6 Hoffmann J. A., Kafatos F. C., Janeway C. A. and Ezekowitz R. A. (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**: 1313–1318

- 7 Kimbrell D. A. and Beutler B. (2001) The evolution and genetics of innate immunity. *Nat. Rev. Genet.* **2**: 256–267
- 8 Silverman N. and Maniatis T. (2001) NF- κ B signalling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev.* **15**: 2321–2342
- 9 Boman H. G. (1995) Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **13**: 61–92
- 10 Ganz T. and Lehrer R. I. (1999) Antibiotic peptides in higher eukaryotes: biology and applications. *Mol. Med. Today* **5**: 292–297
- 11 Hancock R. E. W. (2001) Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect. Dis.* **1**: 156–164
- 12 Zasloff M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**: 389–395
- 13 Kobayashi Y., Takashima H., Tamaoki H., Kyogoku Y., Lambert P., Kuroda H. et al. (1991) The cysteine-stabilized α -helix: a common structural motif of ion-channel blocking neurotoxic peptides. *Biopolymers* **31**: 1213–1220
- 14 Froy O. and Gurevitz M. (1998) Membrane potential modulators: a thread of scarlet from plants to humans. *FASEB J.* **12**: 1793–1796
- 15 Dimarcq J. L., Bulet P., Hetru C. and Hoffmann J. (1998) Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. *Biopolymers* **47**: 465–477
- 16 Thoma B. P., Cammue B. P. and Thevissen K. (2002) Plant defensins. *Planta* **216**: 193–202
- 17 Possani L. D., Merino E., Corona M., Bolívar F. and Becerril B. (2000) Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. *Biochimie* **82**: 861–868
- 18 Caldwell J. E., Abilgaard F., Dzikula Z., Ming D., Hellenkant G. and Merkley J. L. (1998) Solution structure of the thermostable sweet-tasting protein brazzein. *Nat. Struct. Biol.* **5**: 427–431
- 19 Zhao Q., Chae Y.K. and Markley J. L. (2002) Solution structure of ATTP, an *Arabidopsis thaliana* protease inhibitor. *Biochemistry* **41**: 12284–12296
- 20 Charlet M., Chernysh S., Philippe H., Hetru C., Hoffmann J. A. and Bulet P. (1996) Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *J. Biol. Chem.* **271**: 21808–21813
- 21 Hubert F., Noel T. and Roch P. (1996) A member of the arthropod defensin family from edible mediterranean mussels. *Eur. J. Biochem.* **240**: 302–306
- 22 Kato Y. and Komatsu S. (1996) ASABF: a novel cysteine-rich antibacterial peptide isolated from the nematode *Ascaris suum*: purification, primary structure, and molecular cloning of cDNA. *J. Biol. Chem.* **271**: 30493–30498
- 23 Kato Y., Aizawa T., Hoshino H., Kawano K., Nitta K. and Zhang H. (2002) abf-1 and abf-2, ASABF-type antimicrobial peptide genes in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. J.* **361**: 221–230
- 24 Andersson M., Boman A. and Boman H. G. (2003) *Ascaris* nematodes from pig and human make three anti-bacterial peptides: isolation of cecropin P1 and two ASABF peptides. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**: 599–606
- 25 Boman H. G., Faye I., Gudmundsson G. H., Lee J. Y. and Lidholm D. A. (1991) Cell-free immunity in *Cecropia*: a model system for antibacterial proteins. *Eur. J. Biochem.* **201**: 23–31
- 26 Yamakawa M. and Tanaka H. (1999) Immune proteins and their gene expression in the silkworm, *Bombyx mori*. *Dev. Comp. Immunol.* **23**: 281–289
- 27 Aksoy S., Gibson W.C. and Lehane M. J. (2003) Interactions between tsetse and trypanosomes with implications for the control of trypanosomiasis. *Adv. Parasitol.* **53**: 1–83
- 28 Lorenzini D. M., Silva P. I. da, Fogaca A. C., Bulet P. and Daffre S. (2003) Acanthoscurrin: a novel glycine-rich antimicrobial peptide constitutively expressed in the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Dev. Comp. Immunol.* **27**: 781–791
- 29 Lorenzini D. M., Fukuzawa A. H., Silva P. I. da, Machado-Santelli G., Bijovsky A. T. and Daffre S. (2003) Molecular cloning, expression analysis and cellular localization of gomesin, an anti-microbial peptide from hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **33**: 1011–1016
- 30 Destoumieux D., Munoz M., Bulet P. and Bachere E. (2000) Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). *Cell. Mol. Life Sci.* **57**: 1260–1271
- 31 Munoz M., Vandenbulcke F., Saulnier D. and Bachere E. (2002) Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. *Eur. J. Biochem.* **269**: 2678–2689
- 32 Mitta G., Vandenbulcke F. and Roch P. (2000) Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Lett.* **486**: 185–190
- 33 Lamberty M., Zachary D., Lanot R., Bordereau C., Robert A., Hoffmann J. A. et al. (2001) Constitutive expression of a cysteine-rich antifungal and a linear antibacterial peptide in a termite insect. *J. Biol. Chem.* **276**: 4085–4092
- 34 Cociancich S., Goyffon M., Bontems F., Bulet P., Bouet F., Menez A. et al. (1993) Purification and characterization of a scorpion defensin, a 4 kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insect defensins and scorpion toxins. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **194**: 17–22
- 35 Ehret-Sabatier L., Loew D., Goyffon M., Fehlbaum P., Hoffmann J. A., Dorsseleer A. van et al. (1996) Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. *J. Biol. Chem.* **271**: 29537–29544
- 36 Nakajima Y., Goes van Naters-Yasui A. van der, Taylor D. and Yamakawa M. (2002) Antibacterial peptide defensin is involved in midgut immunity of the soft tick, *Ornithodoros moubata*. *Insect Mol. Biol.* **11**: 611–618
- 37 Ceraul S. M., Soneshin D. E., Ratzlaff R. E. and Hynes W. L. (2003) An arthropod defensin expressed by the hemocytes of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **33**: 1099–1103
- 38 Nakajima Y., Saïdo-Sakanaka H., Taylor D. and Yamakawa M. (2003) Up-regulated humoral immune response in the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Parasitol. Res.* **91**: 476–481
- 39 Lai R., Lomas L. O., Jonecy J., Turner P. C. and Rees H. H. (2004) Two novel non-cationic defensin-like peptides from haemolymph of the female tick, *Amblyomma hebraeum*. *Biochem. J.* **379**: 681–685
- 40 Pillai A., Ueno S., Zhang H. and Kato Y. (2003) Induction of ASABF (*Ascaris suum* antibacterial factor)-type antimicrobial peptides by bacterial injection: novel members of ASABF in the nematode *Ascaris suum*. *Biochem. J.* **371**: 663–668
- 41 Kuhn-Nentwig L. (2003) Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**: 2651–2668
- 42 Hetru C. and Bulet P. (1997) Strategies for the isolation and characterization of antimicrobial peptides of invertebrates. *Methods Mol. Biol.* **78**: 35–49
- 43 Hultmark D., Steiner H., Rasmuson T. and Boman, H. G. (1980) Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.* **106**: 7–16
- 44 National Committee of Clinical and Laboratory Standards (1993) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically 3rd edn., Approved standard, NCCLS document M7-A3, Villanova, Pennsylvania
- 45 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
- 46 Hanju M., Acklin C., Kenney W. C. and Rohde M. F. (1994) Direct assignment of disulfide bonds by Edman degradation of selected peptide fragments. *Int. J. Pept. Protein Res.* **43**: 81–86
- 47 Allegretti S., Scatoni A., Ferrara L., Pesi R., Pinna P., Sgarrella F. et al. (2001) Bovine cytosolic 5'-nucleotidase acts through

- the formation of an aspartate 52-phosphoenzyme intermediate. *J. Biol. Chem.* **276**: 33526–33532
- 48 Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F. and Higgins D.G. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4876–4882
- 49 Yan H. and Hancock R. E. W. (2001) Synergistic interactions between mammalian antibacterial defense peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 1558–1560
- 50 Cociancich S., Ghazi A., Hetru C., Hoffmann J. A. and Letellier L. (1993) Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *J. Biol. Chem.* **268**: 19239–19245
- 51 Nakajima Y., Ishibashi J., Yukuhiro F., Asaoka A., Taylor D. and Yamakawa M. (2003) Antibacterial activity and mechanism of action of tick defensin against Gram-positive bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1624**: 125–130
- 52 Takehuchi K., Takahashi H., Sugai M., Iwai H., Kohno T., Sekimizu K. et al. (2004) Channel-forming membrane permeabilization by an antibacterial protein: sapecin determination of membrane-buried and oligomerization surfaces by NMR. *J. Biol. Chem.* **279**: 4981–4987
- 53 Legros C., Ceard B., Bougis P. E. and Martin-Eauclaire M. F. (1998) Evidence for a new class of scorpion toxins active against K⁺ channels. *FEBS Lett.* **431**: 375–380
- 54 Zhu S., Li W., Jiang D. and Zeng X. (2000) Evidence for the existence of insect defensin-like peptide in scorpion venom. *IUBMB Life* **50**: 57–61
- 55 Froy O. and Gurevitz M. (2003) Arthropod and mollusk defensins – evolution by exon-shuffling. *Trends Genet.* **19**: 684–687
- 56 Zhang H. and Kato Y. (2003) Common structural properties specifically found in the CS $\alpha\beta$ -type antimicrobial peptides in nematodes and mollusks: evidence for the same evolutionary origin? *Dev. Comp. Immunol.* **27**: 499–503
- 57 Mandrioli M., Bugli S., Saltini S., Genedani S. and Ottaviani E. (2003) Molecular characterization of a defensin in the IZD-MB-0503 cell line derived from immunocytes of the insect *Mamestra brassicae* (Lepidoptera). *Biol. Cell.* **95**: 53–57
- 58 Volkoff A. N., Rocher J., d'Alencón E., Bouton M., Landais I., Quesada-Moraga E. et al. (2003) Characterization and transcriptional profiles of three *Spodoptera frugiperda* genes encoding cysteine-rich peptides: a new class of defensin-like genes from lepidopteran insects? *Gene* **319**: 43–53.



To access this journal online:
<http://www.birkhauser.ch>

7.3 RESULTADOS Y DISCUSION (Datos no Publicados)

Defensina *Cll-dlp* de *Centruroides limpidus limpidus*

En los experimentos de TAIL-PCR en el gene *Cll-dlp* se utilizaron los oligonucleótidos referidos en la tabla 6. Para esta metodología el uso del oligonucleótido 17 como secuencia degenerada arbitraria (AD1); éste fue el oligonucleótido más eficiente respecto a otros oligonucleótidos AD referidos en la literatura (el resto de los oligonucleótidos AD no permitieron amplificación de los fragmentos buscados). La ubicación de los oligonucleótidos y la amplificación de los productos está indicada esquemáticamente en la figura 12. La combinación del oligonucleótido 17 con los oligonucleótidos 2 y 3 en la reacción primaria del TAIL-PCR permitió la obtención de fragmentos primarios, estos fragmentos fueron utilizados como DNA templado en las reacciones secundaria (usando oligonucleótidos 17 y 7), posteriormente los fragmentos de la reacción secundaria se utilizaron en la reacción terciaria (oligonucleótidos 17 y 6). El uso de los oligonucleótidos 6 y 7 sólo permitieron el enriquecimiento de secuencias correspondientes al péptido señal y dieron como resultado la obtención de tres distintas regiones corriente arriba denominadas secuencias B, C y D (figura 12). Estas regiones no corresponden a la región 5´-no traducida del cDNA del gene *Cll-dlp* obtenida en el RACE 5´, pero sí corresponden a la secuencia del péptido señal, estas secuencias fueron inespecíficas.

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para las regiones corriente arriba obtenidas a partir del TAIL-PCR de *Cll-dlp* (secuencias B, C y D no mostradas), estos oligonucleotidos fueron utilizados en conjunto con los oligonucleotidos 2, 3 y 8 pero no se logró obtener la amplificación de las regiones correspondiente al péptido maduro de *Cll-dlp*. Al parecer estas secuencias presentan similitud en la región 5´ del gene y posiblemente también con similitud en el intrón de la defensina *Cll-dlp* (parte de la secuencia del los oligonucleótido 7 se ubicó en esta región) por lo que se explica su amplificación inespecífica empleando secuencias del gene. Nuestros resultados no permitieron obtener la región corriente arriba del gene *Cll-dlp*.

Defensina *Scorpine* de *Pandinus imperator*

La secuencia obtenida a partir del cDNA de *Scorpine* nos permitió caminar en fragmentos del genoma y obtener parte de la secuencia correspondiente al intrón (~400 pb). El intrón se ubica después de la región del péptido señal e interrumpe aminoácido cuatro de la región madura del péptido de *Scorpine* (secuencia E, figura 12). Se realizaron otros experimentos de TAIL-PCR además de amplificación normal (con oligonucleotidos 9, 11, 17, 12, 13, 14 y 15) para la obtención de la secuencia completa del intrón (secuencia F, figura 12), se empleó la estrategia seguida para el gene *Cll-dlp*.

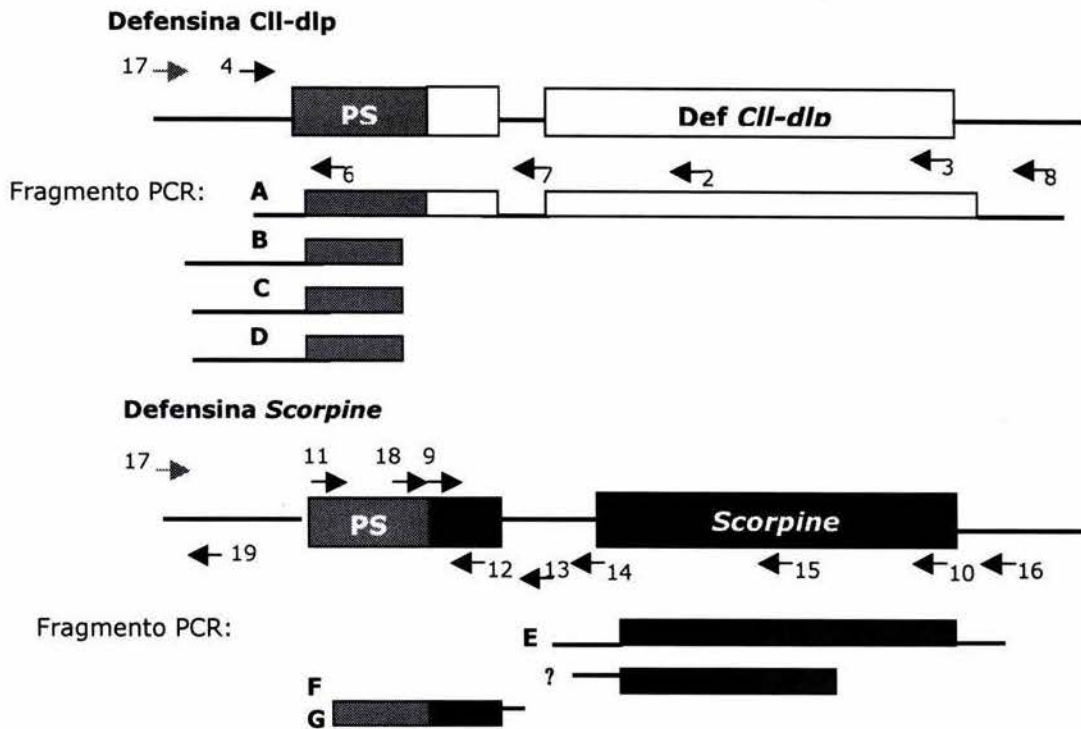


Figura 12. Esquema representativo de las secuencias que muestran las secuencias genómicas obtenidas de las defensinas *Cll-dlp* y *Scorpine*. En los recuadros se ejemplifica los genes *Cll-dlp* y *Scorpine*; PS, péptido señal; los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de fragmentos genómicos (tabla 6). Las letras de la izquierda indican la inicial o nombre asignado a los fragmentos obtenidos (A, B, C, D, E, F y G).

Las secuencias genómicas de *Scorpine* obtenidas en este trabajo presentaron similitud con módulos o regiones reportadas en el DNA genómico que corresponden al intrón y que interrumpe la región posterior al péptido señal en el aminoácido cuatro del péptido maduro (figura 13). La figura 13 muestra el alineamiento de la clona genómica de *Scorpine* (clona 30) comparada con la secuencia reportada para opiscorpina del alacrán africano *Opisthophthalmus carinatus*, el tamaño del intrón de opiscorpina fue reportado en 1160 pb (Zhu & Tytgat, 2004). Estas secuencias intrónicas presentan un contenido de A+T mayor al 50% como fue observado en intrones de opiscorpinas (Zhu & Tytgat, 2004) y genes de las toxinas de alacrán (Becerril et al., 1997; Legros et al., 1997; Froy et al., 1999).

Los experimentos de TAIL-PCR con el gene de *Scorpine* mostraron más de una secuencia correspondiente al intrón (figura 14). Las regiones amplificadas obtenidas muestran la región que corresponde a la secuencia del péptido maduro residuo 5-27 (69 pb, fragmento F, figura 12), esta región es idéntica en las dos secuencias obtenidas (ver letras negras, figura 14), este resultado puede significar la existencia de un nuevo gene de *Scorpine*. Nuestro resultado es similar al obtenido en los genes de opiscorpinas (Zhu & Tytgat, 2004),

donde se encontraron cuatro genes homólogos. Las regiones correspondientes al intrón entre estos genes de opiscorpina son diferentes, mientras que la región que codifica a la secuencia madura del péptido solo muestra pequeñas diferencias en algunos residuos a nivel de péptido maduro; nuestras secuencias mostraron homología a las secuencias de opiscorpinas (figuras 13 y 14).

```

Scorpine -----
TAILScor30 -----ggccgcac-tagtgattcgtgg-
Opiscor      gcagaattgctagatatgatatttttcttaacttgttgcatacagtcagtgaaaaga

Scorpine -----
TAILScor30  -gcactagatc[tattt]gagcatttggcatatatatagccgtc---acctcta--cgcaa
Opiscor      agttctgaattt[taat]-ataatttgc[actt]ccttatcttaacaaaactgtagttgtg

Scorpine -----
TAILScor30  acctc[tacttat]-----[taatcta]-tgccttca----tagatgataaa[actaact]t
Opiscor      attatt[acttat]aggtg[taactaa]taacttccaattttaaataat[acg]taaat[ctg]

Scorpine -----
TAILScor30  -tatagatgtgtacgataataggatcaataaaaata----gacgcacaacatt--gcacg
Opiscor      acggaacatccacgttgtcccacttgcctggattctgtactgtacggcagtaagcgca

Scorpine -----
TAILScor30  ttgtcctgctgtcc[aggattt]tctt[ct]-----[cgttt]gcttgc[tattaat]gggtta
Opiscor      gtattgtattgtat[gtattt]cctt[ct]atgcct[ct]gtttt]gcttgc[tatta]-tgggtca

Scorpine -----
TAILScor30  [ttttataggcagaacatac-caagttaactactattttctctttcc]agACGAAGAGAAGA
Opiscor      [ttttatagtc-gaacatactcaagttaattactattt-ctctttcc]agATGAAAAAGTA
                                     E E K
                                     -ACGAAGAGAAGA
                                     agACGAAGAGAAGA
                                     agATGAAAAAGTA
                                     * * * * *

I Q K K I D E R M G G N T V L G G M A K A
Scorpine    TTCAAAAGAAAATTGACGAGAGAATGGGAAATACTGTCCTTGGAGGAATGGCTAAGGCCGA
TAILScor30 TTCAAAAGAAAATTGACGAGAGAATGGGAAATACTGTCCTTGGAGGAATGGCTAAGGCCGA
Opiscor    TTCAAAACAAAATTGACGAGAAAATAGGAAAAAATTCCTTGGAGGAATGGCTAAGGCCG
          *****

I V H K M A K N E F Q C M A N M D M L G
Scorpine    TTGTCCACAAAATGGCGAAGAACGAATTTCAATGCATGGCTAACATGGATATGTTGGGAA
TAILScor30 TCGTCCACAAAATGGCGAAGAACGAATTTCAATGCATGGCTAACATGGATATGTTGGGAA
Opiscor    TCGTCCACAAAATGGCGAAGAACGAATTTCAATGCATGGCTAACATGGATATGACGAAAA
          * ***** ** **** * * ***** * **

N C E K H C Q T S G E K G Y C H G T K
Scorpine    ATTGCGAAAAGCACTGCCAAACATCA---GGTGAAAAGGATACTGTCACGGTACTAAAT
TAILScor30 ATTGCGAAAAGCACTGCCAAACATCA---CGTGAAAAGGATACTGTCACGGTACTAAAT
Opiscor    GTTGCACACGCACTGCCAGAAAGCAAGCGGTGAAAAGGATACTGCCACGGTACCAAT
          ***** * ***** * * ** ***** ***** ****

C K C G T P L S Y stop
Scorpine    GCAAGTGTGGAACGCCCTTATCTTATTAA
TAILScor30 GCAAGTGTGGAACGCCCTTATCTTATTAA
Opiscor    GCAAGTGTGGAGTACCATTGTCTTATTAA
          ***** ** * * * *****

```

Figura 13. Comparación de secuencias de DNA genómico de *Scorpine* (clona 30) y Opiscorpine 3. Las letras negritas muestran la secuencia de aminoácidos del péptido maduro de *Scorpine* desde el residuo glutámico cinco; los asteriscos de la parte baja corresponden a los nucleótidos iguales en la secuencia de DNA; los módulos de secuencias con alta similitud en la región correspondiente al intrón son resaltadas en recuadros.

```

3.Opiscor      aaaaaatgcatcgcaaacagcttttaattgcatacaaatTTATAacttCGTgctaAAAA
4.TAILScor17  acatccgcgcgcttaatgCGcgcgtacagggcgcgtccattCGCCA-ttcaggctgcgca

3.Opiscor      aagccgtgcatcagaaaaataatgatggtatagaaatcgaagcaatggcAAAagaacg
4.TAILScor17  actgtgggaaggcgatcggTcgggcctcttcgctattacgccagctggcgaaagggg

3.Opiscor      attgtcattgttacgtaataactgacgTcacgataattgTtacgtagtgataacattaat
4.TAILScor17  atgtgctgcaaggcg-attaagTgggtaacgccagggTttccagTcacgacgTtga

3.Opiscor      gcagaattgctagatatgatatttttct-taaactgTttgcatacagTcagTgaaaag
4.TAILScor17  aacgacggccagTgaattgtaatacgaTctactataggcggaattgggcccgaCgTcgc

2.TAILScor30  -----ggccgcactagtgattcGctgggcactagatcttattgagcatttgGcatata
3.Opiscor      aagTtctgaatttataataatttgcaacttCcttatcttaacaaaactgtagTtgTg
4.TAILScor17  atgctcccgcgcc---atggccgcgggattagTcgagagcagcaagTaaCgTacgTgcg

2.TAILScor30  tatatgCCgtcacctctacgcaaaccttacttattaatctatgCCcttcatagatgata
3.Opiscor      attattacttataggTgataaaactaaacttccaattttaaataatacGattaatTg
4.TAILScor17  ccaataaattagTgcca-gcggaccttacttattaatt--atcccttatagTatgata

2.TAILScor30  aaactaaCTtttatagatgTgtacgataataggatcaaataaaata-gacgcacaacatt
3.Opiscor      acggaacatccagTtGtcccacttgccctggattctgTactgTcggcagTaaGcgca
4.TAILScor17  aaactaaCTtttatagT-ttgcgataatacggatctaaataaaata--gacgcgaacatt

2.TAILScor30  gcacgtTgtcctgTgTcctagGatTTtcttcttGtttGctTgctattaatgggTtat
3.Opiscor      gtattgtattgtattgtatttCcttctatgCctctGtttGctTgctatta-tgggTcat
4.TAILScor17  gcacgtTgtcctgTgTcctagGatTTtcttcttGtttCcttGctattaatgggTtat

1.Scorpine    -----ACGAAGAGAAGAT
2.TAILScor30  tttataggcagaacataccaagTtaactac-tattttctctttccagACGAAGAGAAGAT
3.Opiscor      tttatagTcgaacatactcaagTtaactac-tattt-ctctttccagATGAAAAAAGTAT
4.TAILScor17  tttatagTtgaacata-ccaagTtaactacattttctctttccagACGAAGAGAAGAT
                                     *** * * **
                                     +69

```

Figura 14. Comparación de secuencias de *Scorpine* obtenidas por TAIL-PCR provenientes de DNA genómico de *P. imperator*. 1, secuencia de cDNA de scorpine; 2 y 4 muestran las dos variantes de secuencias de *Scorpine* obtenidas por TAIL-PCR genómico, clonas 30 y 17; 3, secuencia de opiscorpina de *Opisthoptalmus carinatus* (AY423487). Los asteriscos representan los nucleótidos idénticos que se encuentran en la secuencia del péptido maduro. El número ubicado bajo los asteriscos indica el nucleótido +69 de la región correspondiente al péptido maduro, aminoácido glutámico (E5, figura 14). Las regiones de intrón con alto grado de similitud son resaltadas en recuadros. Las letras negritas muestran el sitio aceptor del "splicing".

La amplificación de productos de PCR usando el oligonucleótido 18 y los oligonucleótidos 10, 15 y 16 permitieron la obtención de dos secuencias de aproximadamente 600 pb (fragmento G, figura 12 y 15); éstas corresponden a una parte del péptido señal (5 residuos) y la posible región del intrón. Las secuencias de los fragmentos F, clonas 17 y 30 de *Scorpine* no muestran traslapes con los tres fragmentos G obtenidos.

La similitud de las regiones de intrones observadas en opiscorpina es del 70% entre las cuatro secuencias genómicas reportadas (Zhu & Tytgat, 2004). La comparación con la secuencia de opiscorpina muestra algunos módulos de secuencia con similitud (figura 14). Si los fragmentos F y G corresponden a parte de las secuencias completas podemos especular

Los intrones de genes de componentes del veneno presentan tamaños y disposición variable (figura 16). Becerril et al. (1997), hacen una revisión detallada de algunos componentes del veneno de alacranes del género *Tityus* en las que resaltan 16 diferentes péptidos específicos para canales de sodio y cinco que afectan canales de potasio, posteriormente se han generado otros reportes sobre los componentes peptídicos del veneno. Sin embargo, como ya se mencionó, la toxina Ts1 (gama, figura 1) fue la primera secuencia que mostró la organización de un gen en el género *Tityus* (Becerril et al., 1997). La organización de este gene muestra en su secuencia genómica dos exones interrumpidos por un intrón de 475 pb, este intrón que interrumpe la región correspondiente al péptido señal se ubica seis residuos antes del aminoácido +1 del péptido maduro (figura 16).



Figura 16. Organización de genes de alacrán en base a las secuencia nucleotídica de DNA genómico que codifican toxinas y defensinas de alacrán. A, KTX₂ de *Androctonus australis* (Legros et al., 1997); B, Ts1 (Becerril et al., 1993); C, *Cil-dlp* (este trabajo); D, Opiscorpine (Zhu & Tytgat 2004); E, *Scorpine* (este trabajo). Las regiones en gris con letra negra corresponden al péptido señal; la secuencia madura de cada péptido es resaltada en letra blanca; Los triángulos invertidos de la parte superior muestran la interrupción de la secuencia del cDNA por el intrón y el tamaño en nucleótidos según la secuencia genómica reportada.

Se han reportado diferentes sitios potenciales para regiones donador y aceptor del procesamiento "splicing", GG/AT, TA/AT y el sitio consenso GT/AG (Zhu et al., 2001; Froy & Gurevitz, 2003). Éste último sitio consenso de procesamiento fue observado en las secuencias genómicas de las toxinas KTX₂ y Ts1, defensinas *Cil-dlp* y opiscorpinas, así como en la región 3'-aceptor "splicing" de la *Scorpine* obtenida en este trabajo (figura 14).

Las defensinas *Scorpine* y *Cil-dlp* mostraron un patrón característico de los genes de defensinas de alacrán, contienen un intrón en su secuencia genómica. El gene *Cil-dlp* se interrumpe en la región del péptido señal, mientras que el gene de *Scorpine* muestra su intrón en la región de inicio correspondiente al péptido maduro (figura 14). Esta organización puede observarse en otros componentes del veneno de alacranes como los indicados en la figura 16.

La organización genómica de toxinas y defensinas contribuye al estudio de los mecanismos de regulación y expresión de los componentes del veneno. Se ha especulado

que todas las neurotoxinas que afectan canales de sodio divergen de un ancestro común (revisado Froy & Gurevitz, 2003), además se mantiene el motivo estructural común llamado alfa hélice estabilizado por cisteínas (Céard et al., 2001). En nuestro trabajo, la organización similar entre algunas toxinas y defensinas involucra probablemente el mismo gene ancestral, por eso las características estructurales observadas por Zhu y Tytgat (2004), al modelar regiones de defensina y toxinas de canales de potasio, mostró una estructura similar.

Este trabajo contribuye en la obtención de secuencia genómicas, las cuales a futuro permitirán complementar relaciones filogenéticas de la familia *Buthidae* y arácnidos, explicando de manera más clara la divergencia, convergencia, estructura, actividades y la relación entre los procesamientos de secuencias peptídicas y nucleotídicas como las observadas en esta tesis.

7.4 CONCLUSIÓN

Las técnicas utilizadas en esta parte del trabajo permitieron encontrar las secuencias parciales correspondientes a los intrónes de las defensinas *Cll-dlp* y *Scorpine*.

La obtención de secuencias homólogas puede representar la existencia de más genes con alta similitud a la *Scorpine*. La existencia de secuencias homólogas pueden corresponder a pseudogenes o genes con regiones similares al péptido señal y región madura que podrían caracterizar a la familia génica donde se incluyen los genes estudiados en este trabajo.

Nuestro trabajo permite especular acerca de las relaciones filogenéticas más estrechas entre defensinas y toxinas de canales de potasio; el linaje de estas últimas posteriormente diversificó a las toxinas α KTx, β KTx y toxinas de canales de sodio.

REFERENCIAS

- Andrade, M.V., Caramaz, M.P.R., Abreu, E.M.N.N., Dolnikoff, M., Omar E.D., Velasco, I.T., Cunha-Melo, J.R., 2004. Lung compliance, plasma electrolyte and acid-base balance are affected by scorpion envenomation in anesthetized rats under mechanical ventilation. *Commun. Biochem. Physiol.* 138:97-104.
- Barona, J., Otero, R., Núñez, v., 2004. Toxicological and immunological aspects of scorpion venom (*Tityus pachyurus*): neutralizing capacity of antivenoms produced in Latin America. *Biomedica* 24:42-49.
- Batista, C.V.F., Del Pozo, L., Zamudio, F.Z., Contreras, S., Becerril, B., Wanke, E., Possani, L.D., 2004. Proteomics of the venom from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of prolines on mass spectrometry analysis. *J. Chromatography B* 803:55-66.
- Batista, C.V.F., Gómez-Lagunas, F., Rodríguez de la Vega, R.C., Hadju, P., Panyi, G. Gáspár, R. and Possani, L.D., 2002. Two novel toxins from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* that block Kv1.3 and Shaker B K⁺-channels with distinctly different affinities. *Biochim. Biophys. Acta* 1601:123-131.
- Becerril, B., Corona, M., Coronas, García, C., Bolívar, F., Possani, L.D., 1995. Cloning of genes encoding scorpion toxins: an interpretative review. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 14:339-357.
- Becerril, B., Corona, M., Coronas, F.I.V., Zamudio, F.Z., Calderon-Aranda, E.S., Fletcher, P.L., Jr, Martin, B.M., Possani, L.D., 1996. Toxic peptides and genes encoding gamma toxin of the Brazilian scorpions *Tityus bahiensis* and *Tityus stigmurus*. *Biochem. J.* 313:753-760.
- Becerril, B., Corona, M., Mejía, M.C., Martin, B.M., Lucas, S., Bolívar, F., Possani, L.D., 1993. The genomic region encoding toxin gamma from the scorpion *Tityus serrulatus* contains an intron. *FEBS Letters* 335:6-8.
- Becerril, B., Marangoni, S., Possani, L.D., 1997. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*: a review. *Toxicon* 35:821-835.
- Bechis, G., Sampieri, F., Yuan, P.M., Brando, T., Martin, M.F., Diniz, C.R., Rochat, H., 1984. Amino acid sequence of toxin VII, a beta-toxin from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122:1146-1153.
- Borges, A., Alfonzo, M.J., Garcia, C., Winand, N., Leipold, E., Heinemann H., 2004. Isolation, molecular cloning and functional characterization of a novel β -toxin from Venezuelan scorpion, *Tityus zuliaanus*. *Toxicon* 43:671-684.
- Bradbury, A.F., Finnie, M.D.A., Smyth, D.G., 1982. Mechanism of C-terminal amide formation by pituitary enzymes. *Nature* 298:686-688.
- Bulet, P., Stöcklin, R., Menin, L., 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological Rev.* 198: 169-184.
- Blair, J.E., Shah, P., Hedges, S.B., 2005. Evolutionary sequence analysis of complete eucaryote genomes. *BMC Bioinformatics* 11:53
- Cao, Z.Y., Mi, Z.M., Cheng, G.F., Shen, W.Q., Xiao, X., Liu, X.M., Liang, X.T., Yu, D.Q., 2004. Purification and characterization of a new peptide with analgesic effect from the scorpion *Buthus martensi* Karch. *J. Peptide Res.* 64:33-41.
- Carbone, E., Wanke, E., Prestipino, G., Possani, L.D., Maelicke, A., 1982. Selective blockage of voltage-dependent K⁺ channels by a novel scorpion toxin. *Nature* 296:90-1.
- Catterall, W.A., Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:521-555
- Céard, B., Martin-Eauclaire, M.F., Bougis, P.E., 2001. Evidence for a position-specific deletion as an evolutionary link between long- and short-chain scorpion toxins. *FEBS L.* 494:246-248.
- Cestele, S. & Catterall, W.A., 2000. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* 9-10:883-892
- Chavez-Olortegui, C., Kalapothakis, E., Ferreira, A.M., Ferreira, A.P., Diniz, C.R., 1997. Neutralizing capacity of antibodies elicited by a non-toxic protein purified from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon* 35: 213-221
- Chavez-Olortegui C., Molina F., C. Granier, 2002. Molecular basis for the cross-reactivity of antibodies elicited by a natural anatoxin with α - and β -toxins from the venom of *Tityus serrulatus* scorpion. *Mol. Immunol.* 38:867-876.
- Conde, R., Zamudio, F.Z., Rodríguez, M.H., Possani, L.D., 2000. Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Lett.* 471:165-168.
- Coronas, F.V., de Roodt, A.R., Olamendi-Portugal, T., Zamudio, F.Z., Batista, C.V., Gómez-Lagunas, F., Possani, L.D., 2003. Disulfide bridges and blockage of Shaker B K⁺-channels by another butantoxin peptide purified from the Argentinean scorpion *Tityus trivittatus*. *Toxicon* 41:173-179.
- Corzo, G., Escoubas, P., 2003. Pharmacologically active spider peptide toxins. *Cell Mol. Life Sci.* 60:2409-2426.
- Corzo, G., Escoubas, P., Villegas, E., Barnham, K., He, W., Norton, R.S., 2001. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochem. J.* 359:35-45.

- Dahesa-Davila, M., Ramirez, A.N., Zamudio, F.Z., Gurrola-Briones, G., Lievano, A., Darszon, A., Possani, L.D., 1996. Structural and functional comparison of toxin from the venom of the scorpions *Centruroides infamatus infamatus*, *Centruroides limpidus limpidus* and *Centruroides noxius*. *Comp. Biochem. Physiol.* 113:331-339.
- Diego-García, E., Batista, C.V.F., García-Gómez, B.I., Lucas, S., Candido, D.M., Gómez-Lagunas F., Possani, L.D., 2005. The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: genes, peptides and functions. *Toxicon* 45: 273-283.
- Del Pozo, E.C., 1948. Los efectos musculares del veneno de escorpiones mexicanos. *Bol. Inst. Est. Med. Biol.* 6:59-69.
- Desbrosses, G.G., Kopka, J., Udvardi, M.K., 2005. Lotus japonicus metabolic profiling. Development of gas chromatography-mass spectrometry resources for the study of plant-microbe interactions. *Plant Physiol.* 137:1302-1318.
- Drew, J.E., Rucklidge, G.L., Duncan, G., Lufty, A., Farquharson, A.J. Reid, M.D., Russell, W.R., Morrice, P.C., Arthur J.R., Duthie, G.G., 2005. A proteomics approach to identify changes in protein profiles in pre-cancerous colon. *Biochem Biophys Res. Commun.* 330:81-87.
- D'Suze, G., Corona, F., Possani, L.D., Sevcik, C., 1996. High performance liquid chromatography purification and amino acid séquence of toxins from the muscarinic fraction of *Tityus discrepans* scorpion venom. *Toxicon* 34: 591-598.
- D'Suze, G., Zamudio, F., Gómez-Lagunas, F., Possani, L.D., 1999. A novel K⁺ channel blocking toxin from *Tityus discrepans* scorpion venom. *FEBS Letters* 456:146-148.
- D'Suze, G., Batista C.V.F., Frau, A., Murgia, A.R., Zamudio, F.Z., Sevcik, C., Possani, L.D., Prestipio, G., 2004. Discrepin, a new peptide of the sub-family α -Ktx15, isolated from the scorpion *Tityus discrepans* irreversibly blocks K⁺-channels (I_A currents) of cerebellum granular cells. *ABB* 430:256-263.
- D'Suze, G., Salazar, V., Díaz, P., Sevcik, C., Azpurua, H., Bracho, N., 2004. Histopatological changes and inflammatory response induced by *Tityus discrepans* scorpion venom in rams. *Toxicon* 44:851-860.
- D'Suze, G., Sevcik, C., Corona, M., Zamudio, F.Z., Batista, C.V.F., Coronas, F.I., Possani, L.D., 2004. Ardiscretin a novel arthropod-selective toxin from *Tityus discrepans* scorpion venom. *Toxicon* 43:263-272.
- Engstrom Y., Loseva, O., Theopold, U., 2004. Proteomics of the Drosophila immune response. *Trends Biotechnol.* 22 (11):600-605.
- Fet, V., Sissom, W.D., Lowe, G., Braunwalder, M.E., 2000. Catalog of the scorpions of the World (1758-1998). The New York Etimological Society, New York, 2000.
- Froy, O., Gurevitz, M., 2003. Arthropod and mollusk defensins-evolution by exon-shuffling. *Trends Genet.* 19:684-687.
- Froy, O., Gurevitz, M., 2004. Arthropod defensins illuminate the divergence of scorpion neurotoxins. *J. Pept. Sci.* 10:714-718.
- Froy, O., Sagiv, T., Poreh, M., Urbach, D., Ziberberg, N., Gurevitz, M., 1999. Dynamic Diverification from a putative common ancestor of scorpion toxins affecting sodium, potassium and chloride channels. *J. Mol. Evol.* 48:187-196.
- Fukuhara, Y.D.M., Dellalibera-Joviliano, R., Cunha, F.Q.C., Reis, M.L., Donadi, E.A., 2004. The kinin system in the envenomation caused by the *Tityus serrulatus* scorpion sting. 196:390-395.
- Gordon, D., 1997. Sodium channels as targets for neurotoxins: mode of action and interaction of neurotoxins with receptor sites on sodium channels. In Toxin and Signal Transduction (Gutman, Y. & Lazarovici, P., eds), pp. 119-149, Harwood Press, Amsterdam.
- Gomez, M.V., Diniz, C.R., 1996. Separation of toxic components from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* venom. *Mem. Inst. Butantan* 33, 899-902.
- Hancock, R.E.W., Lehrer, R., 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.* 16:82-88.
- Holaday, S.K,Jr, Martin, B.M., Fletcher, P.L.,Jr, Krishna, N.R., 2000. NMR solution structure of butantoxin. *Arch. Biochem. Biophys.* 379:18-27.
- Karbat, I, Frolow, F., Froy, O., Gilles, N., Cohen, L., Turkov, M., Gordon, D., Gurevitz, M., 2004. Molecular basis of the high insecticidal potency of scorpion α -toxins. *J. Biol. Biochem.* 279:31679-31686.
- Klaiber, K., Williams, N., Roberts, T.M., Papazian, D.M., Jan, L.Y., Miller, C., 1990. Functional expression of Shaker K⁺ channels in a baculovirus-infected insect cell line. *Neuron* 5, 221-226.
- Kuhn-Nentwig, L., Schaller, J., Nentwig, W., 2004. Biochemistry, toxicology and ecology of venom of the spider *Cupiennius salei* (Ctenidae). *Toxicon* 43:543-553.
- Legros, C., Oughuideni, R., Darbon, H., Rochat, H., Bougis, P.E., Martin-Eauclaire, M.F., 1996. Characterization of a new peptide from *Tityus serrulatus* scorpion venom which is a ligand of the apamin-binding site. *FEBS Lett.* 390:81-84.
- Legros, C., Bougis, P., Martin-Euclaire, M.F., 1997. Genomic organization of the KTX2 gene, encoding a short scorpion toxin active on K⁺ channels. *FEBS Letters* 402:45-49.

- Legros, C., Céard, B., Bougis, P.E., Martin-Euclaire, M.F., 1998. Evidence for a new class of scorpion toxins active against K⁺ channels. *FEBS Lett.* 431:375-380.
- Legros, C., Bougis P.E., Martin-Euclaire, M.F., 2003. Characterisation of the genes encoding Aa1 isoforms from the scorpion *Androctonus australis*. *Toxicon* 41:115-119.
- Levy, F., Rabel D., Charlet, M., Bulet, P., Hoffmann, J.A., Ehret-Sabatier, L., 2004. Peptidomic and proteomic analyses of the systemic immune response of *Drosophila*. *Biochimie* 86 (9-10): 607-616.
- Liu, Y.G., Whittier, R.F., 1995. Terminal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics* 25:674-681.
- Marangoni, S., Ghiso, J., Sampaio, S.V., Arantes, E.C., Giglio, J.R., Oliveira, B., Frangione, B., 1990. The complete amino acid sequence of toxin TsTX-VI isolated from the venom of scorpion *Tityus serrulatus*. *J. Prot. Chem.* 9:595-601.
- Martin-Euclaire, M.F., Ceard, B., Ribeiro, A.M., Diniz, C.R., Rochat, H., Bougis, P.E., 1992. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of the cDNA encoding the main neurotoxin from the venom of the South American scorpion *Tityus serrulatus*. *FEBS Lett.* 302: 220-222.
- Miller, C., 2000. An overview of the potassium channel family. *Genome Biol. Reviews* 0004.
- Moerman, L., Verdonck, F., Willens, J., Tytgat, J., Bosteels, S., 2003. Antimicrobial peptides from scorpion venom induce Ca²⁺ signaling in HL-60 cell. *Biochemical and Biophysical Res. Com.* 311:90-97.
- Nunan, E.A., Arya, V., Hochhaus, G., Cardoso, V.N., Moraes-Santos, T., 2004. Age affects on the pharmacokinetics of tityustoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37:385-390.
- Nishikawa, A.K., Caricati, C.P., Lima, M.L.S.R., Dos Santos, M.C., Kipnis, T.L., Eickstedt, V.R.D., Knysak, I., Da Silva, M. H., Higashi, H.G., Dias Da Silva, W., 1994. Antigen cross-reactivity among the venoms from several species of Brazilian scorpions. *Toxicon* 32:989-998.
- Oyama, S. Jr., Pristovsek, P., Franzoni, L., Pertinhez, T.A., Schinina, E., Lucke, C., Ruterjans, H., Candiani, A.E., Spisni, A., 2005. Probing the pH-dependent structural features of -KTx12.1, a potassium channel blocker from scorpion *Tityus serrulatus*. *Protein Science* 14:1025-1038.
- Pimenta, A.M., Almeida, F.M., Lima, M.E., Martín-Euclaire M.F., Bougis P.E., 2003. Individual variability in *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae) venom elicited by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, 413-418.
- Pimenta, A.M., Stocklin, R., Favreau, P., Bougis, P.E., Martin-Euclaire, M.F., 2001. Purification, amino-acid sequence and partial characterization of two toxins with anti-insect activity from the venom of the South American scorpion *Tityus bahiensis* (Buthidae). *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 15, 1562-1572.
- Pimenta, A.M., Legros, C., Almeida, F.M., Mansuelle, P., De Lima, M.E., Bougis, P.E., Martin-Euclaire, M.F., 2003. Novel structural class of four disulfide-bridged peptides from *Tityus serrulatus* venom. *Biochemical and Biophysical Res. Com.* 301, 1086-1092.
- Pimenta, A.M.C., Stocklin, R., Favreau, P., Bougis P.E., Martín-Euclaire, M.F., 2001. Moving plenses in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, buthidae). *Rapid Commun. Mass spectrom.* 15, 1562-1572.
- Polikarpov, I., Junior, M.S., Maragoni, s., Toyama, M.H., Teplyakov, A., 1999. Crystal structure of neurotoxin Ts1 from *Tityus serrulatus* provides insights into the specificity and toxicity of scorpion toxins. *J. Mol. Biol.* 290:175-184.
- Pisani, D., Poling, L.L., Lyons-Weiler, M., Hedges, B.S., 2004. The colonization of land by animals: molecular phylogeny and divergence times among arthropods. *BMC Biology* 2:1-10.
- Possani, L.D., Becerril, B., Delepiere, M., Tytgat, J., 1999. Scorpion toxin specific for Na⁺-channels. *Eur. J. Biochem.*, 264, 287-300.
- Possani, L.D., Martín, B., Svendsen, I., 1982. The primary structure of Noxiustoxin: a K⁺ channel blocking peptide from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Carlsberg Res. Comon.* 47, 285-289.
- Possani, L.D., Merino, E., Corona, M., Bolivar, F., Becerril., B., 2000. Peptides and genes coding for scorpions toxins that affect ion-channels. *Biochimie* 82, 861-868.
- Reddy, K.V., Yedery, R.D., Aranha, C., 2004. Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int. J. Antimicrobial Agents.* 24,536-547.
- Rochat, H., Rochat, C., Miranda, F., Lissitzki, S., 1970. The amino acid sequence of neurotoxin I of *Androctonus australis* Hector. *Eur.J. Biochem* 17:262-266.
- Rodríguez de la Vega, R.C., García, B.I., D'Ambrosio, C., Diego-García, E., Scaloni, A., Possani, L.D., 2004a. Antimicrobial peptide induction in the haemolymph of the Mexican scorpion *Centruroides limpidus limpidus* in response to septic injury. *Cell Mpl. Life Sc.*, 61, 1507-1519.

- Rodríguez de la Vega, R.C., Possani, L.D., 2004b. Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. *Toxicon* 43, 865-875.
- Rogowski, R.S., Krueger, B.K., Collins, J.H., Blaustein, M.P., 1994. Tityustoxin K alpha blocks voltage-gated noninactivating K⁺ channels and unblocks inactivating K⁺ channels blocked by alpha-dendrotoxin in synaptosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1475-1479.
- Sessions, A., Burke, E., Presting, G., Aux, G., McElver, J., Patton, D., Dietrich, B., Ho, P., Bacwaden, J., Ko, C., Clarke, J.D., Cotton, D., Bullis, D., Snell, J., Miguel, T., Hutchinson, D., Kimmerly, B., Mitzel, T., Katagiri, F., Glazebrook, J., Law, M., Goff, S.A., 2002. A High-Throughput Arabidopsis reverse genetics system. *The Plant Cell* 14:2985-2994.
- Sissom, W.D., 1990. Systematic, biogeography and paleology. In Poli, G.A. (ed), *The Biology of scorpions*, Stanford University Press, Palo alto C.A. pp. 64-160.
- Torres-Larios, A., Gurrola, G., Zamudio, F., Possani, L.D., 2000. Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. *Eur. J. Biochem.* 267:5023-5031.
- Tsai, I-H., Chen, Y-H., Wang Y-M., 2004. Comparative proteomics and subtyping of venom phospholipases A2 and disintegrins of *Protobothrops pit* vipers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1702, 111-119
- Tytgat, J., Chandy, K.G., Garcia, M.L, Gutman, G.A., Martin-Eauclaire, M.F., van del Walt, J.J., 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.
- Valdez-Cruz, N.A., Dávila, S., Licea, A., Corona, M., Zamudio, F. García-Valdes, J., Boyer, L., Possani, L.D., 2004. Biochemical genetic and physiological characterization of venom components from two species of scorpions: *Centruroides exilicauda* Wood and *Centruroides sculpuratus* Ewing. *Biochimie* 86, 387-396.
- Wanger, S., Castro, M.S., Barbosa, A.R., Fontes, W., Schwartz, E., Sebben, A., Rodrigues, O., Sousa, M., Schwartz, C., 2003. Purification and primary structure determination of Tf4, the first bioactive peptide isolated from the venom of Brazilian scorpion *Tityus fasciolatus*. *Toxicon* 41, 737-745.
- Yang, N., George, A.L. Jr., Horn, R., 1996. Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channel. *Neuron* 16:113-122.
- Yu, K., Fu, W., Liu, H., Lou, X., Cheng, K.X., Diing, J., Shen, J., Jiang, H., 2004. Computational simulations of interactions of scorpion toxins with the voltage-gated potassium ion channel. *Biophysical J.* 86:3542-3555.
- Zeng, X-C., Wang, S-X., Zhu, Y., Zhu S-Y., Li, W-X., 2004. Identification and functional characterization of novel scorpion venom peptides with no disulfide bridge from *Buthus martensii* Karsch. *Peptides* 25, 143-150.
- Zhijian, C., Yingliang, W., Jiqun, S., Wanhong, L., Fan, X., Xin, M., Hui, L., Dahe, J., Wenxin, L., 2003. Evidence for the existence of common ancestor of scorpion toxins affecting ion channels. *J. Molecular Toxicology* 14:235-238.
- Zhu, S., Li, W., Cao, Z., 2001. A naturally occurring non-coding fusion transcript derived from scorpion venom gland: implication for the regulation of scorpion toxin gene expression. *falta parte cita*
- Zhu, S., Tytgat, J., 2004. The scorpine family of defensins: gene structure, alternative polyadenylation and fold recognition. *Cell. Mol. Life. Sci.* 61, 1751-1763.