

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA



AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE TOXINAS DE VENENO  
DE ALAGRAN QUE BLOQUEAN CANALES DE POTASIO

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
P R E S E N T A  
HECTOR HORACIO VALDIVIA FLORES

MEXICO, D. F.

1991

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

INDICE.

Lista de Abreviaciones y Anexos.....3

Lista de Figuras y Tablas.....4

Summary.....5

Presentación de la Tesis.....6

Resumen.....10

Introducción.....12

Toxinas que Bloquean Canales de Potasio.....17

    1. Antecedentes.....17

    2. Noxiustoxina y Leiurustoxina III.....19

        2.1. Purificación de Leiurustoxina III.....19

        2.2. Marcaje a alta radiactividad específica de NTX y LTX.....24

        2.3. Cinética de asociación y disociación de [<sup>125</sup>I]-NTX.....26

        2.4. Unión específica de [<sup>125</sup>I]-NTX a sinaptosomas.....28

        2.5. Inhibición de la unión de [<sup>125</sup>I]-NTX y [<sup>125</sup>I]-LTX por  
            NTX y otras drogas.....29

        2.6. La asociación de [<sup>125</sup>I]-NTX a sinaptosomas es  
            independiente de voltaje.....32

        2.7. NTX inhibe la captura de GABA con una IC<sub>50</sub>  
            menor que su K<sub>0.5</sub>.....34

        2.8. Anticuerpos monoclonales Anti-NTX permiten deslindar  
            "sitios activos" de unión de NTX a sinaptosomas.....39

            2.8.1. BNTX16 se une al complejo NTX-receptor.....41

            2.8.2. Anticuerpos monoclonales Anti-NTX inhiben el efecto  
                de NTX sobre la captura de GABA por sinaptosomas...43

        2.9. La NTX, herramienta útil en el aislamiento del canal

de potasio en axón gigante de calamar.....	46
3. La Caribdotoxina.....	50
3.1. Purificación de Caribdotoxina.....	51
3.2. Cinética de Unión.....	53
4. Las Serrulotoxinas.....	56
Bibliografía.....	59
Apéndices.....	66

## RESUMEN.

El tema de esta tesis se centra en la descripción de un nuevo grupo de toxinas de alacrán con propiedades de bloquear diversos canales de potasio.

La característica estructural sobresaliente en este grupo de toxinas peptídicas es su peso molecular relativamente pequeño (no mayor de 5 KDa). Por ello, son también conocidas con el nombre genérico de "toxinas de cadena corta".

Las toxinas de cadena corta son componentes minoritarios en los venenos de alacrán. Se trata de péptidos estructuralmente compactos, básicos, con capacidad para soportar situaciones drásticas de temperatura y acidez.

Aunque el conocimiento de que diversos venenos de alacrán modificaban sustancialmente las corrientes macroscópicas de sodio y potasio, el establecimiento de un grupo de toxinas bloqueadoras de canales de potasio se concretó con el descubrimiento y caracterización química de Noxiustoxina (NTX).

NTX es un péptido de 4.2 KDa del veneno de alacrán nayarita *Centruroides noxius* Hoffmann. En axón gigante de calamar, NTX bloquea

reversiblemente corrientes de potasio con una afinidad de ~300 nM. En esta tesis, se describe un sitio de similar afinidad en sinaptosomas de cerebro. Aunque a la fecha no hay prueba contundente de la identidad del receptor cerebral, la unión de NTX es únicamente afectada por agentes que interfieren con la función de canales de potasio. Esto sugiere que el receptor cerebral de NTX es asimismo un canal de potasio.

En los venenos del alacrán asiático *Leiurus quinquestriatus* y brasileño *Tityus serrulatus*, encontramos una variedad de toxinas que afectan la unión de NTX a sinaptosomas y/o bloquean canales de potasio dependientes de  $Ca^{2+}$  reconstituídos en bicapas artificiales.

Del veneno *Leiurus quinquestriatus*, se purificó a homogeneidad 2 toxinas: Caribdotoxina, un péptido con estructura primaria 60% homóloga a NTX que bloquea selectivamente canales de potasio dependientes de calcio, y Leiurustoxina III, un péptido de igual peso molecular con menor homología a NTX pero que compite por el mismo sitio receptor.

Del veneno *Tityus serrulatus*, se purificaron 2 toxinas al parecer estructuralmente homólogas: Serrulatoxinas I y II. La secuencia aminoácida de estos péptidos no ha sido determinada. Sin embargo, su propiedad bloqueadora de canales de potasio dependientes de calcio ha sido caracterizada.

Juntas, estas toxinas constituyen una excelente herramienta para el estudio molecular de diversos canales de potasio.

## INTRODUCCION.

La capacidad de toxinas de alta afinidad para reconocer diversos tipos de canales iónicos se origina de la interacción química entre grupos funcionales de la toxina y la proteína canal. En este contexto, las toxinas pueden ser utilizadas como "sondas" para identificar sitios importantes en el canal, como los relacionados con la permeabilidad iónica y selectividad. La farmacología de la toxina es también invaluable para identificar la contribución fisiológica de un determinado canal cuando se analizan corrientes macroscópicas que pueden ser la suma de varios tipos de canales actuando concertadamente. Al presente nivel de conocimiento de características moleculares de canales iónicos, puede ser posible correlacionar diferencias farmacológicas entre tipos de canal con diferencias estructurales en sitios de unión de toxinas.

Aunque frecuentemente se cita que la lentitud en la caracterización bioquímica de canales de  $K^+$  se debe principalmente a la carencia de ligandos de alta afinidad, la situación se ha tornado rápidamente cambiante. La naturaleza ha provisto una amplia variedad de toxinas dirigidas al canal de  $K^+$ . Es el vacío que ha dejado la escasa caracterización de estas toxinas lo que ha contribuido a la identificación y clonación de uno de estos canales a través de técnicas genéticas (Tempel *et al.* 1987). Uno de los objetivos del presente trabajo es el de contribuir mas a la interminable tarea de caracterizar bioquímicamente a estos ligandos.

*Diversos canales de K<sup>+</sup> para diversas funciones biológicas.*

La diversidad de canales de K<sup>+</sup> es vasta. Tanto, que aún la base de su clasificación no acierta a agruparlos comprensible y coherentemente. Por ejemplo, clasificarlos de acuerdo a su conductancia unitaria (Latorre and Miller, 1983), no nos resulta útil para valorar su parentesco, ya que separa canales en los cuales ocurre imbricación farmacológica. Una de las toxinas que aquí se discuten (Caribdotoxina) bloquea tanto al canal de K<sup>+</sup> dependiente de Calcio de 230 pS de músculo esquelético como a un canal similar pero de 35 pS presente en neuronas de *Aplysia* (Herman & Erxleben, 1987). Ya que los dos canales están asociados con un sitio de unión para una toxina mas bien selectiva, al menos parte de los componentes de estos canales debe estar estructuralmente relacionada. Sin embargo, ambos canales serían considerados distantes en la clasificación de acuerdo a conductancia.

Moczydlowsky y col. (1988) reclasifican canales de K<sup>+</sup> de acuerdo a dependencia de voltaje y cinética. De acuerdo a este albitrio, al menos 4 clases se reconocen:

*Canales de K<sup>+</sup> de rectificación retardada.* El canal de K<sup>+</sup> de rectificación retardada es el clásico canal de K<sup>+</sup> activado por voltaje de Hodgkin y Huxley (1952). Este canal asiste en la repolarización de potenciales de acción rápido en nervios no mielinizados, músculo esquelético y nervios mielinizados de anfibios. Conductancias unitarias en el rango de 2 a 200 pS han sido reportadas para estos canales en



varias preparaciones (Coronado *et al.* 1984; Standen *et al.* 1985), aunque a la fecha no es claro si esto refleja diferencias de tejido u otras diferencias intrínsecas. Tetraetilamonio (TEA) se cita frecuentemente como bloqueador de este canal, aunque TEA bloquea prácticamente todos los tipos de canales de  $K^+$  conocidos y también bloquea canales de  $Na^+$  cuando se agrega internamente.

*Canales de  $K^+$  de corriente transitoria, interna (también corriente A).* Estos canales fueron originalmente descritos en neuronas de molusco (Hagiwara, *et al.* 1961) y desde entonces han sido observadas en muchos tipos celulares. Esta corriente es sustancialmente inactivada a potenciales de reposo normales, pero puede ser reactivada por hiperpolarización. Otras características de la corriente A incluyen rango de activación usualmente mas negativo que la corriente de  $K^+$  de rectificación retardada y una mayor sensibilidad a bloqueo por 4-aminopiridina (4-AP) que a TEA. Su función ha sido descrita como un codificador de impulsos, ya que permite en sinapsis una despolarización gradual que se traduce en ritmos crecientes de descargas de potencial de acción. Este canal de  $K^+$  es el centro de actual popularidad porque secuencias complementarias al locus *Shaker* en la mosca *Drosophila* han sido recientemente determinadas (Tempel *et al.* 1987) y se ha encontrado que contienen segmentos similares a dominios de canales de  $Na^+$  y  $Ca^{++}$  (Noda *et al.* 1984; Tanabe *et al.* 1987). Mutaciones al locus *Shaker* afectan corrientes A en *Drosophila* y mRNA transcrito de clonas de cDNA de *Shaker* inducen corrientes A funcionales cuando se inyectan en ovocitos de rana (Timpe, *et al.* 1988). Estudios electrofisiológicos de

células de embriones de *Drosophila* identifican un canal de  $K^+$  de 12 a 16 pS en miotubos y de 5 a 8 pS en neuronas que parecen determinar las corrientes A de estas células.

*Canales de  $K^+$  de rectificación anómala o interna.* Esta corriente se activa por voltajes hiperpolarizantes, en contraste a casi cualquier otro tipo de canal activado por voltaje. Los rectificadores internos se encuentran en muchos tipos celulares, incluyendo músculo cardíaco y esquelético, ovocitos y neuronas (Thompson and Aldrich, 1980). Tales canales han sido implicados en el establecimiento del potencial de reposo de la célula, previniendo la acumulación de  $K^+$  en el lumen de los túbulos T de músculo esquelético y permitiendo una larga duración de los potenciales de acción en ovocitos y células cardíacas. Conductancias unitarias a nivel de canal único han sido reportadas en el rango de 5 a 27 pS (Matsuda *et al.* 1987). Aunque a la fecha no se hayan descrito toxinas bloqueadoras, se ha encontrado que tales canales se regulan por nucleótidos de adenina en células  $\beta$  de páncreas (Mislner *et al.* 1986), por proteínas G en células atriales (Yatani *et al.* 1987) y por fosforilación dependiente de cAMP en neuronas de *Aplysia* (Benson and Levitan, 1983).

*Canales de  $K^+$  activados por Calcio.* Esta cuarta clase de canales se encuentra prácticamente en cualquier tipo de célula animal. En neuronas, estos canales funcionan en la repolarización de los potenciales de acción y en la terminación de los "bursts". En músculo, aumentan la fase de post-hiperpolarización de los potenciales de acción. Los estudios de

patch-clamp y las toxinas de alacrán se usan para distinguir dos grandes tipos de canales de  $K^+$  activados por calcio en músculo esquelético. Un tipo se caracteriza por una conductancia de cerca de 200 pS y se bloquea por Caribdotoxina (Miller, *et al.* 1985). El segundo tipo tiene una conductancia de 10-14 pS y es específicamente bloqueado por Apamina (Blatz and Magleby, 1986). El canal de  $K^+$  activado por calcio de gran conductancia es también conocido por canal BK. Canales BK son activados tanto por voltaje como por calcio interno. Concentraciones crecientes de  $Ca^{++}$  interno mueven la activación dependiente de voltaje de estos canales a lo largo del eje de voltaje en la dirección negativa (Barret *et al.* 1982). En esta tesis, me referiré a este canal como "canal de K activado por calcio" y lo abreviaré canal de K (Ca).

El descubrimiento de nuevos ligandos específicos para distintos canales de  $K^+$  permitirá una mas integra y comprensible clasificación. En este sentido, los venenos de alacrán juegan un importante papel, ya que de ellos deriva la mayoría de las nuevos ligandos. Lo que es mas, el conocimiento de la estructura primaria de estas toxinas está permitiendo la identificación de sus "sitios activos" y el grado de mutación permitido antes de la abolición de su efecto. Indudablemente, esto constituye una nueva manera de abordar el estudio del conocimiento molecular de canales de  $K^+$  que capitalizará en el mejor conocimiento de su función.

## TOXINAS QUE BLOQUEAN EL CANAL DE POTASIO.

### 1.- Antecedentes.

Como pioneros en el grupo, Koppenhöfer y Schmidt (1968), aclararon el mecanismo de acción de diferentes venenos de alacrán al demostrar que el cambio en la excitabilidad de la membrana nerviosa evocada por el veneno, era debido a una alteración en los canales de sodio.

Estudios mas detallados comprobaron este resultado y atribuyeron la "alteración en la permeabilidad de los canales de sodio" a efectos mas especificos, no todos aplicables a un veneno en particular: 1) prolongación y remoción de un proceso rápido de inactivación (Narahashi *et al.*, 1972; Romey *et al.*, 1975; Catterall, 1979); 2) producción de una "desviación negativa" de los parámetros de activación dependientes de voltaje; 3) reducción del número de canales conductores (Romey *et al.*, 1975; Carbone *et al.*, 1982), entre otros.

Sin embargo, desde Koppenhöfer y Schmidt, se observaba una disminución notable en la permeabilidad de los canales de potasio dependientes de voltaje como efecto integral en los venenos crudos de alacrán. Considerando la proporción de toxinas responsables de este efecto en el veneno total, uno puede deducir por qué la atribución de los signos de envenamiento por picadura de alacrán se centró básicamente en las toxinas de sodio.

El descubrimiento de la Noxiustoxina (NTX) por Carbone *et al.* (1982) y su purificación (Possani *et al.*, 1982), sentó las bases para posteriores búsquedas de componentes puros responsables de efectos exclusivos sobre canales de potasio. El éxito vino pronto: Apamina, un polipéptido de 18 aminoácidos del veneno de abeja *Apis mellifera* que bloquea el canal de  $K^+$  dependiente de calcio de baja conductancia en cerebro y músculo esquelético (Hugues *et al.*, 1982); Toxina II-9, del alacrán *Tityus serrulatus*, que reduce la conductancia a  $K^+$  dependiente de voltaje en axón de calamar (Carbone *et al.*, 1983); Dendrotoxina, una toxina de serpiente que atenúa un canal de potasio dependiente de voltaje en neuronas  $CA_1$  de hipocampo (Dolly *et al.*, 1984); Caribdotoxina, una toxina del alacrán israelí *Leiurus quinquestriatus* que bloquea el canal de potasio dependiente de  $Ca^{++}$  en músculo esquelético (Miller *et al.*, 1985).

En lo que a toxinas de alacrán se refiere, el surgimiento de un nuevo grupo con características funcional y estructuralmente distintas fue evidente: mientras las toxinas dirigidas al canal de sodio eran polipéptidos de cadena larga (PM ~7000), las dirigidas al canal de potasio no rebasaban P.M. 4500. Características como presencia de puentes disulfuro, alta resistencia a desnaturalización térmica y basicidad se conservan en ambos grupos. Noxiustoxina, por ejemplo, es un polipéptido básico de 39 aminoácidos con 6 residuos cisteinil. Caribdotoxina es un polipéptido doblemente básico de 37 aminoácidos con

mismo número de residuos cisteinil (García *et al.*, 1988). El propósito de la presente tesis se centra en la descripción de varios péptidos de veneno de alacrán que pueden clasificarse en este grupo de "toxinas de cadena corta". Todos ellos comparten como característica común su propiedad de bloquear canales de  $K^+$  de diversos tejidos.

## 2.- La Noxiustoxina y la Leiurustoxina III.

Con el propósito de detallar mas la función de Noxiustoxina e intensificar mas la búsqueda de toxinas análogas, hemos conducido experimentos de unión de [ $^{125}I$ ]-NTX a sinaptosomas de cerebro. Adicionalmente, hemos encontrado en el veneno del alacrán *Leiurus quinquestratus* un nuevo péptido con secuencia aminoácida y cinética de unión similares a NTX. Le hemos llamado Leiurustoxina II (LTX III), por compartir excepcionales similitudes con Leiurustoxina I y II, unos péptidos derivados del mismo veneno con propiedades bloqueadoras de canales de  $K^+$  (Chicchi, *et al.*, 1988). En esta sección detallaré algunos estudios de unión de NTX a sinaptosomas y al mismo tiempo describiré la purificación y caracterización química de LTX III, ya que en alguna parte ambas toxinas comparten experimentos paralelos.

### 2.1 Purificación de Leiurustoxina III.

Dado que la purificación de la NTX ha sido previamente descrita

(Possani *et al.*, 1984), a continuación se detallará el procedimiento desarrollado para obtener LTX III.

El veneno *L. quinquestratus* produce dos tipos de bloqueo cinéticamente diferenciables en canales de  $K^+$  dependiente de calcio (canal de K (Ca)) de músculo esquelético reconstituidos en bicapas artificiales. Uno es un bloqueo lento, monotónico y reversible, debido a Caribdotoxina y descrito antes por Miller *et al.* (1986) (Fig. 1a). Un segundo bloqueo, rápido y de baja afinidad, es apreciable nítidamente después de análisis de probabilidad de apertura ( $P_0$ ) del canal (Fig. 1b). Este segundo bloqueo presenta cinéticas idénticas al bloqueo inducido por NTX, descrito por Valdivia *et al.* (1988). Nosotros sospechamos que Caribdotoxina no suscitaba ambos tipos de bloqueo y buscamos un segundo componente activo en el veneno. Además, tratando de identificar Caribdotoxina por secuencia aminoácida en diversos péptidos de *L. quinquestratus*, encontramos un componente con estructura primaria 50% homóloga a NTX. Este componente recibió más tarde el nombre de LTX III. Dado que NTX ejerce el tipo de bloqueo lento sobre el canal (Fig. 1c), planteamos la posibilidad de atribuir este efecto a LTX III.

Este es el procedimiento desarrollado para su purificación: el primer paso consistió de filtración en columnas de Sephadex G-50 (Fig. 2a). Cinco fracciones fueron colectadas: la fracción III contiene la mayoría de los componentes tóxicos a ratón y fue separada en resina de intercambio catiónico (CM-32) en acetato de amonio 20 mM, pH 4.7 (Fig.

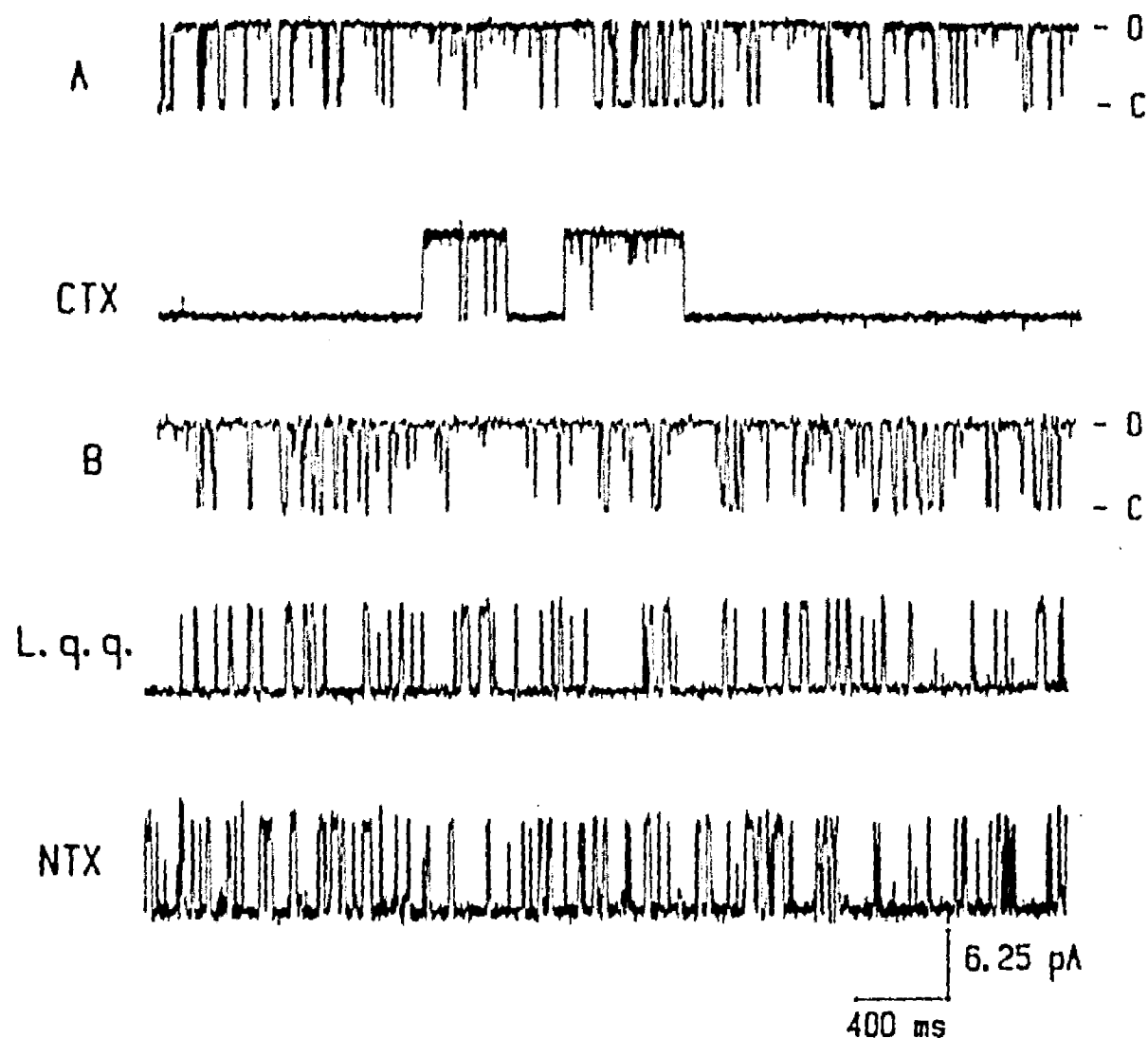


Figura 1. Efecto de toxinas sobre corrientes de un solo Canal de  $K^+$  dependiente de  $Ca^{++}$  del sistema T-tubular de músculo esquelético. (A) Control (trazo superior;  $P_o = 0.80$ , potencial de membrana = 0 mV) y bloqueo producido por Caribdotoxina (CTX). Segundo trazo fue registrado con 20 nM CTX agregada al lado externo del canal (trans).  $P_o$  del registro entero (10 min) fue 0.12. Para todos los trazos en la figura, los canales de  $K^+$  ( $Ca^{++}$ ) fueron registrados en 250 mM KCl (lado interno), 50 mM KCl, 200 mM NaCl (lado externo). Filtro = 500 Hz, muestreo = 2 kHz. (B) Control (trazo superior,  $P_o = 0.85$ , potencial de membrana = 0 mV) y efecto de 0.1 mg de veneno total (L.q.q.) o 2  $\mu$ M NTX trans.  $P_o$ s decrecieron a 0.26 y 0.31, respectivamente. 0 significa "abierto" y C "cerrado". Este último es también la línea basal.

2b). La fracción III-11 no fue claramente resuelta y fue concentrada para purificación adicional. Después de diálisis, fue aplicada a otra columna de CM-celulosa equilibrada con fosfato de sodio 50 mM, pH 6.0 (Fig. 2c). La subfracción 5 todavía contiene 2 componentes, a juzgar por análisis en geles de SDS (no mostrados), y fue separada en columna de



Sephadex G-50 (fino) en presencia de 1 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.2 (Fig 2d). La fracción 3 de esta columna correspondió al perfil de elución de la NTX y se aplicó finalmente a una columna HPLC (Vydac C<sub>18</sub>, fase reversa) y el péptido puro eluido a 22 min (LTX) se usó para análisis de composición aminoácida y caracterización funcional.

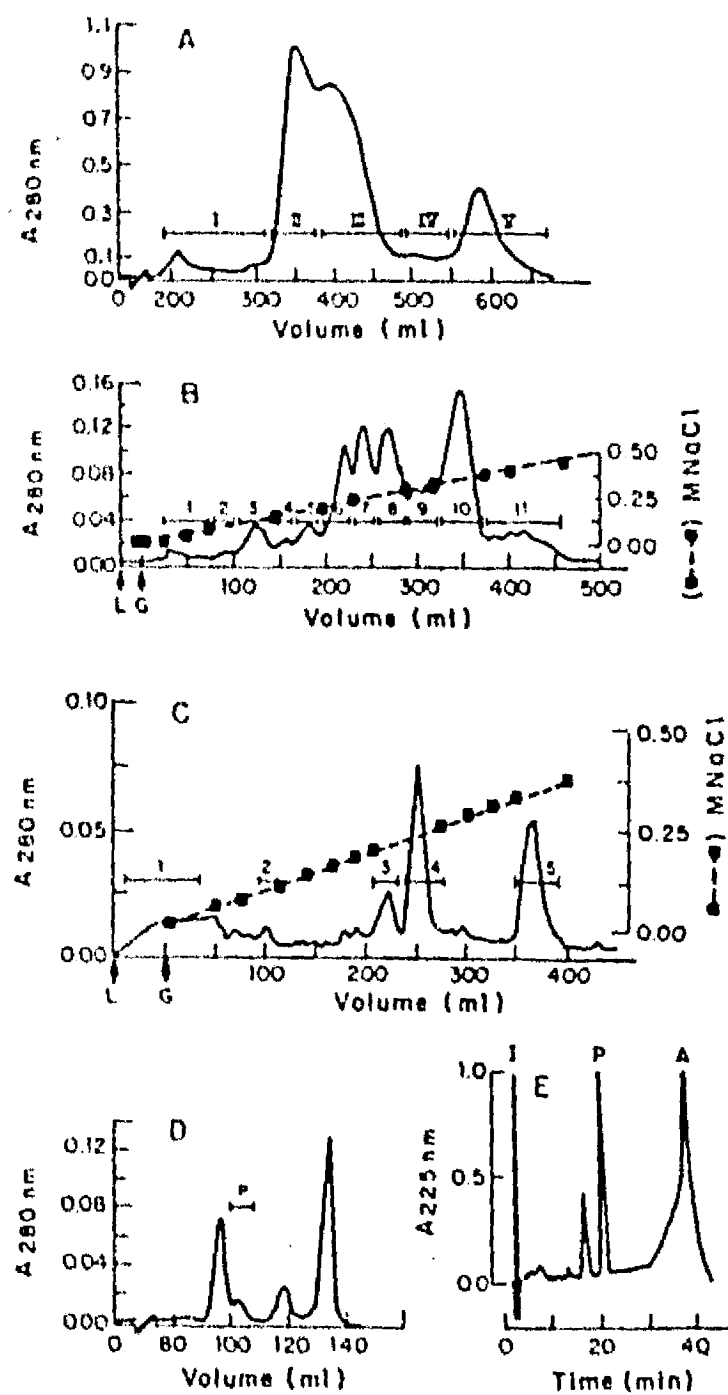


FIGURA 2. Purificación de Leirustoxina II. (A) 100 mg de veneno soluble de L.q.q. fue aplicado a una columna (0.9 x 190 cm) de Sephadex G-50 equilibrado y eluido con 20 mM acetato de amonio pH 4.7. Fracciones conteniendo 6 ml fueron colectadas y la A<sub>280 nm</sub> fue monitoreada. (B) Fracción III de la columna previa fue aplicada a una CM-celulosa (0.9 x 30 cm) equilibrada con el buffer anterior. Un gradiente de NaCl (0 a 0.5 M, 250 ml c.u.) fue corrido a 20 ml/h.; fracciones de 2.5 ml fueron colectadas. (C) fracción 11 de B fue mezclada, dializada y aplicada a una columna similar equilibrada in 50 mM fosfato de sodio, pH 6.0. Un gradiente lineal de NaCl (0 a 0.38 M, 250 ml c.u.) fue corrido a 20 ml/h y fracciones de 2.5 ml fueron colectadas. (D) fracción 5 de C fue dializada, liofilizada y aplicada a una columna (0.9 x 190 cm) de Sephadex G-50 equilibrada y eluida con 1 M NaCl en 0.1 M Tris-HCl pH 8.2, a un flujo de 30 ml/h. Fracciones de 1 ml fueron colectadas (E) Componente P from D (50 µg) fue aplicado a una columna C<sub>18</sub> de fase reversa de HPLC y separado con un gradiente lineal de A (agua con ácido trifluoroacético 0.12%) y B (acetonitrilo:agua, 60:40) por un periodo de 1 h a un flujo de 1 ml/h. El péptido puro (P) es LTX II. En esta figura, I significa artefacto de inyección y A es el artefacto de elución.

Ya que no contábamos con otro ensayo mas que la unión a sinaptosomas, no se detrimió las veces de purificación alcanzada con este procedimiento, pero basados en la absorbancia a 280 nm, LTX III corresponde a ~0.1% de la proteína total en el veneno soluble. Este valor cae dentro del mismo rango para la NTX (Possani *et al.*, 1981a) y Caribdotoxina (Smith *et al.*, 1986). Debido a la baja cantidad de LTX III disponible, no fueron conducidas pruebas de letalidad con este péptido.

La Tabla 1 presenta la secuencia aminoácida de la NTX y su comparación con LTX III. 5 de los 14 residuos secuenciados son los mismos, mientras 2 están mutados conservadoramente (Ile-Leu y Lys-Arg), lo que hace 50% de homología. Además, residuos Cys, tan importantes en el mantenimiento de la estructura tridimensional, están colocados exactamente en la misma posición. La misma tabla presenta la composición de aminoácidos del péptido puro.

TABLA 1. COMPARACION AMINOACIDA DE NTX Y LTX III.

TOXINA	SECUENCIA AMINOACIDA
Noxiustoxina.....	Thr-Ile <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">Ile</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">Asn</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">Val</span> Lys <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">Cys</span> Thr----- <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">Ser</span> Pro-Lys <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">Gln-Cys</span> Ser-
Laurustoxina III.....	Gly-Leu <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">Ile</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">Asp</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">Val</span> Arg <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">Cys</span> Tyr-Asp <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">Ser</span> Ser----- <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">Gln-Cys</span> Glu-

LEIURUSTOXINA III: COMPOSICION QUIMICA.

Valores expresados como residuos/mol (Integro mas cercano).  
 Asp 3.8 (4), Thr 2.3 (2), Ser 3.1 (3), Glu 4.3 (4), Pro 1.0 (1), Gly 5.2 (5), Ala 1.7 (2), Val 2.1 (2), Met 0.5 (1), Ile 1.0 (1), Leu 1.9 (2), Tyr 1.0 (1), Phe 1.0 (1), Hys 1.4 (1-2), Lys 4.4 (4-5), Arg 2.3 (2)

## 2.2 Marcaje a Alta Radiactividad Específica de NTX y LTX III.

La Figura 3A muestra un cromatograma representativo del marcaje a alta radiactividad específica de la NTX, un péptido de 39 aminoácidos con 2 residuos de tirosina (para composición aminoácida, ver tabla 1). El método que hemos empleado es el descrito por Morrison y Bayse (1970) y se basa en la oxidación del anillo fenólico de la tirosina por Lactoperoxidasa en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o glucosa oxidasa.

Teóricamente la NTX y LTX III pueden ser marcadas radiactivamente hasta 2160 Ci/mmol, basándose en la incorporación de 1 átomo de <sup>125</sup>I por molécula de toxina. La reacción suave de oxidación por la lactoperoxidasa puede ser aún mas atenuada reduciendo la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasta una proporción mínima de 1:1 con la Lactoperoxidasa. Por supuesto, la radiactividad específica final se vera disminuida.

En nuestras condiciones, descritas al pie de la Fig. 3, la actividad biológica de la NTX no se elimina: lotes de [<sup>125</sup>I]-NTX con aproximadamente 1000 veces menos radiactividad específica que la usual (de 100 a 0.1 Ci/mmol, aumentando la proporción <sup>131</sup>I/<sup>125</sup>I) inyectados intraperitonealmente a un ratón en dosis comparable a la NTX nativa, matan al animal experimental con síntomas y en un lapso similares a los registrados para la NTX nativa. Además, anticuerpos polivalentes anti-NTX coprecipitan hasta el 95% de [<sup>125</sup>I]-NTX en ensayos radioinmunológicos (Gurrola, *et al.*, 1986).

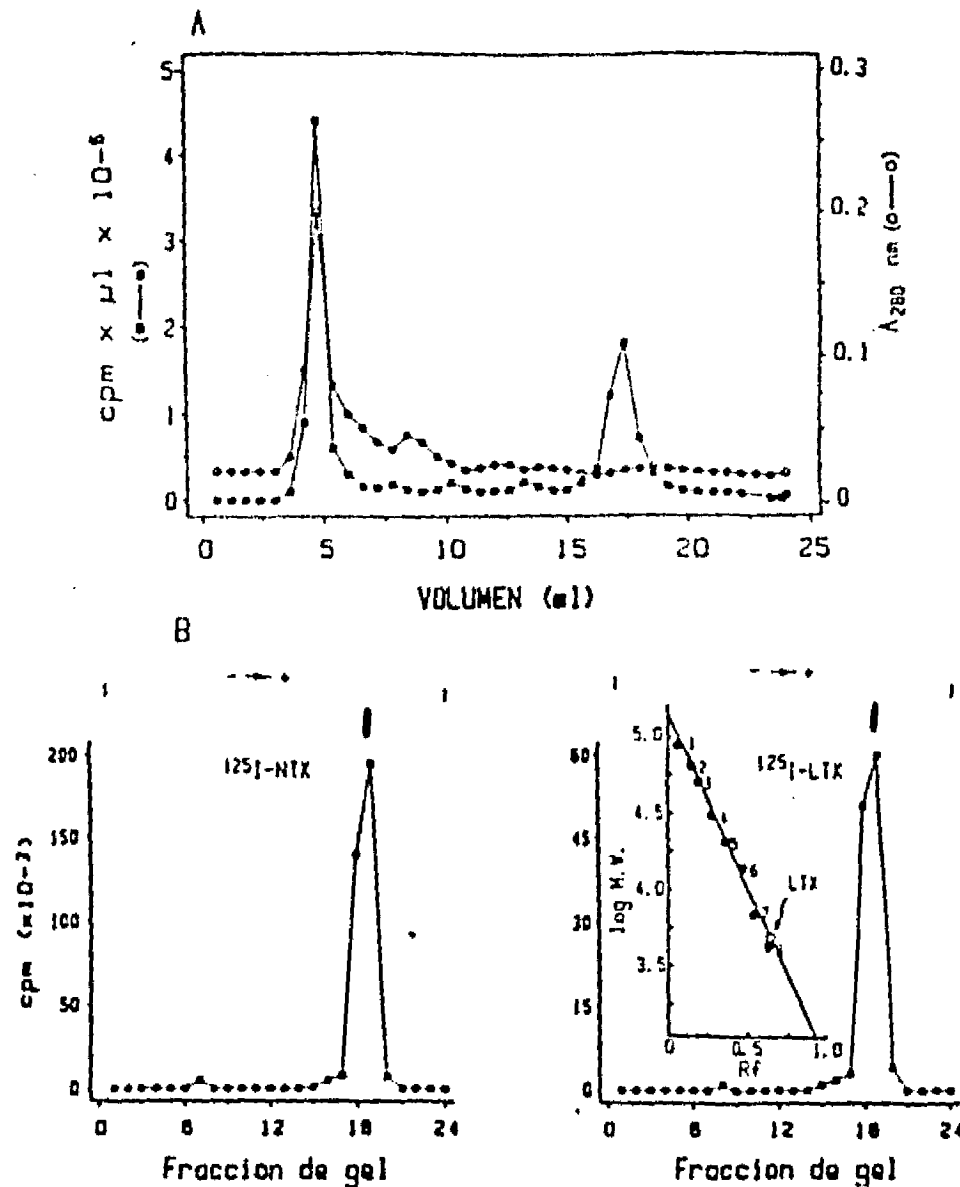


FIGURA 3. Marcaje de NTX y LTX II. (A) NTX (200  $\mu\text{g}$ , 46 nmol) fue iodada por el método de lactoperoxidasa. Después de completada la reacción, la mezcla fue cargada en una columna de Sephadex G-10 (0.8 x 13 cm) equilibrada y eluida con 100 mM NaCl, 100 mM fosfato de sodio pH 7.4 a un flujo de 10 ml/h. (B) geles SDS (15% de acrilamida) fueron corridos de acuerdo a Laemmli (1970). Pequeñas alícuotas de toxinas iodadas y nativas (NTX: 3  $\mu\text{g}$ ; LTX II: 2  $\mu\text{g}$ ) fueron aplicadas en líneas separadas del gel, corridas en paralelo y teñidas con Azul de Coomasie. Las líneas conteniendo las toxinas marcadas fueron cortadas en trozos de 5 mm a lo largo del eje electroforético de migración. La radiactividad absoluta en cada trozo ha sido graficada. Los marcadores de P.M. usados fueron: 1, fosforilasa b (92,500); 2, BSA (64,000); 3, ovalbumina (45,000); 4, anhidrasa carbónica (31,000); 5, inhibidor de tripsina de soya (21,500); 6, lisozima (14,400); 7,  $\gamma$ -toxina (7,000) y 8, NTX (4,200).

Pequeñas alícuotas de las toxinas marcadas fueron corridas en geles de SDS como prueba adicional de su pureza y medio para calcular su peso molecular. Los péptidos nativos corridos en paralelo y teñidos con azul de Coomasie colocan con las cpm de las toxinas radiactivas (Fig 3B). Una gráfica de factor de retención (Rf) de varios marcadores contra

$\log_{10}$  P.M. da una recta, a cuya interpolación fue calculado el P.M. para LTX III: 4.2 KDa. Este resultado indica claramente que la LTX III no pertenece al grupo de toxinas de cadena larga.

### 2.3 Cinéticas de Asociación y disociación de [ $^{125}$ I]-NTX.

La Fig. 4A presenta cinética de asociación de [ $^{125}$ I]-NTX a sinaptosomas, la cual fue conducida a una concentración de 1.2  $\mu$ M. Como se observa, [ $^{125}$ I]-NTX alcanza plateau en su unión específica a sinaptosomas en menos de 15 minutos. La misma figura muestra que la presentación semilogarítmica de los datos da una línea recta, como es esperado para una reacción de pseudo-primer orden. Entonces, la constante de asociación (k) es:

$$k = k_a ([^{125}\text{I}]\text{-NTX}) + k_d \quad (1)$$

donde  $k_a$  y  $k_d$  representan la constante de asociación de segundo orden y la constante de disociación de primer orden del complejo [ $^{125}$ I]-NTX-receptor. Como todos los experimentos fueron conducidos a 25°C, el valor para k a esta temperatura fue  $9.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ .

La unión de [ $^{125}$ I]-NTX puede prevenirse incubando con un exceso de NTX no marcada o por dilución apropiada del medio de incubación. En la figura 3B presentamos cinéticas de disociación del complejo [ $^{125}$ I]-NTX-receptor después de una dilución de 30 veces del medio de reacción. En

menos de 10 min, un plateau es alcanzado y la representación semilogarítmica de los datos para los primeros 9 min arroja una línea recta. La  $k_d$  medida en estas condiciones fue  $8.9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ . Es entonces posible calcular  $k_a$  de la ecuación 1:  $k_a = 6.84 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

Teniendo los valores de  $k_a$  y  $k_d$  nos permite calcular  $K_d^*$ , la constante de disociación del complejo [ $^{125}\text{I}$ ]-NTX-receptor a  $25^\circ\text{C}$ , pH 7.4.

$$K_d^* = k_d/k_a = 130 \text{ nM.}$$

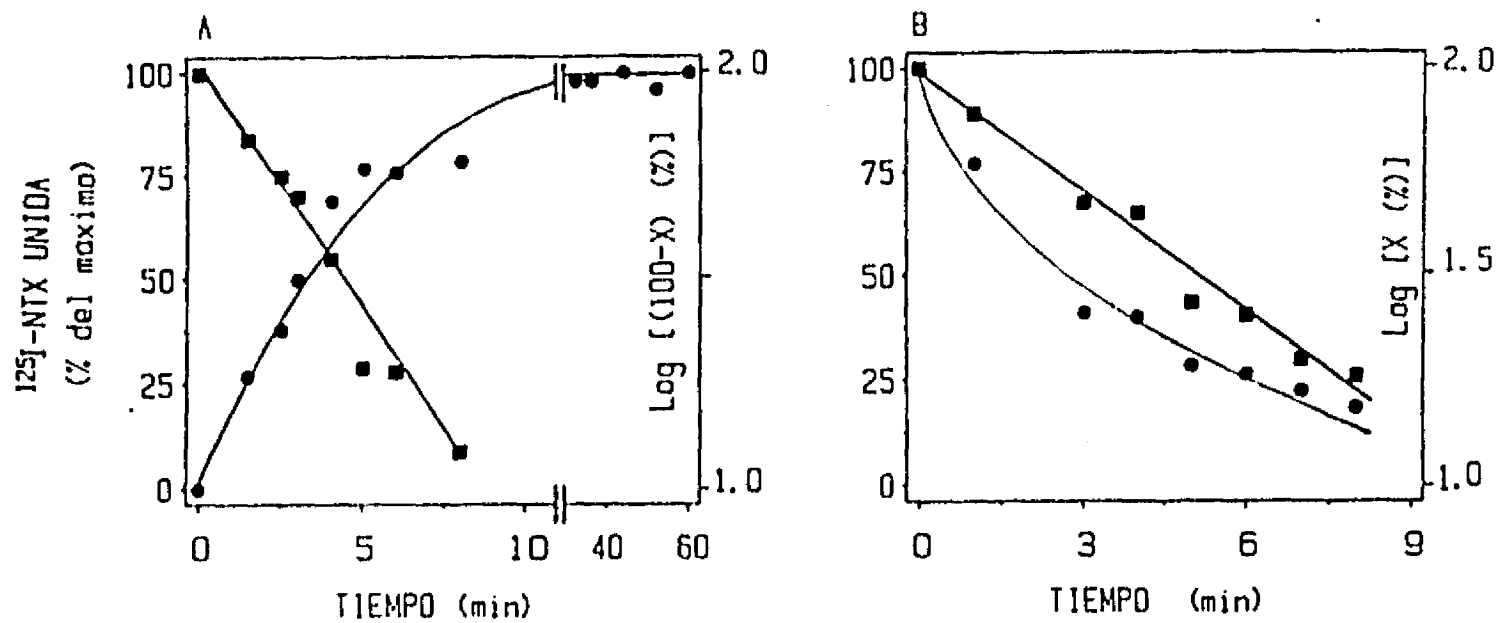


FIGURA 4. Cinéticas de Asociación y Disociación de [ $^{125}\text{I}$ ]-NTX a Sinaptosomas. (A) Cinética de asociación de la unión de  $50 \text{ nM}$  [ $^{125}\text{I}$ ]-NTX a  $0.3 \text{ mg/ml}$  de sinaptosomas a  $25^\circ\text{C}$ . Ordenadas a la izquierda ( $\bullet$ ) representan el curso temporal de la reacción de asociación; ordenadas a la derecha ( $\blacksquare$ ) es una representación de pseudoprimer orden de los datos ( $\log [(100-X)]$ ). (B) Cinética de disociación del complejo [ $^{125}\text{I}$ ]-NTX-receptor a  $25^\circ\text{C}$ . Después de haber alcanzado equilibrio en la cinética de asociación, se hizo una dilución de 30 veces de la mezcla de reacción. Las ordenadas a la izquierda ( $\bullet$ ) es el curso temporal de la reacción de disociación. Ordenadas a la derecha ( $\blacksquare$ ) es la representación de los datos como una reacción de primer orden. En ambos casos, X representa el porcentaje máximo de [ $^{125}\text{I}$ ]-NTX unida a sinaptosomas.

2.4 Unión específica de [ $^{125}$ I]-NTX a Sinaptosomas.

La Fig 5 muestra el resultado de experimentos de unión en los cuales concentraciones crecientes de [ $^{125}$ I]-NTX fueron agregadas a una concentración fija de sinaptosomas, en presencia (unión no específica) o en ausencia (unión total) de un exceso (100-200 veces) de NTX no marcada. Concentraciones apropiadas de receptor (0.1-0.3 mg proteína/ml)

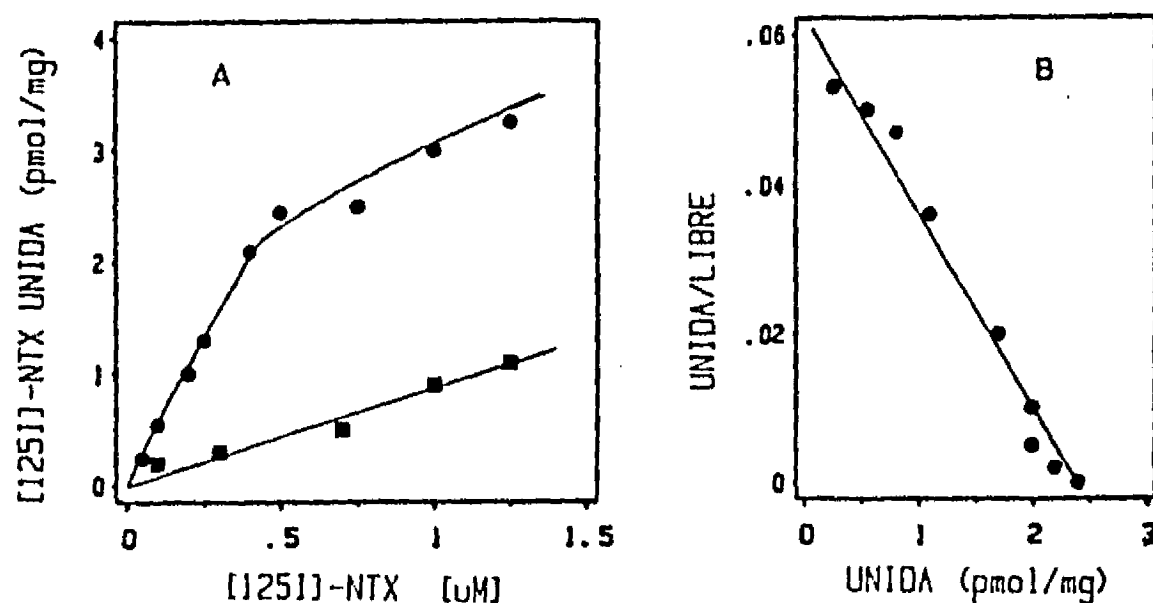


FIGURA 5. Unión de [ $^{125}$ I]-NTX a Sinaptosomas. Sinaptosomas fueron incubados con concentraciones crecientes de [ $^{125}$ I]-NTX desde 0.05 hasta 1.5  $\mu$ M por 60 min a 25 °C y la NTX unida fue medida usando un ensayo de filtración rápido (El ensayo consistió en resuspender la mezcla de incubación en 5 ml de "Buffer de incubación" que contenía: 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.8 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris-HCl pH 7.4. La mezcla era vaciada en un poro de succión al vacío a cuyo fondo se colocaba un filtro Whatman GF/C. El filtro era lavado 2 veces con 5 ml del mismo buffer. Los filtros eran posteriormente secados y la radiactividad retenida era monitoreada en un contador  $\gamma$ ). Izquierda, unión total (●) y unión no específica medida en presencia de NTX no marcada a una concentración 100-200 veces mayor que la marcada (■), graficadas contra la concentración libre de [ $^{125}$ I]-NTX. La figura de la derecha representa la gráfica de Scatchard de la unión específica, calculada como la diferencia entre los valores experimentales de la unión total y los de la curva ajustada de unión inespecífica.

fueron elegidas en base a una curva de dilución de receptor (no mostrada). La unión específica es definida como la diferencia entre la unión total y la no específica. La constante de disociación ( $K_d^*$ ) del complejo formado entre [ $^{125}\text{I}$ ]-NTX y sinaptosomas fue determinado por la pendiente de la gráfica de Scatchard: 200-300 nM (4 experimentos independientes), en buen acuerdo con datos de experimentos cinéticos. La linealidad de esta gráfica (Fig. 4, derecha) demuestra que, al menos en este rango, [ $^{125}\text{I}$ ]-NTX se une a una sola clase de sitios no-interactuantes con una capacidad de unión máxima de 1.9-2.2 pmoles/mg de proteína.

#### *2.5 Inhibición de la Unión de [ $^{125}\text{I}$ ]-NTX y [ $^{125}\text{I}$ ]-LTX III por NTX no Marcada y Otras Drogas.*

Los efectos inhibidores relativos de varias concentraciones de NTX no marcada sobre la unión en equilibrio de  $^{125}\text{I}$ -NTX y  $^{125}\text{I}$ -LTX III se muestran en la figura 6. La concentración de ambas toxinas marcadas que se utilizó para estudios de desplazamiento fue de 50 nM. Como se observa, la unión de **ambas** toxinas puede ser suprimida por NTX, y los porcentajes de desplazamiento pueden ser prácticamente ajustados por la misma línea. Este hallazgo nos indicó que además de ser toxinas análogas, NTX y LTX III probablemente compiten por el mismo sitio receptor con afinidad cuantitativamente comparable.

La concentración de NTX no marcada que induce la mitad de



desplazamiento de [ $^{125}$ I]-NTX unida es  $K_{0.5} = 158$  nM. La expresión de  $K_{0.5}$  que usamos para medir  $K_d$  fue :

$$K_{0.5} = K_d (1 + [L^*]_{0.5}/K_{d*}) \quad (2)$$

donde  $[L^*]_{0.5}$  es la concentración de [ $^{125}$ I]-NTX a la mitad de desplazamiento (43 nM),  $K_{d*}$  (200 nM, ver antes) y  $K_d$  son constantes de disociación de complejos formados entre sinaptosomas y [ $^{125}$ I]-NTX o NTX no marcada, respectivamente. El valor de  $K_d$  calculado de la ecuación 2 es entonces 131 nM.

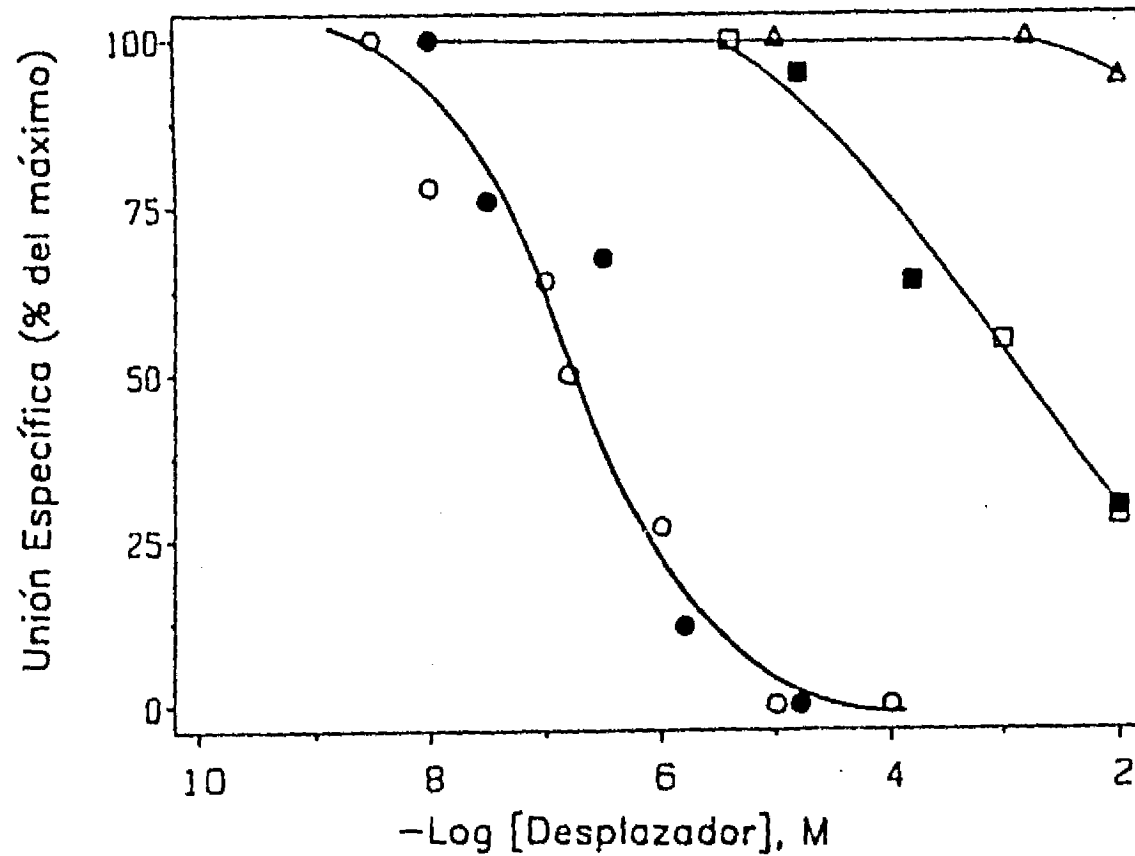


FIGURA 6. Desplazamiento de [ $^{125}$ I]-NTX y [ $^{125}$ I]-LTX II por NTX no marcada. Efecto de bloqueadores del canal de  $K^+$  sobre la unión de [ $^{125}$ I]-NTX. Sinaptosomas fueron incubados por 60 min a 25 °C con 50 nM [ $^{125}$ I]-NTX (○) o 50 nM [ $^{125}$ I]-LTX II (●) mas las concentraciones indicadas de NTX no marcada. [ $^{125}$ I]-NTX o [ $^{125}$ I]-LTX II unida fue medida usando el ensayo de filtración rapida descrito al pie de la figura 5. También se indica el desplazamiento de [ $^{125}$ I]-NTX por TEA (■), 4-AP (□) y CsCl (△). La unión no específica ha sido sustraída.

La figura 6 también ilustra el efecto de 4-aminopiridina (4-AP), tetraetilamonio (TEA) y cloruro de cesio (CsCl), 3 bloqueadores de canales de K<sup>+</sup> no específicos, sobre la unión de [<sup>125</sup>I]-NTX a sinaptosomas. CsCl no tiene efecto notorio a la concentración máxima ensayada (10 mM), mientras 4-AP y TEA desplazan hasta el 75% de la unión específica, aunque con una concentración 4 órdenes de magnitud mayor que la NTX nativa.

TABLA 2. Unión de [<sup>125</sup>I]-NTX a Sinaptosomas en la presencia de Otras Neurotoxinas o Bloqueadores del canal de K<sup>+</sup>.

Adición	Concentración (M)	[ <sup>125</sup> I]-NTX Unida (% del control)
ninguna		100
tetrodotoxina	1.28 x 10 <sup>-6</sup>	97
γ-toxina (f.s.s.)	1.0 x 10 <sup>-7</sup>	102
L.q.q. IV	3.0 x 10 <sup>-6</sup>	96
Caribdotoxina	2.0 x 10 <sup>-7</sup>	101
Melitina	2.0 x 10 <sup>-6</sup>	103
Verapamil	1.0 x 10 <sup>-3</sup>	81
TEA	1.0 x 10 <sup>-2</sup>	55
4-AP	1.0 x 10 <sup>-2</sup>	59
CsCl	1.0 x 10 <sup>-2</sup>	97

Media de 2 experimentos independientes. "Ninguna" adición representa la unión total de [<sup>125</sup>I]-NTX a sinaptosomas intactos. Los desplazamientos con otras toxinas o bloqueadores del canal de K<sup>+</sup> fueron realizados como se describe al pie de la figura 6.

En la tabla 2 presentamos un resumen de los efectos de diversas neurotoxinas y bloqueadores del canal de potasio sobre la unión de [<sup>125</sup>I]-NTX a sinaptosomas. Como era esperado, bloqueadores del canal de

sodio como Tetrodotoxina,  $\gamma$ -toxina de *Tityus serrulatus* (una  $\beta$ -escorpiotoxina), *L.q.q. IV* (*Leirus q. quinquestriatus IV*, una  $\alpha$ -escorpiotoxina. Ver Jover *et al.*, 1980, para detalles en esta clasificación), a concentraciones que exceden en mucho su  $K_D$ , no tienen ningun efecto sobre la unión total de [ $^{125}$ I]-NTX. Lo mismo se aplica al bloqueador de canal de  $K^+$  Caribdotoxina, a la toxina de veneno de abeja con actividad fosfolipásica Melitina (Haberman, E., 1972), al bloqueador del canal de  $Ca^{++}$  Verapamil (Triggle, D. and Janis, R., 1987) y el bloqueador inespecífico de canales de potasio CsCl. Solo TEA y 4-AP, ya descritos, desplazaron 45 y 41% respectivamente, la unión total de [ $^{125}$ I]-NTX.

#### 2.6 La Asociación de $^{125}$ I-NTX a Sinaptosomas es Independiente de Voltaje.

El potencial de membrana ha jugado un papel prominente en la unión de toxinas de alacrán (ScTx) a sinaptosomas. Por ejemplo, la [ $^{125}$ I]-ScTx usada por Catterall reduce su unión específica desde 100% en 5 mM KCl hasta 35% en 135 mM KCl (Ray *et al.*, 1978). Por otro lado, la capacidad de los sinaptosomas para mantener un potencial de membrana es bien reconocida (Blaustein and King, 1976). Adicionalmente, la acción de NTX en axón gigante de calamar fue primero reportada como voltaje-independiente (Carbone *et al.*, 1982), pero en un estudio mas reciente los mismos autores han encontrado cambios en el efecto bloqueador de la NTX en función de su concentración y el potencial de membrana (Carbone

et al., 1987).

Este conjunto de datos nos incitó a buscar cambios en la unión específica de [ $^{125}\text{I}$ ]-NTX a sinaptosomas polarizados y despolarizados. La tabla 3 presenta resultados de capacidad de unión máxima de 100 nM [ $^{125}\text{I}$ ]-NTX a sinaptosomas intactos en presencia de 5 mM KCl en el medio de incubación (control, sinaptosomas polarizados) y unión a sinaptosomas despolarizados con KCl o Valinomicina. Como se observa, incrementos adicionales en la concentración de KCl tienen poco efecto en la unión de  $^{125}\text{I}$ -NTX.

TABLA 3. Unión de [ $^{125}\text{I}$ ]-NTX a Sinaptosomas en condiciones polarizadas y despolarizadas\*.

Condición	Unión Total (pmol/mg)
5 mM KCl	0.35
60 mM KCl	0.36
135 mM KCl	0.34
5 mM KCl + 1 $\mu\text{M}$ Valinomicina	0.32

\*En los experimentos con 5 mM KCl, la unión de [ $^{125}\text{I}$ ]-NTX fue medida como se describe antes, excepto que el NaCl fue reemplazado por Cloruro de Colina. En experimentos con concentraciones crecientes de KCl, el cloruro de colina fue reducido para que  $[\text{KCl}] + [\text{cloruro de colina}] = 140$  mM. Valinomicina fue agregada junto con la toxina marcada. Sinaptosomas lisados representan sinaptosomas normales incubados 30 min a 0°C en 6 volúmenes de agua destilada, congelados y descongelados 2 veces y centrifugados para obtener una pastilla. La concentración de [ $^{125}\text{I}$ ]-NTX fue 100 nM. Cada condición fue hecha por duplicado y los resultados son la media de dos experimentos separados.

Para asegurar la despolarización, hemos añadido el ionóforo de  $\text{K}^+$  Valinomicina y hemos también sometido los sinaptosomas a lisis osmótica seguida por ciclos de congelamiento-descongelamiento. Ninguno de estos

procedimientos modifica la unión de [ $^{125}$ I]-NTX. Solo se observa un pequeño incremento en el caso de unión a membranas sinápticas, mas probablemente debido a enriquecimiento parcial del receptor.

#### 2.7 NTX Inhibe la Captura de [ $^3$ H]-GABA con una $IC_{50}$ Menor que su $K_{0.5}$ .

Se sabe que neurotoxinas que actúan a nivel de canales de sodio o potasio en terminales nerviosas alteran de alguna manera el potencial de membrana y/o flujos de calcio. Esto modifica de una manera sustancial la liberación y captura de neurotransmisores (Blaustein, 1975). GABA (ácido  $\gamma$ -amino butírico), hasta ahora considerado uno de los mas importantes neurotransmisores inhibidores en el SNC de mamíferos, es captado activamente por las terminaciones nerviosas. La captación es inhibida por toxinas que actúan a nivel de canal de sodio como Veratridina, Tetrodotoxina y  $\alpha$  y  $\beta$ -escorpiotoxinas (Martin, 1973; Blaustein and King, 1976; Romey *et al.*, 1976), o bloqueadores del canal de potasio como 4-AP y TEA (Llinás, *et al.* 1976; Tapia and Sitges, 1982). NTX, por su parte, induce liberación de GABA en sinaptosomas por un bloqueo específico de la permeabilidad a  $K^+$ , de acuerdo a Sitges *et al.* (1986). Sin embargo, la  $ED_{50}$  reportada por estos autores es de solo 2.9 nM, en una preparación sinaptosomal en la que la unión específica de [ $^{125}$ I]-NTX es 200-300 nM. Esto motivó nuestro interés por esclarecer la diferencia entre ensayos de unión y propiedades farmacológicas de la NTX.

En nuestro sistema experimental no fue posible inducir la liberación de GABA por NTX (Fig. 7). No obstante, el motivo puede ser explicable:

el experimento dicta que sinaptosomas previamente cargados con [ $^3\text{H}$ ]-GABA liberen el transmisor en soluciones con y sin toxina. La diferencia entre éstas será la liberación de GABA inducida por la toxina. Sin embargo, la velocidad de liberación de GABA es igual o mas rápida a la velocidad de unión de NTX a su receptor (compárese Fig. 7 con Fig. 4). Entonces, solo un sistema que involucre liberación del transmisor al equilibrio y permita un tiempo crítico de incubación toxina-receptor podrá evaluar el efecto de la NTX. Usando un método de perfusión en sinaptosomas, Sitges *et al* pudieron lograrlo.

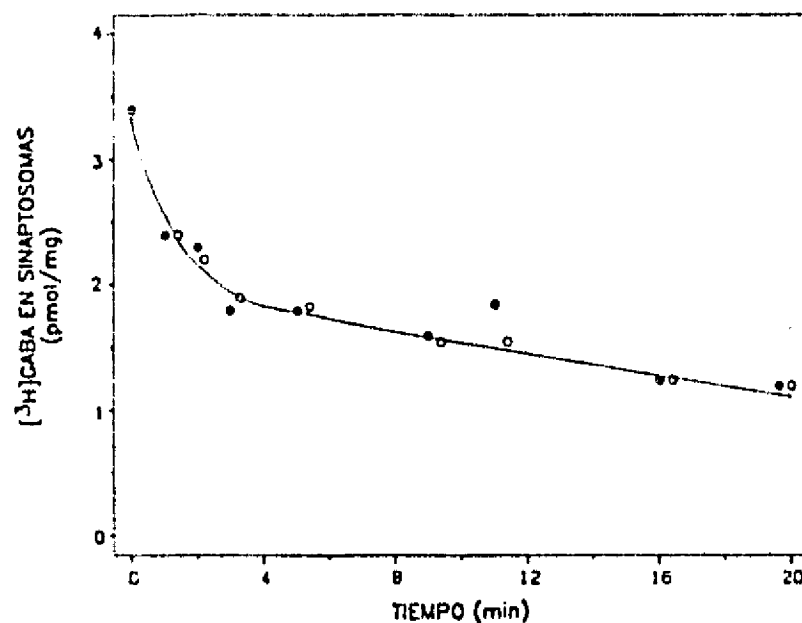


FIGURA 7. Liberación de [ $^3\text{H}$ ]-GABA por Sinaptosomas en Ausencia y Presencia de NTX. Sinaptosomas suspendidos en sacarosa fueron diluidos en "medio de sodio", conteniendo: 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.8 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM Glucosa, Hapes-Tris 25 mM pH 7.2 y 0.11 Albúmina de suero bovino. La concentración final fue 1.5 mg protein/ml. Alícuotas de 225  $\mu\text{l}$  fueron equilibrados a 37 °C por 5 min y luego [ $^3\text{H}$ ]-GABA (25  $\mu\text{l}$ ) fue agregado a una concentración final de 50 nM. Después de 10 min de incubación, cada tubo fue centrifugado y la pastilla fue resuspendida en el mismo medio libre de [ $^3\text{H}$ ]-GABA sin (○) o con (●) 1  $\mu\text{M}$  NTX. La incubación, realizada a 37 °C, fue detenida al mezclar 250  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción con 2 ml de medio de sodio enfriado por hielo y filtrando a través de filtros Whatman GF/C. Los filtros fueron lavados 2 veces con 2 ml de medio de sodio y la radiactividad retenida fue determinada en un contador  $\beta$ .

Por otro lado, la captura de [<sup>3</sup>H]-GABA inhibida por NTX y otras toxinas representó para nosotros un ensayo funcional que redituó beneficios hacia una mejor comprensión de la interacción NTX-receptor. En la Fig. 8a mostramos el efecto bloqueador de NTX sobre la captura de [<sup>3</sup>H]GABA. Aquí, a concentraciones saturantes (3  $\mu$ M), NTX reduce la captura del transmisor 36%, cayendo desde una Vmax de 410 pmol/min/mg (control) hasta una Vmax de 262 pmol/min/mg. La curva dosis-respuesta (Fig. 8b) se obtuvo midiendo la captura de GABA al equilibrio en presencia de diferentes concentraciones de NTX. De nuevo, la IC<sub>50</sub> obtenida de estos experimentos es 2 órdenes de magnitud menor que la K<sub>0.5</sub> obtenida para desplazar [<sup>125</sup>I]-NTX de sinaptosomas (1-2 nM y 200 nM, respectivamente). Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Sitges *et al.*, en la inhibición de la liberación de GABA por NTX, y al mismo tiempo nos sugieren una función polivalente de la toxina. El hecho de que se requieran diferentes concentraciones para saturar diversas funciones mediadas por NTX en el mismo tejido expone una serie de alternativas para considerar como hipótesis de trabajo: la más viable es considerar que NTX es capaz de unirse a más de un receptor en sinaptosomas. La afinidad por cada receptor varía y esto se refleja en diferentes dosis de NTX necesarias para evocar un efecto particular. Esto no sería del todo especulativo, considerando cuán diversa es la población de canales de potasio en cerebro y la habilidad de NTX para reconocer diferentes receptores. Por ejemplo, en músculo esquelético, NTX bloquea el canal de K<sup>+</sup> dependiente de Ca<sup>++</sup> con K<sub>d</sub> de 400 nM; en endotelio de aorta, impide la salida de <sup>86</sup>Rb (isótopo usado como sustituto del K<sup>+</sup>) a dosis entre 150 y 300 nM (Schilling, *et al.* 1987);

En axón gigante de calamar NTX bloquea canales de  $K^+$  dependientes de voltaje con  $K_d = 300$  nM (Carbone et al. 1986). En cultivo primario de hígado, NTX bloquea corrientes de  $K^+$  a dosis que oscilan entre 100 y 400 nM (Marchetti, C. comunicación personal). En sinaptosomas de cerebro, NTX impide la liberación y captura de GABA al bloquear permeabilidad a  $K^+$  (Sitges et al., 1986 y este trabajo) con  $K_d$  de 1-3 nM. Ante tan amplio espectro de actividad, resulta difícil atribuir a la NTX un solo receptor. De ser así, éste estaría universalmente distribuido. Nos

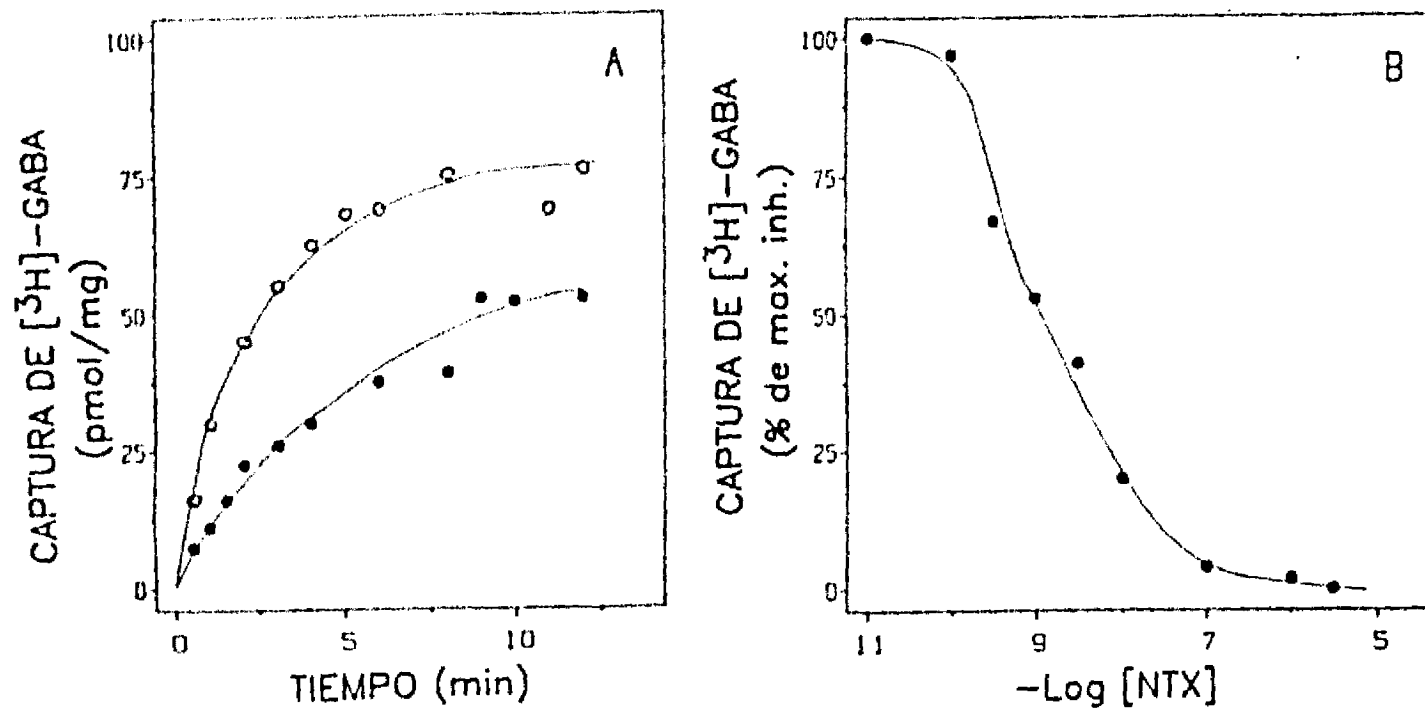


FIGURA 6. Efecto de NTX sobre la Captura de GABA por Sinaptosomas. (A) Curso temporal de la captura de  $[^3H]$ -GABA. Sinaptosomas (0.5 mg/ml) fueron preincubados por 15 min con 3  $\mu M$  NTX (●) o sin la toxina para el control (○). La captura de GABA fue medida a los tiempos indicados después de la adición de 500 nM  $[^3H]$ -GABA (diluído 1:5 con GABA no marcado). (B) Curva dosis-respuesta para la inhibición de la captura de GABA por NTX. Sinaptosomas (0.5 mg/ml) fueron preincubados con las concentraciones indicadas de NTX por 15 min a 37 °C; luego,  $[^3H]$ -GABA (20 nM, concentración final) fue agregado y la captura medida 10 min después. Cada punto representa la media de 2 experimentos conducidos por duplicado.



parece mas plausible la idea de una NTX reconociendo diversos receptores (presumiblemente, canales de potasio todos ellos). En este contexto, asumimos que en cerebro existen al menos 2 tipos de receptores para NTX con diferente  $K_D$ . El de alta afinidad es reconocido en el ensayo farmacológico de la liberación del transmisor, mientras que el de baja afinidad lo es en el ensayo de unión de [ $^{125}\text{I}$ ]-NTX.

La pregunta obligada es ahora ¿Por qué [ $^{125}\text{I}$ ]-NTX no rastrea a el receptor de alta afinidad? En verdad, en nuestro ensayo de unión, incubamos sinaptosomas con [ $^{125}\text{I}$ ]-NTX a concentraciones tan bajas como 100 pM. Sin embargo, nuestra relación señal-ruido nunca fue confiable hasta entrar en el orden de decenas de nanomolar. Un sitio de alta afinidad, si hubiese existido, no habría sido detectado en nuestro ensayo con radioligando.

*2.8 Anticuerpos Monoclonales Anti-NTX Permiten Deslindar "Sitios Activos" de Unión de NTX a Sinaptosomas.*

Contando con ensayo de unión de [<sup>125</sup>I]-NTX e inhibición de captura de GABA por NTX a sinaptosomas, empezamos a investigar el efecto de anticuerpos monoclonales (Mab) sobre las propiedades cinéticas y farmacológicas de la toxina.

8 clonas de anticuerpos fueron identificadas como positivas en el reconocimiento de NTX (Pascal, et al, resultados no publicados). De ellas, 6 fueron probadas en el ensayo de unión [<sup>125</sup>I]-NTX-receptor con la siguiente hipótesis: si la unión Mab-NTX ocurre en un sitio diferente al de unión NTX-receptor entonces este último sitio pudiera estar todavía disponible para acomplejarse al receptor y la señal radiactiva en el ensayo no se afectaría. Por otro lado, Mabs que apagarán la señal nos indicaría que su unión con la toxina impide estéricamente su reconocimiento por el receptor. Posteriores estudios de Mab y fragmentos de NTX ayudarían a definir el "sitio activo" de la toxina.

Como experimentos control, incubamos concentraciones equimolares de [<sup>125</sup>I]-NTX con Mab purificados y filtramos el complejo como rutinariamente lo hacíamos, omitiendo sinaptosomas (para detalles, ver pie de Fig 9). Para nuestra sorpresa, encontramos que 4 Mab aumentaban considerablemente la unión de [<sup>125</sup>I]-NTX al filtro con respecto al control. Manejamos al menos 2 posibilidades para explicar esto: o el Mab se unía inespecíficamente al filtro, o bien formaba malla con otros Mab

que después se adhería al filtro. Cualquiera de estas 2 u otras posibilidades, no pudimos continuar su estudio con este ensayo (no hubiéramos podido distinguir entre la unión específica de la NTX al receptor y la inespecífica producida por el MAb al filtro). Sin embargo 2 de estos anticuerpos (BNTX 12 y BNTX 16) no alteraron la unión inespecífica de [ $^{125}$ I]-NTX al filtro y nos permitieron realizar experimentos adicionales que arrojaron resultados interesantes.

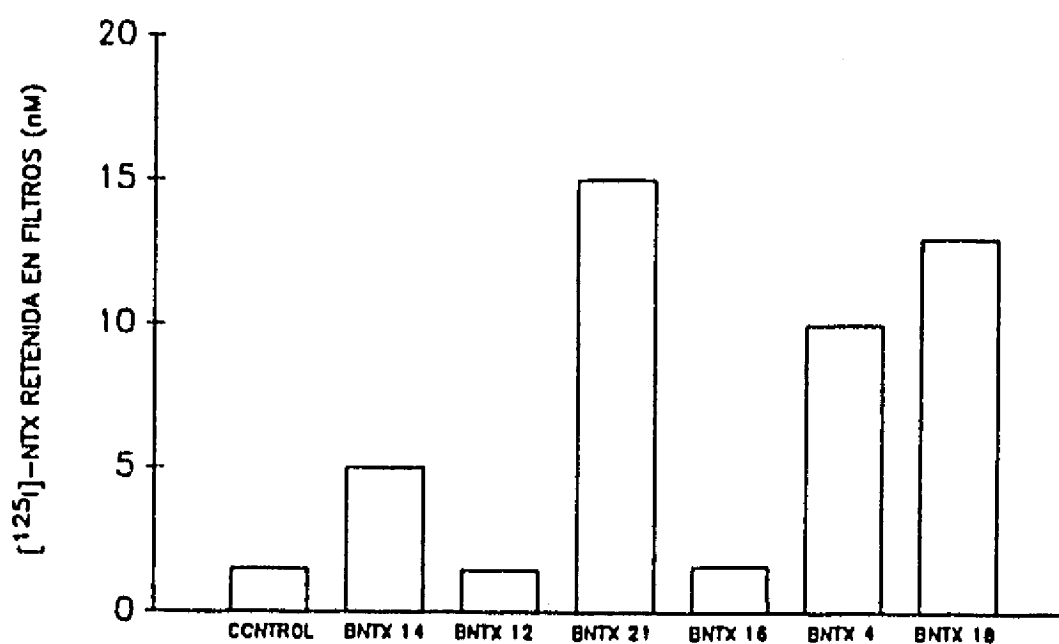


FIGURA 9. Unión de [ $^{125}$ I]-NTX a Filtros de Fibra de Vidrio y Efecto de Anticuerpos Monoclonales Anti-NTX Sobre Esta Unión. [ $^{125}$ I]-NTX (50 nM), resuspendida en "medio de incubación" (descrito al pie de la Fig. 5) fue incubada durante 1 h a temperatura ambiente con Anticuerpos monoclonales anti-NTX en ausencia de sinaptosomas. Las muestras (0.5 ml) fueron vertidas en filtros Whatman GF/C y lavadas 2 veces con 5 ml de medio de incubación conteniendo cloruro de colina en lugar de NaCl. La concentración de anticuerpos monoclonales usada fue también de 50 nM, asumiendo para todos un peso molecular de 160 000 Da. La cantidad de cpm retenidas por el control (1.5 nM) representa el 31 de las cuentas totales.

BNTX 16 previamente incubado con [ $^{125}\text{I}$ ]-NTX no altera la unión de la toxina a su receptor. Concentraciones equimolares de NTX y MAb no reducen las cpm (unión de [ $^{125}\text{I}$ ]-NTX a sinaptosomas) con respecto al control (incubación sin anticuerpo). Resultados similares se obtienen con BNTX 12. Por lo tanto, suponiendo una reacción completa anticuerpo-toxina, la hipótesis de acomplejamiento del anticuerpo a un sitio distinto al "sitio activo" de la toxina puede ser explorada en más detalle.

#### 2.8.1 BNTX 16 Se Une al Complejo NTX-Receptor.

Para probar que BNTX 16 es capaz de reconocer NTX aun si ésta se halla unida a su receptor y, por lo tanto, verificar que esta interacción ocurre en un sitio distinto al sitio activo de unión de la toxina, montamos el siguiente experimento:

- 1.- Marcamos BNTX 16 a una radiactividad específica de 250 Ci/mmol, siguiendo un procedimiento similar al marcaje de toxinas.
- 2.- Incubamos diferentes concentraciones de NTX no marcada con sinaptosomas. Los tiempos de incubación variaron, pero a los 10 min ya teníamos el complejo NTX-receptor.
- 3.- Precipitamos el complejo NTX-receptor por centrifugación y lavamos rápidamente los sinaptosomas para retirar la toxina libre.
- 4.- Resuspendimos el precipitado en una solución con BNTX 16 marcado (0.137  $\mu\text{g/ml}$ , concentración final) y lo incubamos por 20 min. Como control, a muestras similares se les añadió BNTX 16 no marcado

(0.12 mg/ml, concentración final), y se les incubó por el mismo periodo.

5.- Filtramos las muestras utilizando filtros GF/C, que habían demostrado tener una retención nula de BPTX 16 marcado. En menos de 8 segundos completamos el lavado de los sinaptosomas.

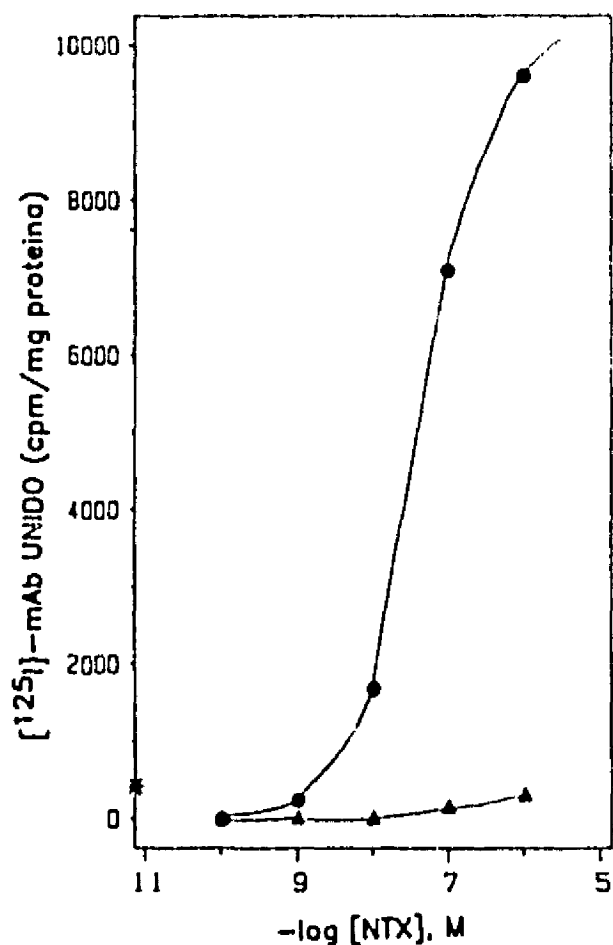


FIGURA 10. Unión de  $[^{125}\text{I}]$ -BNTX 16 al Complejo NTX-Receptor Sinaptosomal. Sinaptosomas (0.3 mg) fueron incubados 10 min a 36 °C con las concentraciones indicadas de NTX no marcada en un volumen final de 500  $\mu\text{l}$ . La mezcla fue centrifugada y la pastilla rápidamente lavada 2 veces con buffer de incubación sin toxina. Inmediatamente se agregó a cada muestra una concentración fija de  $[^{125}\text{I}]$ -BNTX 16 (0.137  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y una segunda incubación (20 min a 22 °C) tuvo efecto en ausencia (●) o en presencia (▲) de un exceso de BNTX 16 no marcado (0.12 mg/ml). La reacción fue terminada al resuspender la muestra en 5 ml de buffer de incubación a 4 °C y filtrando inmediatamente la muestra en filtros Whatman GF/C, los cuales fueron lavados 2 veces adicionales con el mismo medio. El asterisco (\*) indica la cantidad absoluta de cpm retenidas en el filtro cuando  $[^{125}\text{I}]$ -BNTX 16 es filtrado sin sinaptosomas.

La Fig. 10 muestra los resultados del experimento anterior. Como puede observarse, la unión del anticuerpo al complejo es una función de la concentración de NTX, lo que excluye la posibilidad de que el anticuerpo se esté uniendo inespecíficamente a los sinaptosomas. En las muestras marcadas como control, demostramos que la unión  $^{125}\text{I}$ -BNTX 16-toxina puede ser competitivamente inhibida por BNTX 16 no marcado, ya que las cpm en el filtro caen a valores mínimos.

Este resultado demuestra que NTX puede unir al mismo tiempo y en diferentes sitios, 2 diferentes macromoléculas como son el anticuerpo monoclonal y el canal de potasio. Además, una interacción anticuerpo-toxina solo puede ocurrir cuando esta última se halla expuesta, es decir, encarando la parte extracelular de los sinaptosomas, lo que excluye internalización de la toxina como mecanismo efectivo de acción.

#### *2.8.2 Anticuerpos Monoclonales Anti-NTX Inhiben el Efecto de NTX Sobre la Captura de GABA por Sinaptosomas.*

Este experimento nos enseñó que cada anticuerpo se une distintivamente a NTX. Aprovechando el efecto inhibitor de la NTX sobre la captura de GABA en sinaptosomas, ensayamos cada uno de los anticuerpos para buscar aquellos que "quelaran" la toxina e inhibieran su acción, o aquellos que, aún unidos a la toxina, le permitieran actuar.

En este contexto, BNTX 16, que había probado "respetar" la unión de NTX a sinaptosomas sin sacrificar el reconocimiento de la toxina, debería permitir la acción bloqueadora de NTX sobre la captura de GABA, suponiendo que la sola formación del complejo ligando-receptor fuera suficiente para activar los mecanismos intracelulares que se traducen en este fenómeno. Otros anticuerpos que por impedimento estérico bloquearan el sitio de unión de la NTX, eliminarían el efecto de la toxina y la captura de GABA sería similar a la del control.

La Fig 11 muestra cuán diversos son los anticuerpos en su efectividad para eliminar la acción bloqueadora de NTX sobre la captura de GABA. Los detalles experimentales están al pie de la figura. Quizá aquí sea suficiente decir que, previa incubación Anticuerpo-NTX, el complejo se reincuba con sinaptosomas y posteriormente se prueba su capacidad para capturar [<sup>3</sup>H]-GABA. Al control, que consiste de sinaptosomas sin tratamiento, se le sustraen las cpm de la muestra que contiene sinaptosomas con NTX. La diferencia ("el efecto inhibitor de NTX sobre la captura de GABA") es normalizado a 100% y las cpm de las muestras que contienen anticuerpos son expresadas bajo este criterio.

Como puede observarse, BNTX 4 y BNTX 16 no inhiben significativamente el efecto bloqueador de NTX sobre la captura de GABA, aún cuando BNTX 16 demostró unirse al complejo NTX-receptor. Sin embargo, BNTX 14 y BNTX 18 eliminan el bloqueo en más del 50%, mas probablemente por "secuestro" de la toxina o inaccesibilidad de ésta para encontrar el receptor. Como quiera que sea, este ensayo farmacológico representa

un nuevo método aclarar y extender el concepto estructura-función no solo de este péptido, sino de otras toxinas ó proteínas con función biológica semejante.

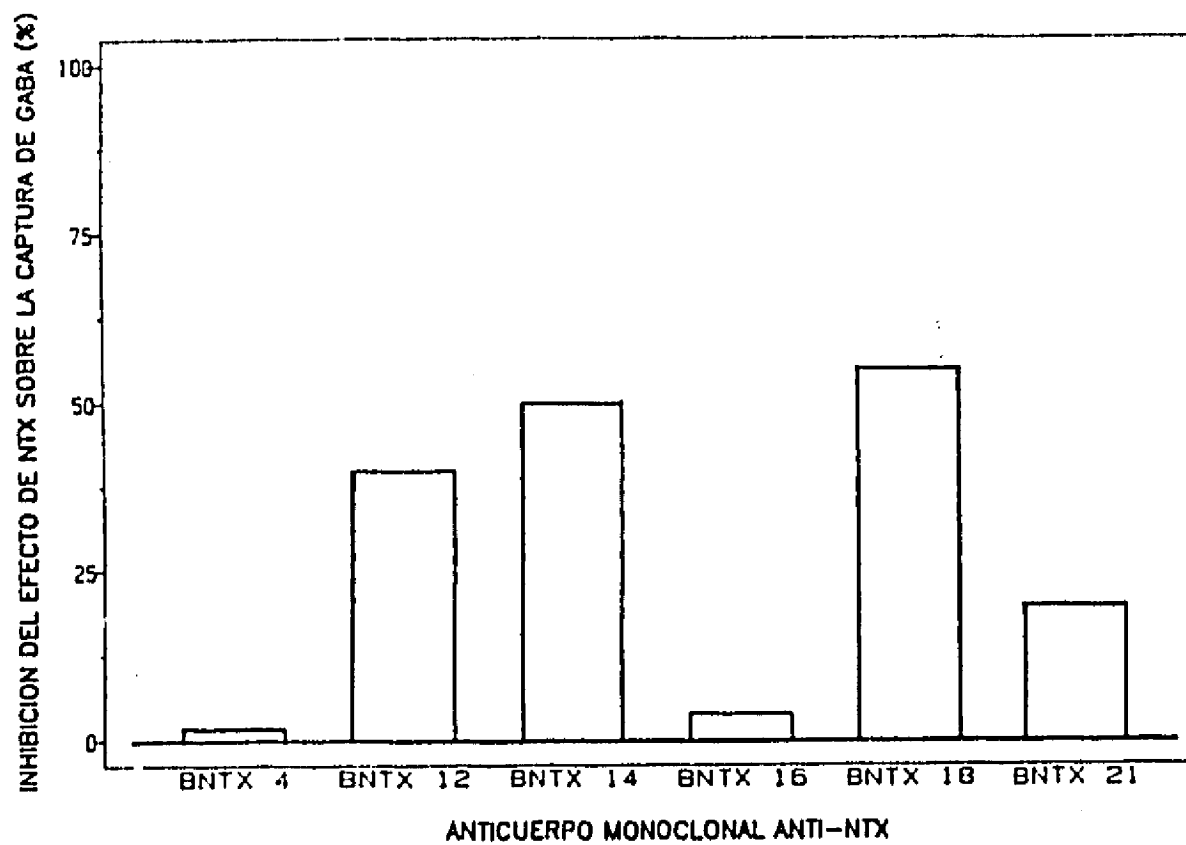


FIGURA 11. Inhibición por Anticuerpos Monoclonales del Efecto de NTX Sobre la Captura de [<sup>3</sup>H]GABA. Concentraciones equimolares de NTX y Anticuerpos monoclonales (300 nM) fueron incubados 20 min a 37 °C en 0.25 ml de "medio de sodio". Inmediatamente después, una pequeña alícuota (15 µl) de una solución conteniendo sinaptosomas fue agregada para dar concentración final de 0.2 mg. Una segunda incubación tuvo efecto (10 min a 37 °C). Después de esta segunda incubación, 10 µl de [<sup>3</sup>H]GABA (20 nM, concentración final) fueron agregados para una tercera incubación (10 min a 37 °C). La reacción fue terminada al resuspender la mezcla en 2 ml de medio de sodio frío y filtrada como se detalla al pie de la figura 10. En nuestra escala, 0% representa el efecto completo de NTX sobre la captura de GABA en ausencia del anticuerpo. Alternativamente, 100% representa una anulación total por el anticuerpo del efecto de NTX sobre la captura de GABA.



2.9 La NTX, Herramienta Util en el Aislamiento del Canal de Potasio en Axón Gigante de Calamar.

La NTX bloquea específicamente canales de potasio dependientes de voltaje en axón de calamar (Carbone et al, 1982). Por "específicamente" se entiende que corrientes de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Ca}^{++}$  no se alteran y, siendo mas estricto, debería comprender también inalteración de corrientes de potasio que pasan a través de canales diferentes a los dependientes de voltaje. Bloqueadores "especificos" de canales de potasio pero que no distinguen entre ellos son generalmente "tapones" que ocluyen el poro por su incapacidad para pasarlo, por ejemplo TEA, y  $\text{Cs}^+$ , o los que atraviesan libremente la membrana y ocluyen el canal por ambos lados como 4-AP y Quinidina, entre otros. Ninguno de estos bloqueadores es candidato a ser utilizado como ligando para identificar y aislar un determinado canal de potasio porque carecen de los requisitos indispensables para tal tarea:

1. **Selectividad.** Como se mencionó arriba, estas drogas deben su efecto bloqueador a semejanzas químicas al potasio tales como carga, tamaño, energía de solvatación, etc., pero carecen de "blancos" determinados en la proteína que forma el canal, que es la que en última instancia dicta las características del mismo.

2. **Afinidad.** Esta cualidad es expresión directa del acoplamiento ligando-receptor y se determina generalmente por la configuración tridimensional del receptor, que une al ligando con diferentes grados de

afinidad. Idealmente, concentraciones nano o picomolares deben afectar parcial o totalmente a los receptores.

3. Reversibilidad de bloqueo, sitio para marcaje, estabilidad, etc. Características no todas ausentes en los bloqueadores mencionados, pero tampoco consistentemente encontradas.

La NTX reúne todas las características mencionadas, y eso la hace una herramienta útil en la purificación de su receptor. Nosotros iniciamos esta tarea utilizando una columna de Sepharosa con NTX inmovilizada, a la cual le pasabamos sinaptosomas solubilizados con Tritón. Después de lavado exhaustivo de proteínas no unidas, despegábamos el receptor putativo con un "golpe" de fuerza iónica, llevado a cabo con KCl 1 M. Obteníamos varias proteínas que, de ser una de ellas el receptor, hubiese logrado en ese solo paso varias decenas de veces de purificación. Sin embargo, nuestros intentos de montar un ensayo que nos permitiera medir la cantidad de receptor solubilizado fallaron, y el proyecto en esta dirección perdió fuerza.

El uso del reactivo de doble unión Disuccinimidilsuberato (DSS), dió nuevo impulso al proyecto y decidimos reiniciarlo con un tejido menos complicado en naturaleza proteica y que había probado unir NTX: el axón de calamar.

En colaboración con el Dr. Gianfranco Prestipino, del Instituto di Cibernetica e Biofisica del C.N.R. de Genova, Italia, solubilizamos con

2% CHAPS - 5 mg de membranas purificadas de axón de calamar en 0.15 M NaCl y 0.025% fosfatidilcolina (ver detalles al pie de la figura 12). Precipitamos el extracto (material no solubilizado) e incubamos el sobrenadante (3.2 mg in 6 ml) con 1 mg de NTX inmovilizada en 5 ml de Affi-gel P-10 por 1 hora. Completado el periodo, vaciamos en una columna la resina y la lavamos extensamente para eliminar proteínas no unidas. Cuando detectamos que la salida de proteínas era completa, eluimos el receptor putativo aplicando 10 mM de 4-AP, un agente que demostró desplazar [<sup>125</sup>I]-NTX de su receptor en sinaptosomas. Debido a la presencia de fosfatidilcolina en nuestras soluciones, el monitoreo de proteína no pudo ser fielmente seguido por A<sub>280</sub> nm. Sin embargo, la presencia de 4-AP en el amortiguador de elución originó un movimiento conspicuo en nuestra línea basal. Eso nos indicó la posible localización de nuestro receptor. Seleccionamos el tubo pico de la elución con 4-AP ("receptor") y lo dializamos extensamente. Como control, tomamos otras muestras de la corrida que deberían carecer del receptor específico (como la del tubo inmediato anterior a la aplicación de 4-AP, por ejemplo) e hicimos el mismo procedimiento. Ambas muestras, "control" y "receptor", se dividieron en partes iguales y se incubaron con 300 nM [<sup>125</sup>I]-NTX en ausencia y en presencia de 20 μM NTX fría. Después de 20 min se agregó una solución de DSS (100 mM en dimetilsulfóxido) a cada muestra a una concentración final de 1 mM y se incubó por 15 min en hielo. Se detuvo la reacción neutralizando el exceso de DSS con 20 mM Tris-HCl. Se aplicaron alícuotas de 20 μl a un gel SDS con gradiente continuo de poliacrilamida de 4% a 12%. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie, secados al vacío y procesados para obtener una placa

radiográfica.

La Fig. 1 del artículo de Prestipino et al., incluido como apéndice al final de esta tesis, muestra los resultados del procedimiento anterior. Las líneas No. 1 y 2 son tinciones de plata del gel SDS/poliacrilamida (pico de elución con 4-AP). Línea 1 son marcadores del peso molecular. Línea 2 es la proteína eluida con 4-AP de la columna de afinidad con NTX. Las líneas 3 y 4 es la autorradiografía del gel SDS/poliacrilamida. Línea 3 representa la proteína eluida con 4-AP y unida covalentemente a [<sup>125</sup>I]-NTX por medio del reactivo de doble unión DSS. Línea 4 es la misma proteína que en 3, sólo que un exceso de NTX fría (75 veces más que la "caliente") fueron agregados antes de agregar el reactivo de doble unión. [<sup>125</sup>I]-NTX se ha unido a 3 diferentes proteínas en la muestra eluida con 4-AP de M<sub>r</sub> 226, 160 y 66 K. La ausencia de las dos bandas de alto peso molecular en la muestra incubada con NTX indica que su unión es específica. Ya que tales proteínas no se encuentran en el tubo anterior a la aplicación de 4-AP (no se muestra), se trata de proteínas específicamente eluidas con 4-AP. Además, ninguna de ellas es múltiplo de la banda de 66 kD, presente en todas las muestras, lo que descarta que sean monómeros agregados.

### 3. La Caribdotoxina.

Poco se sabe acerca de la bioquímica de los canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{++}$  (canal de  $K$  ( $Ca$ )), debido principalmente a la falta de un ligando disponible para "sondear" bioquímicamente al canal. Recientemente, Miller *et al.* (1985), usaron la técnica de bicapas artificiales para describir una toxina con propiedades bloqueadoras específicas hacia el canal de  $K$  ( $Ca$ ). Los autores imaginaron al canal como un embudo con una gran boca debido a la alta conductancia a  $K^+$ , o como un remolino en el mar con gran capacidad aspiradora. La toxina sería un "tapón" perfectamente ajustado al remolino y le llamaron por eso "Caribdotoxina", en relación al personaje mitológico de La Odisea "Caribdes".

Aparte de la descripción sobre la manera de acción de la toxina sobre el canal, que hasta la fecha es perfecta, los autores aventuraron rasgos bioquímicos sobre su estructura que han resultado controvertidos. En su primer reporte, la Caribdotoxina es citada como una proteína de P.M. ~ 7000 Da. (semejante a la mayoría de las toxinas de alacrán ya descritas). En una publicación posterior donde se detalla su purificación (Smith *et al.*, 1986), se reporta un P.M. de 10 KDa, un  $NH_2$ -terminal correspondiente a Val y una proporción de 0.1% respecto al veneno total (como el Coeficiente de Extinción Molar fue definido con base en una composición de aminoácidos erróneamente calculada, su exactitud es discutible).

### 3.1 Purificación de la Caribdotoxina.

Interesados por encontrar péptidos estructuralmente relacionados a NTX en diferentes venenos de alacrán, nosotros también tuvimos oportunidad de apreciar el conspicuo efecto bloqueador de Caribdotoxina. Para su completo estudio, fue necesario purificarla. La figura 13a-c

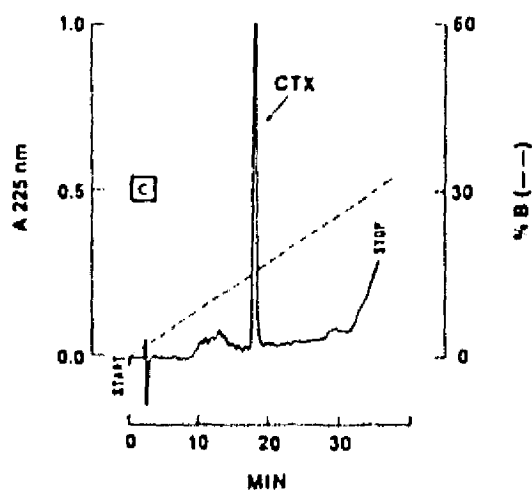
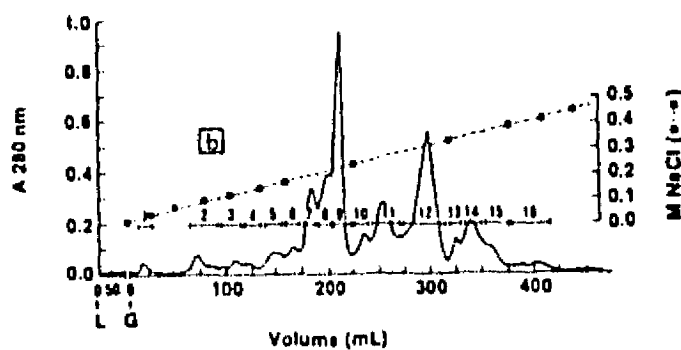
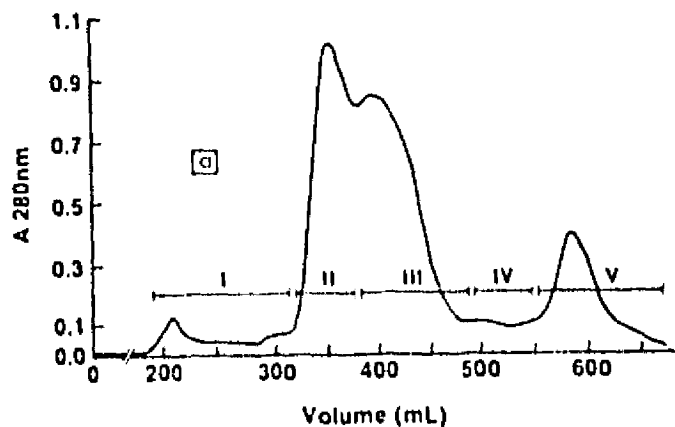
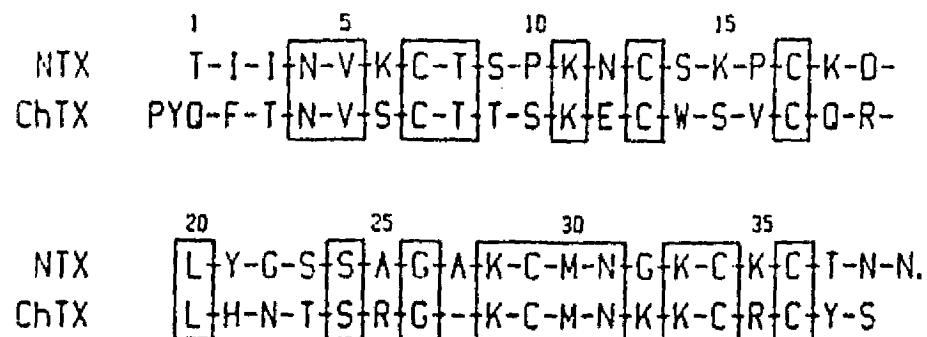


FIGURA 13. Purificación de Caribdotoxina. (a) Perfil de filtración en Sephadex G-50 de 100 mg de *L. q. quinquestriatus* venom (133 unidades a 280 nm en 5 ml), en 20 mM Acetato de amonio, pH 4.7. Una columna (1.8 x 200 cm) fue corrida a un flujo de 50 ml/h y fracciones de 5 ml fueron colectadas y mezcladas de acuerdo a Absorbancia a 280 nm, indicado por las barras horizontales (I-V). La recuperación fue de 83%. La fracción III contiene la mayor cantidad de CTX, a juzgar por la actividad bloqueadora. (b) Cromatografía de intercambio iónico de la fracción III. Una columna (0.9 x 27 cm) equilibrada en 20 mM Acetato de amonio pH 4.7, fue cargada con 103 ml conteniendo 48 mg de la fracción III y eluida con un gradiente lineal de NaCl desde 0 hasta 0.38 M (250 ml c.u. en el amortiguador de equilibrio) a un flujo de 30 ml/h. Recuperación fue de 97%. La fracción III.13 contiene Caribdotoxina. (c) Perfil en HPLC de Caribdotoxina. 25  $\mu$ l conteniendo 16  $\mu$ g de fracción III.13 fueron aplicados a una columna de fase reversa (C8, Vydac) y eluida con un gradiente desde 100% A (0.1% ácido trifluoroacético en H<sub>2</sub>O) hasta 60% de B (Acetonitrilo) por un periodo de 70 min a un flujo de 1 ml/min. Caribdotoxina es eluida a los 18 min; la pendiente después de 30 min corresponde al artefacto de lavado del buffer. Algunos contaminantes están presentes a los 11 min, aproximadamente.

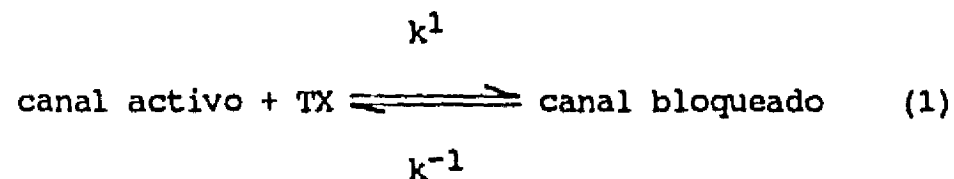
muestra los 3 pasos cromatográficos para obtenerla pura, con la

metodología descrita al pie de la figura. También la radiomarcamos (Fig. 13d), con el doble propósito de demostrar su pureza y unirla a su receptor. Sin embargo, desde el rendimiento final de la toxina hasta su afinidad empezamos a discrepar con los resultados publicados. Primero: nuestro rendimiento fue de 0.5%, es decir, 5 veces más que el reportado. Segundo: geles de SDS señalaban inequívocamente un péptido de  $M_r$  menor que la  $\gamma$  toxina (un péptido de 7 000 Da), pero igual a NTX (un péptido de 4 200 Da; ver también Fig. 1 del artículo de Valdivia *et al.*, al final de la tesis). Tercero: los análisis de la composición de aminoácidos reportaban un número de aminoácidos que era la mitad de los previamente reportados. Cuarto: la secuencia del  $NH_2$ -terminal nunca fue posible con la degradación automática de Edman por tratarse de un péptido con piroglutamato en esta posición (García, *et al.*, 1988) y no de Val. Como método alternativo para secuenciarla, decidimos fragmentar la toxina con bromuro de cianógeno, que hidroliza donde residuos de Met se hallen presentes. 2 péptidos fueron generados: uno con el  $NH_2$ -terminal bloqueado y el otro un decapeptido con 60% de homología a NTX. Este último resultado fue más que sorprendente: buscando un péptido diferente a Caribdotoxina con semejanza a NTX encontramos que la propia Caribdotoxina era su mejor análogo. A continuación presento la secuencia completa de ambas toxinas:



### 3.2 Cinética de Unión.

La figura 14 muestra bloqueo del canal de K (Ca) de músculo esquelético a diferentes concentraciones de Caribdotoxina. Análisis de histogramas de distribución de eventos de bloqueo contra tiempo arrojan una sola constante ( $\tau_b$ ) a diferentes concentraciones de toxina, mientras la constante para eventos de apertura ( $\tau_a$ ) es una función de la concentración de la toxina. En otras palabras, el tiempo promedio de permanencia de Caribdotoxina en el canal es independiente de su concentración, mientras la probabilidad de encontrar el canal en estado abierto es inversamente proporcional a la concentración de la toxina. Además, el efecto bloqueador puede removerse después de perfundir la cámara (Fig. 14). Todas estas características son compatibles con un mecanismo de bloqueo lento en el cual la toxina (TX) se asocia reversiblemente con un canal activo en una reacción bimolecular (Vergara and Latorre, 1983):



Este esquema nos dice que cada estado de bloqueo observado en los registros de canal único son resultado del intervalo de tiempo en que una sola molécula de Caribdotoxina permanece en un solo canal. El esquema también predice que tanto los tiempos de permanencia del canal activo y bloqueado deben estar exponencialmente distribuidos y el tiempo promedio de bloqueo o  $\tau_b$ , debe ser independiente de la concentración de toxina, ya que:



$$1/\tau_b = k^{-1} \quad (2)$$

Además, el tiempo promedio del canal en el estado activo,  $\tau_a$ , debe ser inversamente proporcional a la concentración de toxina, ya que:

$$1/\tau_a = k^1 [\text{TX}] \quad (3)$$

Como se muestra en la figura 14, las predicciones se satisfacen.

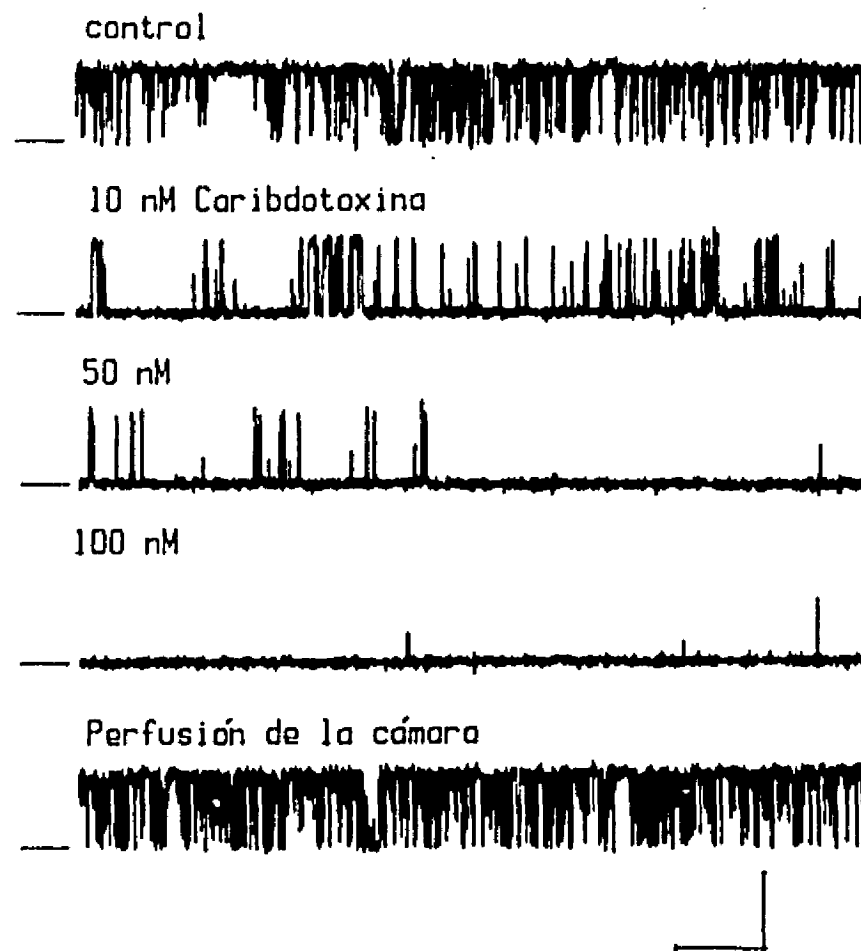


FIGURA 14. Canal de  $K^+$  dependiente de  $Ca^{++}$  reconstituido en bicapas y su respuesta a diferentes concentraciones de Caribdotoxina. "Control" es el registro de corrientes de  $K^+$  a través de un solo canal incorporado en bicapas y con su parte interna encarando la cámara cis. Los registros siguientes son del mismo experimento con las concentraciones indicadas de Caribdotoxina agregadas el lado externo (trans). Tiempo transcurrido entre cada registro es aproximadamente 5 min. La perfusión fue hecha con 10 ml de la solución trans libre de toxina. Las soluciones fueron: 250 mM KCl cis, 50 mM KCl trans y 10 mM Hepes-Tris pH 7.2 en ambos lados. Las líneas a la izquierda de los registros indican línea basal (canal cerrado). Barras de calibración: 800 ms (horizontal) y 10 pA (vertical).

En nuestras condiciones, Caribdotoxina tiene una  $K_D$  de 1-2 nM, en contraposición a 4 nM observado por Miller y su grupo (si se considera que ellos tomaron como base un p.m. sobreestimado 2 veces, la  $K_D$  es idéntica).

#### 4. Las Serrulotoxinas.

La homología de NTX con Leiurustoxina y Caribdotoxina nos entusiasmó sobremanera y nos invitaba a redondear la hipótesis de trabajo inicial: NTX no es única en el género de toxinas de alacrán bloqueadoras de canal de potasio, sino la parte visible de un cuerpo que esconde un conjunto de ellas, cuyas características estructurales y funcionales las colocan en un sitio distinto en la clasificación de toxinas.

*L. quinquestriatus*, un alacrán israelí, ha producido ya 3 de ellas (LTX I y II y CTX); *C. noxius*, un alacrán mexicano, NTX. ¿Por que *Tityus serrulatus* (alacrán brasileño) no podría tener las suyas? De hecho, Carbone *et al* (1983), ya habían descrito a la toxina II-9A de este veneno, un péptido con propiedades bloqueadores del canal de  $K^+$  en axón gigante de calamar. Desafortunadamente, nosotros no pudimos completar este estudio porque tuvimos problemas para identificar al péptido. (La posición final de una toxina depende mucho de lo "generoso" o "estricto" de los "cortes" en las cromatografías iniciales de purificación). Sin embargo, 2 nuevos componentes que afectan al canal de K (Ca) fueron sistemáticamente separados. A ellos, siguiendo el criterio de los anteriores, los hemos llamado **Serrulotoxinas**.

La figura 15a muestra el paso final de purificación de estas toxinas, ya que los 2 cromatogramas iniciales han sido previamente publicados; 15b son geles acetato-urea de estas fracciones y 15c es el efecto sobre el canal de K (Ca) reconstituido en bicapas.

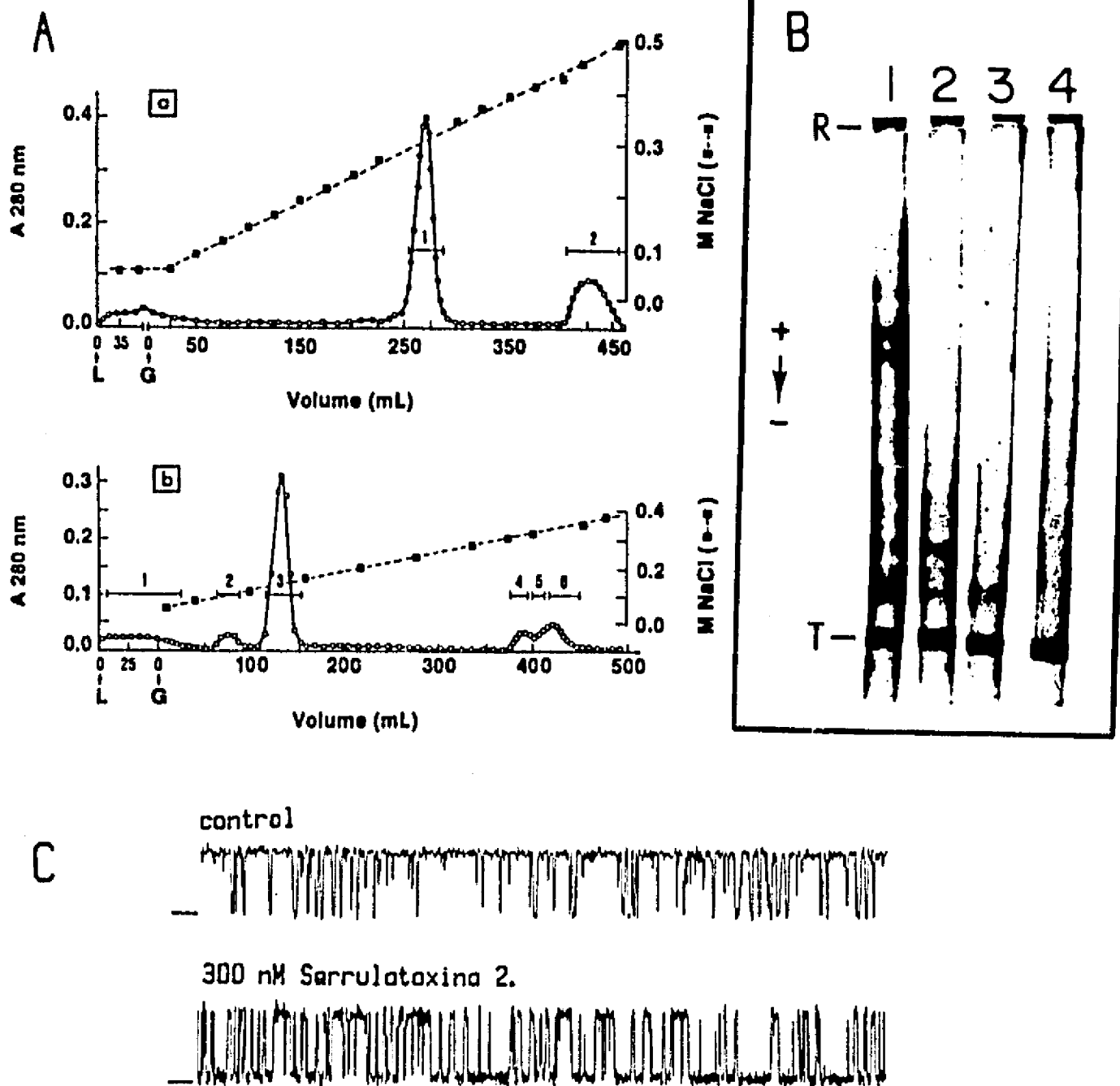


FIGURA 15. Purificación de Serrulatoxinas y efecto sobre canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{++}$  incorporados en bicapas. (a) La fracción III-10 (12 mg de proteína), obtenida de acuerdo a Possani et al (1981b) fue aplicada a la columna (L) y eluida con un gradiente lineal de 0 a 0.5 M NaCl (250 ml c.u.) en fosfato de sodio 0.05 M, pH 6.0 (iniciado en G). Las fracciones fueron mezcladas como indican las barras horizontales. La fracción III-10.1 es  $\gamma$ -toxin y fracción III-10.2 es Serrulatoxin-3. (b): la fracción III-8 del mismo cromatograma fue corrida en las mismas condiciones que la fracción III-10, excepto que el gradiente salino fue desde 0 hasta 0.38 M. Las fracciones 4 a 6 contienen actividad bloqueadora semejante a Serrulatoxin-3. Ya que ocurre imbricación, se han separado 3 mezclas, como indican las barras horizontales. La fracción III-8.4 y III-8.6 fueron homogéneas, en tanto que la fracción III-8.5 es

una mezcla de las dos. (B) geles  $\beta$ -alanina-acetato-urea (Reisfeld, et al., 1962) de varias fracciones de *T. serrulatus*: 1 (100 ug) de veneno soluble; 2 (30 ug) de fracción III; 3 (30 ug) de fracción III-10; 4 (30 ug) de Serrulatoxin-3. Resultados similares fueron obtenidos con Serulatoxinas 1 y 2. (C) Efecto de Serrulatoxin-3 en K (Ca) de músculo esquelético. Las condiciones fueron similares a las descritas al pie de la figura 14.  $P_o$  decreció desde 0.85 (control) hasta 0.32 en presencia de SRTX-3.

Como se observa, el tipo de bloqueo que ejercen sobre el canal es idéntico al de NTX, caracterizado por un tiempo de permanencia corto de la toxina en el canal. Además, aunque a la fecha aún esté pendiente la confirmación del peso molecular exacto de estos péptidos, la afinidad por su receptor es muy semejante a la de NTX: 300-400 nM.

Basados en filtración en gel (BioGel P-10), diálisis en bolsas con poro calibrado y PAGE-SDS, hemos estimado que el peso molecular de estos péptidos no rebasa 1 500 Da. De ser así, esto equivaldría a 1/3 del P.M. para NTX, CTX y LTX y le daría a este grupo un relieve adicional al término "toxinas de cadena corta". Sería interesantísimo comparar su secuencia con porciones de NTX o CTX para tratar de establecer un posible "sitio activo" de estos péptidos. Sin embargo, hemos fallado en los primeros intentos de secuenciarlas, muy posiblemente debido al bloqueo del  $NH_2$ -terminal, como en el caso de la CTX. La opción será romper los péptidos en fragmentos para analizar cada uno por separado.

## B I B L I O G R A F I A.

Barret, J.N., Magleby., K.L., Pallota, B.S. (1982) Properties of single Ca-activated K channels in cultured rat muscle. *J. Physiol. (London)* 331:211-230.

Benson, J.A., Levitan, I.B. (1983). Serotonin increases an anomalously rectifying  $K^+$  current in the *Aplysia* neurons R15. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:3522-3525.

Blatz, A.L., Magleby, K.L. (1986) Single apamin-blocked Ca-activated  $K^+$  channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle. *Nature* 323:718-720.

Blaustein, M.P. (1975). Effect of potassium, veratridine and scorpion venom on calcium accumulation and transmitter release by nerve terminal in vitro. *J. Physiol. (London)* 247:617-655.

Blaustein, M.P., and King, A.C. (1976). Influence of membrane potential on the sodium dependent uptake of GABA by presynaptic nerve terminals: experimental observations and theoretical considerations. *J. Membr. Biol.* 30:153-173.

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 (Lond.)* 296:90-91.

Carbone, E., Prestipino, G., Wanke, E., Possani, L.D., Maelicke, A. (1983). Selective actions of scorpions neurotoxins on the ionic currents of the squid giant axon. *Toxicon (Suppl.)* 3:57-60.

Carbone, E., Prestipino, G., Spadavecchia, L., Franciolini, F., Possani, L.D. (1987). Blocking of the squid axon potassium channel by noxiustoxin: a toxin from the venom *Centruroides noxius*. *Pfluegers Arch* 408:423-431.

Coronado, R., Latorre, R., Mautner, H.G. (1984). Potassium channels from lobster axonal membranes with delayed rectifier single channel properties. *Biophys. J.* 45:289-299.

Chicchi, G.C., Gimenez-Gallego, G., Ber, E., Garcia, M.L., Winkvist, R., Cascieri, M. (1988) Purification and characterization of a unique, potent inhibitor of apamin binding from *Lelurus quinquestriatus hebraeus* venom. *J. Biol. Chem.* 263:10192-10197.

Dolly, J.O., Halliwell, J.V., Black, J.D., Williams, R.S., Pelchem Matheus, A., Breeze, A.L., Meravan, F., Othman, I.B., Black, A.R. (1984). Botulinum neurotoxin and Dendrotoxin as probes for studies on transmitter release. *J. Physiol. (Paris)* 79:280-303.

Garcia, M.L., Gimenez-Gallego, G., Navia, M., Katz, G., Reuben, G.P. and Kaczorowski, G.P. (1988). Purification and structure determination

of charybdotoxin, a specific probe of Ca-activated  $K^+$  channels. *Biophys. J.* 53:151a.

Gurrola et al. 1986, manuscrito en preparación.

Haberman, E. (1972). Bee and wasp venoms. *Science (Wash.)* 177:314-322.

Hagiwara, S., Kusano, K., Saito, N. (1961). Membrane changes of *Onchidium* nerve cells in potassium rich media. *J. Physiol. (London)* 155:470-489.

Hermann, A., Erxleben, C. (1987). Charybdotoxin selectively blocks small Ca-activated  $K^+$  channels in *Aplysia* neurons. *J. Gen. Physiol.* 90:27-47.

Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol. (London)* 117:500-504.

Hugues, M., Duval, D., Kitagbi, P., Lazdunski, M., Jean-Pierre Vincent (1982). Preparation of a pure monoiodo derivative of the bee venom neurotoxin Apamin and its binding properties to rat brain synaptosomes. *J. Biol. Chem.* 257:2762-2769.

Jover, E. (1980). Two types of scorpion toxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes.



*Biochem. Biophys. Res. Comm.* 95:1607-1614.

Koppenhofer, E. and Schmidt, H. (1968). Effect of scorpion venom on ionic currents of the node of Ranvier. *Pfluegers Arch.* 303:133-149.

Latorre, R. and Miller, C. (1983). Conduction and selectivity in potassium channels. *J. Membrane Biol.* 71:11-30.

Llinás, R., Walton, K. Bohr, V. (1976). Synaptic transmission in the squid giant synapse after  $K^+$  conductance blockade with external 3- and 4-AP. *Biophys. J.* 16:83-86.

Martin, D.L. (1973) Kinetics of the sodium-dependent transport of gamma amino butyric acid by sinaptosomes. *J. Neurochem.* 21:345-356.

Matsuda, H., Saigusa, A., Irisawa, H. (1987). Ohmic conductance through the inwardly rectifying  $K^+$  channel and blocking by internal  $Mg^{++}$ . *Nature (London)* 325:156-159.

Miller, C., Moczydlowski, E., Latorre, R. and Phillips, M. (1985). Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca-activated  $K^+$  channels from mammalian skeletal muscle. *Nature (London)* 313:316-318.

Misler, S., Falke, L.C., Gillis, K., McDaniel, M.L. (1986). A metabolite-regulated potassium channel in rat pancreatic B cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:7119-7123.

Moczydlowski, E., Lucchesi, K. and Ravindran, A. (1988). An emerging pharmacology of peptide toxins targeted against potassium channels. *J. Membrane Biol.* 105:95-111.

Morrison, M. and Bayse, G.S. (1970). Catalysis of iodination by lactoperoxidase. *Biochemistry* 9:2995-3000.

Narahashi, T., Shaphiro, D.I., Deguchi, T., Scuka, M., Wang, C.M. (1972). Effects of scorpion venom on squid axon membranes. *Am. J. Physiol.* 222:850-857.

Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, M., Kangawa, K., Matsuo, H., Raftery, M.A., Hirose, T., Inyama, S., Hayashida, H., Miyata, T., Numa, S. (1984). Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature (London)* 312:121-127.

Possani, L.D., Alagón, A.C., Fletcher, P.L., Erickson, B.W. (1977). Purification and properties of mammalian toxins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. *Arch. Biochem. Biophys.* 180:394-403.

Possani, L.D., Martin, B.M., Mochca-Morales, J., Svendsen, U. (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.M., Svendsen, I. (1982). The primary structure of noxiustoxin: a K<sup>+</sup> channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffman. *Carlsberg Res. Commun.* 47:285-289.

Possani, L. D. (1984). Structure of Scorpion Toxins. In Handbook of Natural Toxins (Ed. by Anthony T. Tu) pp 513-550, Marcel Dekker, Inc. New York.

Prestipino, G., H.H. Valdivia, A. Liévano, A. Darszon, A. N. Ramirez, and L. D. Possani. Purification and reconstitution of potassium channel proteins from squid axon membranes. *FEBS Letters* 250:570-574. 1989.

Ray, R., Morrow, C.S., Catterall, W.A. (1978). Binding of scorpion toxin to receptor site associated with voltage-sensitive sodium channel in synaptic nerve ending particles. *J. Biol. Chem.* 253:7307-7313.

Reisfield, R.A., Lewis, U.J., Williams, D.E. (1962). Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels *Nature (London)* 195:281-283.

Sitges, M., Possani, L.D. Bayón, A. (1986) Noxiustoxin, a short-chain toxin from the mexican scorpion *Centruroides noxius*, induces

transmitter release by blocking  $K^+$  permeability. *J. Neurosci.* 6:1570-1574.

Smith, C., Phillips, M. and Miller, C, (1986). Purification of charybdotoxin, a specific inhibitor of the high-conductance Ca-activated  $K^+$  channel. *J. Biol. Chem.* 261:14607-14613.

Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kogima, M., Matsuo, H., Hirose, T., Numa, S. (1987). *Nature (London)* 328:323-328.

Tapia, R. and Sitges, M. (1982). Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. *Brain Res.* 250:291-299.

Tempel, B.L., Papazian, D.M., Schwarz, T.L., Yan, J.N., Yan, L.Y. (1987). Sequence of a probable potassium channel component encoded at *Shaker* locus of *Drosophila*. *Science* 237:770-775.

Thompson, S.H., Aldrich, R.W. (1980). In: *The Cell Surface and Neuronal Function*. C.W. Cotman, G. Poste, G.L. Nicolson. Editors. pp. 49-85. Elsevier, Amsterdam.

Timpe, L.C., Schwartz, T.L., Tempel, B.L., Papazian, D.M., Jan, Y.N., Jan. L.Y. (1988). Expression of functional potassium channels from *Shaker* cDNA in *Xenopus* oocytes. *Nature (London)* 331:143-145.

Triggle, D. and Janis, R. (1987). Calcium channel ligands. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxic.* 27:347-69.

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

Vergara, C. and Latorre, R. (1983). Kinetics of Ca-activated K<sup>+</sup> channels from rabbit muscle incorporated into planar bilayers. *J. Gen. Physiol.* 82:543-568.

ANEXO - 1

"CHARYBDOTOXIN AND NOXIUSTOXIN, TWO HOMOLOGOUS PEPTIDE INHIBITORS OF THE  $K^+$  ( $Ca^{++}$ ) CHANNEL", por Hector H. Valdivia, Jeffrey S. Smith, Brian M. Martin, Roberto Coronado y Lourival D. Possani.

FEBS LETTERS 2: 280-284 (1988)

## Charybdotoxin and noxiustoxin, two homologous peptide inhibitors of the $K^+(Ca^{2+})$ channel

Hector H. Valdivia\*, Jeffrey S. Smith\*, Brian M. Martin<sup>†</sup>, Roberto Coronado\* and Lourival D. Possani\*

\*Department of Physiology and Molecular Biophysics, Baylor College of Medicine, 1 Baylor Plaza, Houston, TX 77030, <sup>†</sup>National Institute of Mental Health, Molecular Neurogenetics Unit, Clinical Neuroscience Branch, Building 10 3D16, NIH, Bethesda, MD 20892, USA and Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3 Cuernavaca, Morelos 62271, Mexico

Received 30 October 1987

We show that noxiustoxin (NTX), like charybdotoxin (CTX) described by others, affects  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels of skeletal muscle ( $K^+(Ca^{2+})$  channels). Chemical characterization of CTX shows that it is similar to NTX. Although the amino-terminal amino acid of CTX is not readily available, the molecule was partially sequenced after CNBr cleavage. A decapeptide corresponding to the C-terminal region of NTX shows 60% homology to that of CTX, maintaining the cysteine residues at the same positions. While CTX blocks the  $K^+(Ca^{2+})$  channels with a  $K_d$  of 1-3 nM, for NTX it is approx. 450 nM. Both peptides can interact simultaneously with the same channel. NTX and CTX promise to be good tools for channel isolation.

Noxiustoxin; Charybdotoxin; Amino acid sequence;  $K^+$  channel; Single-channel recording; (Skeletal muscle)

### 1. INTRODUCTION

In recent years, the understanding of the structure and function of membrane-bound receptor proteins, including ion channels, has been greatly increased, due to the discovery of specific natural peptide inhibitors used as probes at molecular and cellular levels [1-6]. Although many different types of  $K^+$  channels have been extensively studied electrophysiologically, few biochemical data are available [7,8], primarily due to the lack of specific biochemical ligands for isolating channels in pure

form. From a variety of substances described as blockers of  $K^+$  channels ( $Cs^+$ , tetraethylammonium, 4-aminopyridine, etc., see review [9]), none have proven to be useful tools for channel isolation, because of the high concentration needed (millimolar range) and lack of specificity.

Recently, CTX, a protein isolated from the venom of the scorpion *Leiurus quinquestratus quinquestratus* was shown to block  $K^+(Ca^{2+})$  channels from rat skeletal muscle [10]. In single-channel recordings, CTX induced long-lived non-conducting states characteristic of a high-affinity channel blockade. The effect was reversible and was shown to be attributable to a basic peptide with a molecular mass in the range 7-10 kDa [11]. NTX, a peptide with 39 amino acid residues, was isolated from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* [12] and was shown to block the voltage-dependent  $K^+$  channel from squid axon [13,14], and changed  $K^+$  permeability in brain synaptosomes [15]. Since neither the primary structure of CTX nor the effect of NTX on

Correspondence address: B.M. Martin, National Institute of Mental Health, Molecular Neurogenetics Unit, Clinical Neuroscience Branch, Building 10 3D16, NIH, Bethesda, MD 20892, USA

Abbreviations: CTX, charybdotoxin; CM-cellulose, carboxymethylcellulose;  $K^+(Ca^{2+})$  channels,  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels; NTX, noxiustoxin

K<sup>+</sup>(Ca<sup>2+</sup>) channels was known, we have decided to verify the structure of CTX and compare the effect of both peptides in skeletal muscle preparation by means of single-channel recording techniques, which is the subject of this communication.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Materials

Only analytical grade reagents were used throughout the purification and characterization procedures; sources have been previously indicated [16].

Venom from the scorpion *C. noxius* was obtained by electrical stimulation of anesthetized animals [16], while venom from *L. q. quinquestriatus* was purchased from Sigma (St. Louis, MO).

### 2.2. Purification of toxins

NTX was purified as in [17]. CTX was purified by a three-step procedure. The soluble venom (100 mg) from *L. q. quinquestriatus* was gel filtered on a Sephadex G-50 column (1.8 × 200 cm), equilibrated in 20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.7. The blocking activity of CTX-containing fractions was followed by monitoring their effect on channels incorporated into bilayers, as described below. Fraction III eluting from the Sephadex column displayed CTX activity and was further separated in a CM-cellulose column (0.9 × 30 cm) equilibrated in 20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.7, and eluted with a salt gradient (from 0 to 0.5 M NaCl in the same buffer). Fraction 13 contained CTX activity and was finally purified by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a reverse-phase column similarly to the work of Smith et al. [11]. Homogeneity of samples was confirmed by polyacrylamide gel electrophoresis in two different systems [18,19]. The first system contained acetate-urea buffers. The second contained SDS and the sample was reduced by boiling in the presence of 5% β-mercaptoethanol, and applied to the gel for determination of the molecular mass. A small aliquot of CTX (50 μg) was isotopically labeled with <sup>125</sup>I by the lactoperoxidase method of Morrison and Bayse [20] and also run in parallel to verify that the protein-staining band in the gel corresponded to the radiolabeled CTX.

### 2.3. Chemical characterization of CTX

A sample of CTX was hydrolyzed in 6 N HCl [16] and the composition was determined in a Beckman 6300 amino acid analyzer. Another aliquot of CTX (50 μg) was reduced and pyridylethylated as in [12]. Part of this material was directly loaded in the spinning cup of a Beckman 890M microsequencer for automatic Edman degradation [21]; another aliquot of the reduced and alkylated toxin was cleaved with CNBr [16], and separated by HPLC for further sequence analysis.

### 2.4. Preparation of transverse tubule-enriched membranes, and planar bilayer methods

Membranes derived from the transverse tubule of skeletal muscle were prepared by a slight modification of the procedure of Meissner [22]. Membrane fractions from the 10/20 and 20/25% sucrose interfaces routinely show high PN 200-110-binding activity and were therefore used for incorporation of transverse tubule ion channels into the planar bilayers of a Mueller-Rudin type of chamber. Single-channel currents were measured via a List EPC-7 patch clamp electrometer (List Electronic, Darmstadt) and filtered through an 8-pole Bessel low-pass filter. Analog signals from the patch clamp were digitized and stored on 10 Mbyte hard disks for later analysis with software run on an IBM-AT computer.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

Gel electrophoresis analysis of CTX purified by our procedure shows that it migrates as a single component of apparent molecular mass 4.8 kDa (see fig.1). The electrophoretic mobility of CTX is between that of γ-toxin (7 kDa) and NTX (4.2 kDa), which were used as molecular mass markers. Furthermore, <sup>125</sup>I-CTX migrates as a single component and corresponds to the protein band stained with Coomassie blue in the gel. The final recovery of CTX obtained by this procedure is of the order of 0.5%, assuming a molar extinction coefficient of 17000 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>, as suggested [11]. The amino acid composition of CTX reported by Smith et al. [11] is close to the values we have found, except for their assumption of a molecular mass of 9.2 kDa, twice of what we have



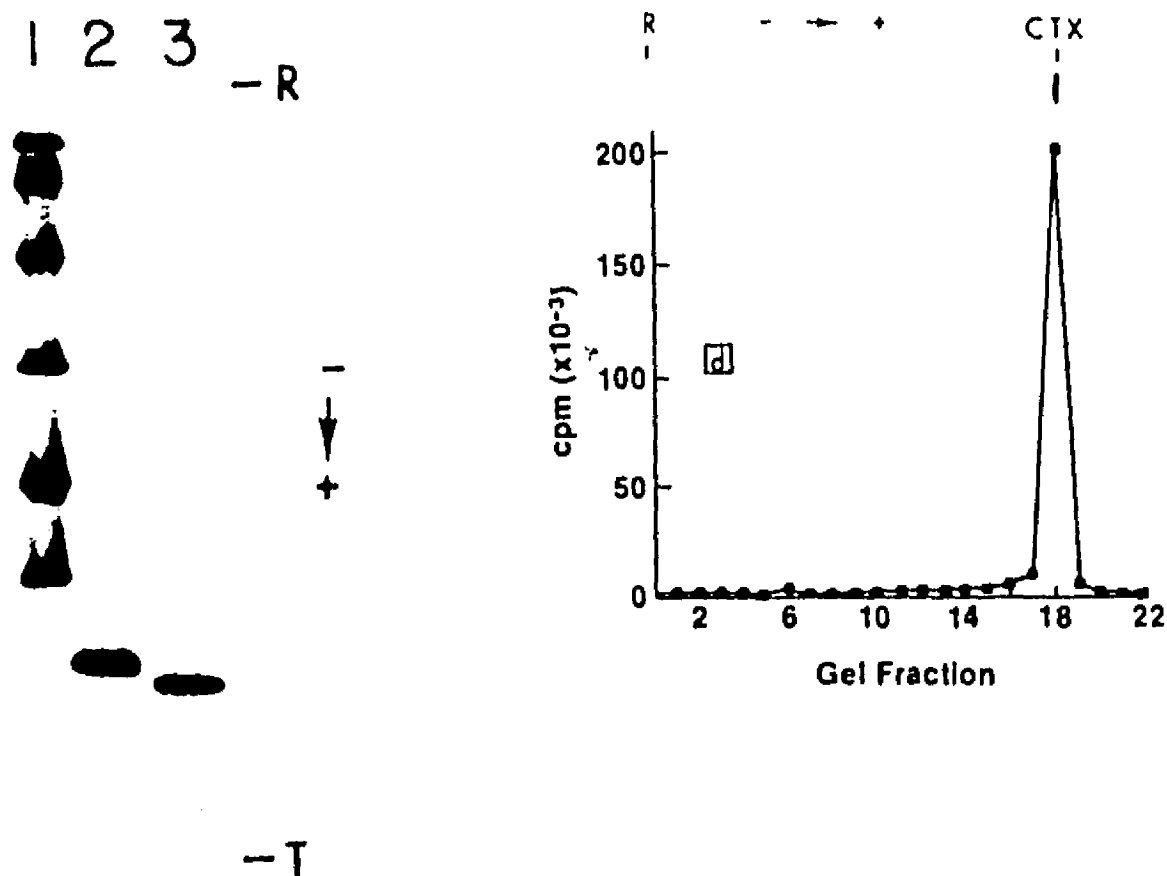


Fig. 1. SDS gel electrophoresis of native and iodinated CTX. The gel was sliced into 0.5-cm portions and  $^{125}\text{I}$ -CTX was counted in a gamma-counter. The peak of radioactivity co-migrates with the protein band on the gel (see slab-gel strip horizontally placed). A mixture of molecular mass markers was applied in the same gel, in parallel, in order to determine the apparent molecular mass of CTX. A linear plot (log molecular mass vs  $R_f$  of markers) showed the molecular mass of CTX to be 4.8 kDa. The following markers (in kDa) were used: phosphorylase *b* (92.5), bovine serum albumin (62.5), ovalbumin (45), carbonic anhydrase (31), soybean trypsin inhibitor (21.5), lysozyme (14) (see lane 1). Lane 2 contains 4  $\mu\text{g}$   $\gamma$ -toxin from *T. serrulatus* (7 kDa); and lane 3 is CTX (2  $\mu\text{g}$ ).

found. For example, they have reported 6 Arg, 2 His, 2 Tyr and 2 Phe; we have found exactly half of these values. However, we do agree on the values of Ile (0) and Met (1). Values for the composition of the amino acid Met are usually underestimated because of partial oxidation. It is worth mentioning that cysteines were measured as cysteic acid, after oxidation with performic acid [11], and we do obtain the same number of residues (6) per molecule of CTX. Except for the discrepancy in molecular mass we conclude that we are studying the same CTX molecule, because both are basic peptides, are extracted from the same source of scorpion venom, have very similar affinity ( $K_d$ ) for the same type of channels measured via

the same method and display the same kinetic behavior towards the  $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$  channels.

For the first time it has been shown that NTX affects the  $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$  channels of skeletal muscle (see fig. 2), suggesting the possible existence of a related family of toxic peptides in scorpion venom, which affect these channels, and that an important stretch of the CTX primary structure is homologous with NTX. We were unable to obtain direct sequencing data with the intact CTX molecule, probably because the N-terminal amino acid is blocked. For this reason we have treated CTX with CNBr. Two peptides were generated, one corresponding to the blocked N-terminal peptide and another with the following sequence: Met-

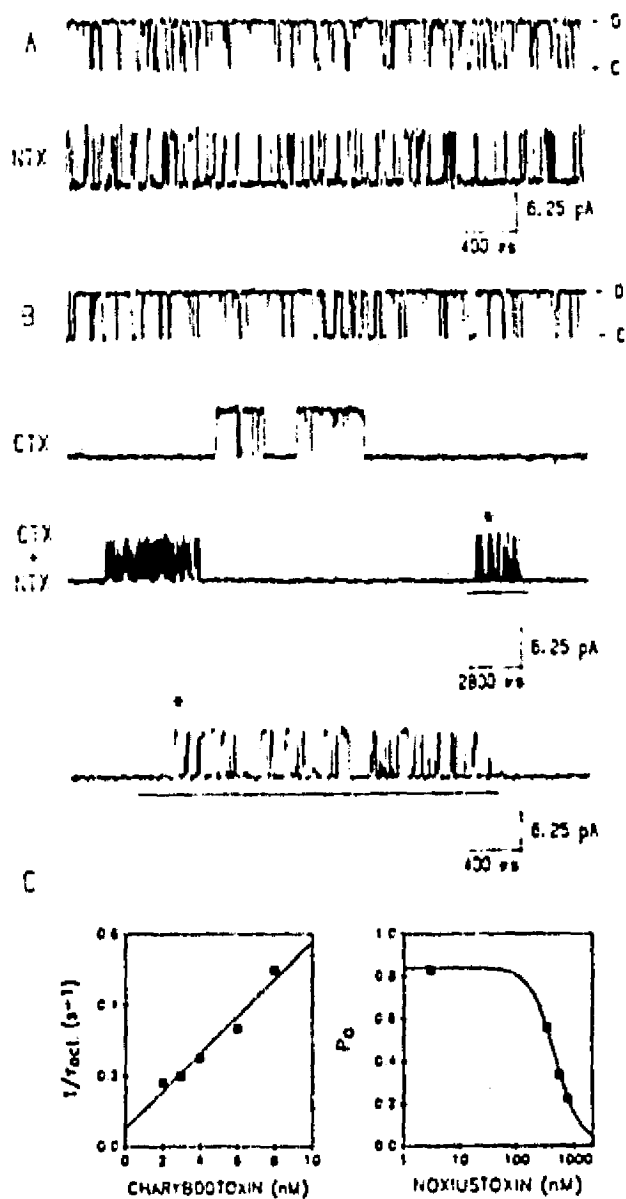


Fig.2. Effect of toxins on single-channel currents of  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels from skeletal muscle T-tubules. (A) Single  $K^+(Ca^{2+})$  channels were recorded in 250 mM KCl (internal side), 50 mM KCl, 200 mM NaCl (external side). Upper trace, control activity at 0 mV, 500 Hz filter, 2 kHz sampling. Open probability ( $P_o$ ) was 0.85. Second trace shows the effect of 800 nM NTX added *trans*.  $P_o$  was reduced to 0.44. (B) Blockade produced by CTX and NTX. Upper trace, control ( $P_o = 0.50$ ). Second trace was recorded with 20 nM CTX added to the external side of the channel (*trans*).  $P_o$  from entire file (10 min recording time) was 0.12. Third trace shows the effect produced by 20 nM CTX plus 2 μM NTX *trans*. Lowermost recording is an expansion of the right-hand burst of activity shown in the third trace. Recordings were taken at 0 mV, 500 Hz filter and 2 kHz sampling. (C) Dose-response curves for CTX and NTX blockade of  $K^+(Ca^{2+})$  channels. (Left) Reciprocal of the mean active time ( $\tau$ ) vs CTX concentration. The slope gives a second-order rate constant of block,  $k_{on} = 1/[CTX]_{1/2} = 0.053 \times 10^9 M^{-1} \cdot s^{-1}$ . The apparent  $K_d = k_{off}/k_{on} = 1.8$  nM. (Right) Plot of  $P_o$  (fraction open time) vs [NTX]. The apparent  $K_d$  is 450 nM.

Asn-Lys-Lys-Cys-Arg-Cys-Tyr-Ser-Ser. As shown in table 1 this sequence corresponds to the decapeptide at the C-terminal amino acid sequence of NTX with 60% identity and with perfect alignment of the cysteinyl residues. The blocking effects of both peptides on  $K^+(Ca^{2+})$  channels are shown in fig.2. NTX reduces open probability by driving the channel into a brief blocked state. The CTX trace shows the characteristic long-term blockade of  $K^+(Ca^{2+})$  channels produced by 20 nM CTX. Both toxins are only effective when added to the external face of the channel. Blocked states in-

Table 1

Comparison of the C-terminal amino acid sequence of noxiustoxin with that of a CNBr-cleaved peptide from charybdotoxin

Scorpion toxin	Amino acid sequence
<i>C. noxius</i> noxiustoxin	1 30 35 Thr-Ile-Ile-.....Met-Asn-Gly-Lys-Cys-Lys-Cys-Tyr-Asn-Asn
<i>L. q. quinquestriatus</i> charybdotoxin	blocked (?). ....Met-Asn-Lys-Lys-Cys-Arg-Cys-Tyr-Ser-Ser

duced by CTX were typically 10–15 s in duration at room temperature. 2  $\mu$ M NTX added in the presence of CTX had an additional inhibitory effect. In the presence of both toxins channels displayed blocked states of long and short duration characteristic of those produced by each toxin added separately (trace CTX + NTX). When bursts of activity in the presence of both toxins were examined on an expanded time scale, the open and closed events appeared kinetically similar to those seen in the presence of NTX alone (cf. final and NTX traces). Thus, apparently, both CTX and NTX can interact simultaneously with the same ion channel. At this point, however, it is not clear whether the toxin-binding sites are the same for CTX and NTX. The difference in mean duration of toxin-induced blocked states ( $\tau = 10$  s for CTX and  $\tau = 50$  ms for NTX) is most easily explained by the different apparent affinities of the two toxins for inhibitory sites on the channel. The  $K_d$  values obtained in a series of experiments conducted with different concentrations of both toxins indicated that CTX has a  $K_d$  of 1–3 nM, while for NTX it is 450 nM (see fig.2C). Similar differences in affinity were found when comparing the  $K_d$  of NTX for the delayed rectifier of squid axon (of the order of 290 nM [13]) with the  $ED_{50}$  (approx. 2 nM) in the release of  $\gamma$ -aminobutyric acid from brain synaptosomes [15]. Although the specificity of NTX seems to be rather broad concerning the type of  $K^+$  channels affected, it seems to be related exclusively to  $K^+$  channels [13–15]. It does not modify  $Na^+$  or  $Ca^{2+}$  currents [13–15]. Our results support the idea that CTX and NTX are candidates for use as tools for  $K^+$  channel isolation.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to express their gratitude to Miss Angelina Ramirez, Georgina Gurrola, Maria del Rocío Sánchez, Mr Fernando Zamudio and Fredy Coronas for helping to extract the venom from *C. noxius*. This work was supported in part by grant nos. NIH R01-GM36852 and P01-HL37044, an Established Investigatorship from the American Heart Association to R.C. and a fellowship of the Muscular Dystrophy Association of America to J.S.S.

#### REFERENCES

- [1] Barchi, R.L., Cohen, S.A. and Murphy, L.E. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1306–1310.
- [2] Harishorne, R.P. and Catterall, W.A. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 4620–4624.
- [3] Tamkun, M.M. and Catterall, W.A. (1981) J. Biol. Chem. 256, 11457–11463.
- [4] Agnew, W.S. (1984) Annu. Rev. Physiol. 46, 517–530.
- [5] Montal, M., Anholt, R. and Labarca, P. (1986) in:  $\gamma$  Ion Channel Reconstitution (Miller, C. ed.) pp.157–204, Plenum, New York.
- [6] Olivera, B.M., Gray, W.R., Zeikus, R., McIntosh, J.M., Varga, J., Rivier, J., De Santos, V. and Cruz, L. (1985) Science 230, 1338–1343.
- [7] Blaustein, M.P. and Ickowicz, R.K. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3855–3859.
- [8] Seagar, M.J., Lable'Julie', C., Granier, C., Goll, A., Glossmann, H., Van Riestschoten, J. and Couraud, F. (1986) Biochemistry 25, 4051–4057.
- [9] Hille, B. (1984) in: Ionic Channels of Excitable Membranes (Hille, B. ed.) pp.99–116, Sinauer, Sunderland, MA.
- [10] Miller, C., Moczydlowski, E., Latorre, R. and Phillips, M. (1985) Nature 313, 316–318.
- [11] Smith, C., Phillips, M. and Miller, C. (1986) J. Biol. Chem. 261, 14607–14613.
- [12] Possani, L.D., Martin, B.M. and Svendsen, I. (1982) Carlsberg Res. Commun. 47, 285–289.
- [13] Carbone, E., Wanke, E., Prestipino, G., Possani, L.D. and Maelicke, A. (1982) Nature 296, 90–91.
- [14] Carbone, E., Prestipino, G., Spadavecchia, L., Franciolini, F. and Possani, L.D. (1987) Pflügers Arch. (Eur. J. Physiol.) 408, 423–431.
- [15] Siges, M., Possani, L.D. and Bayon, A. (1986) J. Neurosci. 6, 1570–1574.
- [16] Possani, L.D., Martin, B.M., Svendsen, I., Rode, G.S. and Erickson, B.W. (1985) Biochem. J. 229, 739–750.
- [17] Possani, L.D. in: Handbook of Natural Toxins, vol.2, pp.513–550, Marcel Dekker, New York.
- [18] Reisfeld, R.A., Lewis, U.J. and Williams, D.E. (1962) Nature 195, 281–283.
- [19] Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680–685.
- [20] Morrison, M. and Bayse, G.S. (1970) Biochemistry 9, 2995–3000.
- [21] Edman, P. and Begg, G. (1967) Eur. J. Biochem. 1, 80–91.
- [22] Meissner, G. (1984) J. Biol. Chem. 259, 2365–2374.

ANEXO - 2

"PURIFICATION AND RECONSTITUTION OF POTASSIUM CHANNEL PROTEINS FROM SQUID AXON MEMBRANES", por Prestipino, G., Valdivia, H.H., Liévano, A., Darszon, A. A.N. Ramírez y Possani, L.D.

FEBS LETTERS 250: 570-574 (1989)

## Purification and reconstitution of potassium channel proteins from squid axon membranes

G. Prestipino, H.H. Valdivia\*, A. Liévano<sup>†</sup>, A. Darszon<sup>‡</sup>, A.N. Ramírez<sup>§</sup> and L.D. Possani<sup>¶</sup>

*Istituto di Cibernetica e Biofisica, CNR I-16146 Genova, Italy. \*Department of Physiology and Molecular Biophysics, Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030, USA. †Department of Biochemistry, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, 07000 D.F. Mexico and ‡Department of Biochemistry, Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, UNAM, 62270 Cuernavaca, Mor., México*

Received 1 May 1989

Voltage-dependent K<sup>+</sup> channels are responsible for repolarization of the cell membrane during the late phase of the action potential. Here we report the purification of proteins from squid axon membranes which bind the K<sup>+</sup>-channel blocker noxiustoxin (NTX), and their subsequent functional reconstitution in planar bilayers. The NTX-affinity purified proteins had M<sub>r</sub> values of 60000 ± 6000, 160000 ± 15000 and 220000 ± 20000. Their incorporation into bilayers resulted in single-channel currents with three conductances, the most frequent one of 11 pS in 300, 100 mM KCl (*cis trans*). The voltage dependence, reversal potential and bursting behavior suggest that these are the K<sup>+</sup> channels involved in the squid axon action potential.

Ion channel reconstitution; Squid axon; Delayed rectifier; Planar bilayer

### 1. INTRODUCTION

The squid axon delayed rectifier responsible for the repolarization of the cell membrane during the late phase of the action potential was the first K<sup>+</sup> channel described [1,2]. However, its purification, as well as the purification of other types of K<sup>+</sup> channels, which are the most diversified [18], has not been achieved due to the lack of high affinity compounds. Previously, it was shown that noxiustoxin (NTX), a 4.3 kDa peptide toxin obtained from the venom of the Mexican scorpion *Centruroides noxius*, is a potent blocker of the delayed rectifier in the squid axon [4]. In the present work NTX was used to purify NTX-binding proteins from a detergent extract of squid axon membranes. The purified proteins were reconstituted in a functional form into planar lipid bilayers.

Correspondence address: G. Prestipino, Istituto di Cibernetica e Biofisica, CNR I-16146 Genova, Italy

### 2. MATERIALS AND METHODS

#### 2.1. Solubilization of membranes and affinity column

Batches of approximately 10 g of squid axons were routinely used to prepare the rich membrane fraction I, as described [6]. The membranes from fraction I were solubilized in a buffer containing the following composition: 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) in 10 mM HEPES-Na buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 0.02% phosphatidylcholine, plus the following protease inhibitors: phenylmethylsulfonyl fluoride (0.1 mM), iodoacetamide (1 mM), 1:10 phenanthroline (1 mM) and pepstatin A (1 μM). The preparation was incubated for 1 h at 4°C and spun down (60000 × g) for 20 min. The soluble material (3.2 mg in 6 ml) was incubated with 5 ml of NTX-affinity beads (capacity: 1 mg of NTX/5 ml resin) for 1 h at 25°C and loaded into the column. The column was washed with 30 ml of buffer A (same as solubilization buffer, but decreasing CHAPS concentration to 0.1%) and the bound protein was eluted with buffer A containing 1 mM 4-aminopyridine (4-AP). Approximately 30 μg of protein was recovered.

#### 2.2. Binding of [<sup>125</sup>I]NTX to crude axonal membranes

Membranes of squid axons obtained by centrifugation in 0.33 M sucrose, after disruption (Polytron) and homogenization (teflon pestle), display a B<sub>max</sub> of 0.81 pmol/mg protein when assayed with 60 nM iodinated NTX. Incubation was performed in 5 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, in artificial sea

water. Membranes were incubated 50 min at 25°C and free [<sup>125</sup>I]NTX separated by centrifugation.

### 2.3. Cross-linking of [<sup>125</sup>I]NTX to purified proteins

Protein eluted from the affinity column with 4-AP was dialyzed and incubated for 20 min with 300 nM [<sup>125</sup>I]NTX, either in the absence or the presence of 20 μM cold NTX. After incubation, the protein content of each tube was cross-linked by the addition of disuccinimidyl suberimidate (final concentration 1 mM) in dimethylsulfoxide. Samples were run in the SDS-PAGE system as described above, stained, dried and placed in the Kodak holder with appropriate films for autoradiography.

### 2.4. Planar lipid bilayers

Bilayers were made according to the Mueller-Rudin [13] technique using diphytanoylphosphatidylcholine (20 mg of lipid per ml of *n*-decane, Avanti). They were formed over a 250 μm diameter aperture in a 50 μm thick plastic septum that separated two 400 μl teflon chambers. The hole was pretreated with the same lipid solution used for bilayer formation and allowed to dry under a N<sub>2</sub> stream. A patch-clamp amplifier (Biologic RK-300) was used to record the current and to control the voltage across the bilayer. Ag/AgCl electrodes in series with 1 M KCl agar bridges were used. The voltage was applied to the *cis* side of the bilayer and the *trans* side was held at virtual ground. In all the records, channel opening is shown as an upward deflection if the applied potential is positive. The membrane currents were recorded on a modified digital audio processor connected to a VCR [17], and the data analyzed off line. Ion channel reconstitution was performed using the fusion strategy [14], as follows: either liposomes containing the purified receptor, or the purified soluble receptor (< 1 μg/ml), were added to the *cis* side compartment. Liposomes were formed by dialysing the purified protein at 4°C for 3 days against 50 mM KCl, Hepes-K 10 mM, pH 7.4. Thereafter, they were sonicated for 2 min in the presence of 0.6 M sucrose. Experiments were performed at 20 ± 2°C.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

Axon membranes from the squid *Loligo vulgaris* were used in this study since NTX, a toxin purified from the Mexican scorpion *Centruroides noxius*, selectively affects their delayed rectifier [4,5]. After isolating axonal membranes as described in section 2, they were solubilized in a buffer containing 2% CHAPS. The solubilized material was incubated with NTX-Affigel P-10 beads and the protein bound to the NTX-Affigel P-10 (~30 μg) was eluted from the column with 1 mM of 4-AP and 0.1% of CHAPS. Assuming that all the recovered protein corresponds to channel proteins, the maximum purification in this step would be 100-fold (see fig.1). This purification procedure was repeated three times with comparable results.

Gel electrophoresis of purified NTX-receptor

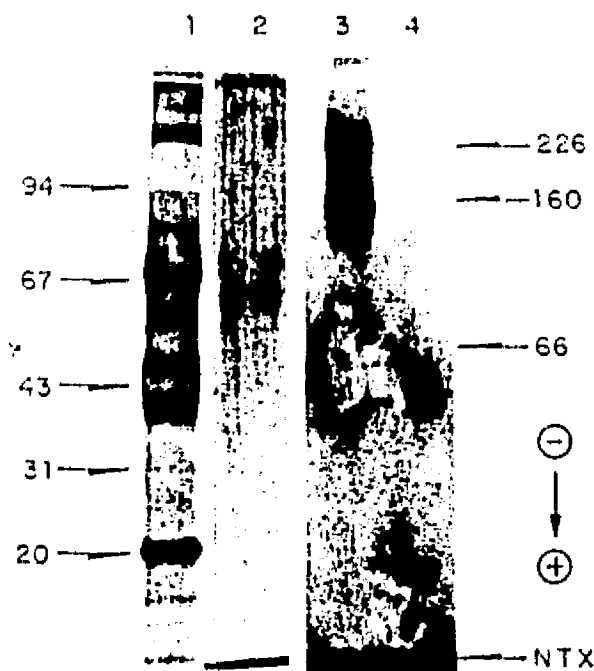


Fig.1. Electrophoresis of purified NTX-binding proteins. Lanes 1 and 2 are silver stained SDS/polyacrylamide (10%) gel electrophoresis (PAGE) [7]. Lane 1 shows molecular weight markers (10 μg each; in kDa): phosphorylase b (94); bovine serum albumin (67); ovalbumin (43); carbonic anhydrase (31); trypsin inhibitor (20). Lane 2 shows the proteins (2 μg) eluted with 4-AP from the NTX-affinity column. Lanes 3 and 4 are autoradiographic pictures of the proteins (0.5 μg) eluted from the affinity column and cross-linked with [<sup>125</sup>I]NTX run on a 4–12% gradient SDS-PAGE, thus their electrophoretic mobility is different from lanes 1 and 2. Lane 4 is the same as 3 but with a 75-fold excess cold-NTX added prior to cross-linkage. A parallel lane (not shown) was used to run molecular weight markers (200 kDa myosin, 116 kDa beta-galactosidase, and others similar to lane 1). Arrows on the right indicate approximate *M<sub>r</sub>* of radiolabeled proteins.

showed mainly four peptides (lane 2, fig.1). Two strong bands with apparent *M<sub>r</sub>* values of  $53 \pm 3$  and  $60 \pm 6$ , and two additional faint bands corresponding to higher *M<sub>r</sub>* forms. The protein pattern obtained with the purified preparation is in good agreement with data obtained by cross-linking the purified material with [<sup>125</sup>I]NTX (lane 3, fig.1). The NTX binding sites are found in proteins with *M<sub>r</sub>* of  $66 \pm 6$  (broad doublet),  $160 \pm 15$  and  $220 \pm 20$ . The 66 kDa band protein is within the same range as that proposed for the K<sup>+</sup> channel of the *Shaker* locus of *Drosophila* [8] and those of the mouse and rat brain K<sup>+</sup> channels [9–11]. As shown in lane 4, fig.1, the lower molecular mass

peptide (53 kDa) binds NTX non-specifically. The presence of four bands before and after NTX cross-linking, clearly shows that the 160 and 220 kDa polypeptides are not a polymerization artifact of the 66 kDa polypeptide; however, their  $M_r$  values (in lane 3) are overestimated due to the covalent attachment of NTX molecule(s). These results show the presence of three distinct peptides in squid axon membranes, which might correspond to three different types of NTX-sensitive  $K^+$  channels. In fact, single-channel currents from patch-clamp of the inside surface of cut-open squid axons, revealed three distinct types of  $K^+$ -channel activity [12].

The protein recovered from the affinity column with 4-AP was extensively dialyzed against buffer and used for reconstitution experiments. Fusion with planar lipid bilayers, of either purified soluble receptor or liposomes containing purified receptor gave similar results, indicating that ion channels are present in the purified fractions. Fig.2a shows

a long time record of single-channel current fluctuations across a planar membrane following addition of purified receptor protein ( $<1 \mu\text{l ml}^{-1}$ ) to the *cis* side. In the presence of a 5-fold KCl concentration gradient, at an applied membrane voltage of 100 mV, the channels display a bursting behavior: grouping in time of opening events separated by relatively long segments of inactivity [2,15]. The mean current of the predominant channel was 1.5 pA (fig.2b), corresponding to a chord conductance of 11 pS (at 100 mV). This value is similar to that of 9–11 pS reported for  $K^+$  channels of squid axon by Conti and Neher [2] and for the smaller  $K^+$  channel reported by Llano et al. [12] in cut-open squid axon. A single-channel conductance of 15 pS was also reported for the delayed rectifier  $K^+$  channels from skeletal muscle [16]. The single-channel conductances have been expressed as chord conductances,  $\gamma = i/(E_m - E_k)$ , where  $E_m$  is the voltage applied to the membrane and  $E_k$  is the  $K^+$  reversal potential, because the

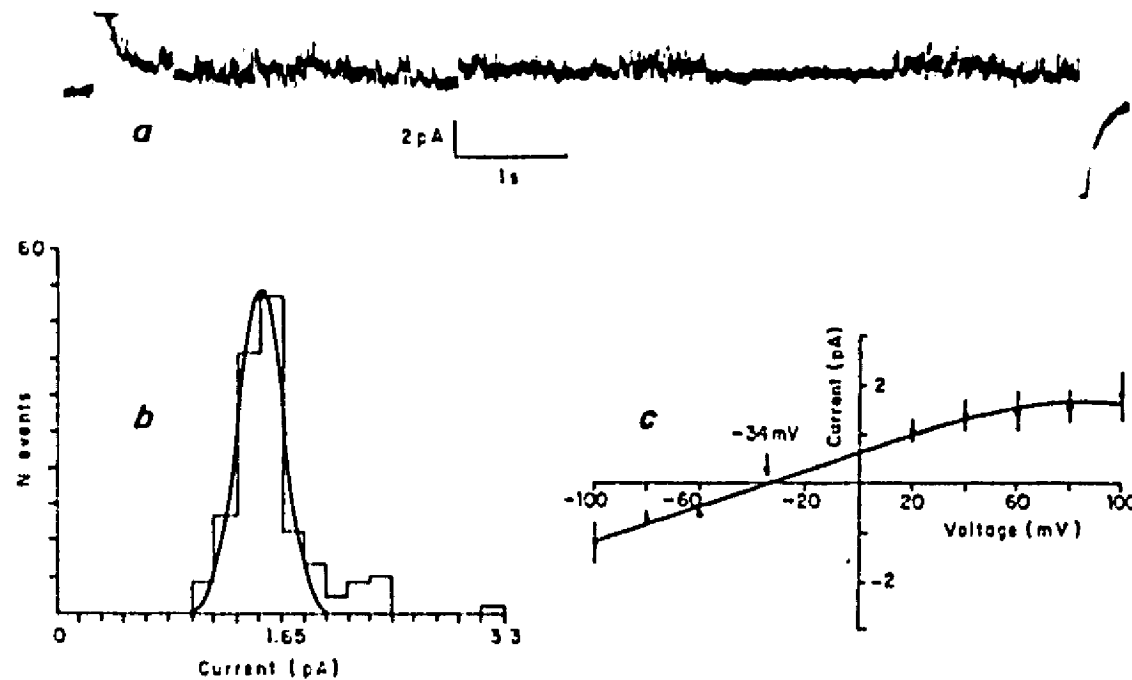


Fig. 2. Reconstitution of the purified NTX-binding protein channels into lipid bilayers. (a) Occurrence of single-channel bursts recorded with a membrane potential held at 100 mV in asymmetric solutions. The record was filtered at 100 Hz with an eight-pole Bessel filter and displayed on a Gould chart recorder. The first and last parts of the record show the capacitive transients corresponding to the application and removal of  $E_m$ . The solutions bathing the bilayers were asymmetric and contained 0.5 M KCl, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM Hepes at pH 8.0 in *cis* side, and the same but 0.1 M KCl in *trans*. (b) Amplitude histogram based on single-channel current transitions. The number of analyzed events was 152. The mean amplitude was  $1.5 \pm 0.2$  pA at a membrane potential of 100 mV in asymmetric KCl solutions. (c) Open-channel current-voltage relationship. The mean single-channel current at each point was obtained from five different bilayers. The arrow indicates the zero-current voltage. The vertical lines indicate the standard deviation of each point.

single-channel current-voltage relation shows rectification at high positive voltages (fig.2c). This figure also illustrates the selectivity of the single channels. In these experiments we measured the current passing through a single channel in the presence of 5-fold KCl concentration gradient. The reversal potential for the single channel was  $-34$  mV, in agreement with that predicted by the Nernst equation for a cationic selective channel.

Fig.3a shows recordings of single-channel current at different membrane potentials of the more frequently observed unitary current. For large positive voltages, the open probability is higher than for negative ones. In a few records we have encountered two other types of channels (fig.3b).

These channels opened infrequently and their single-channel conductances were around 22 and 32 pS (at 100 mV). We have not studied these channels in detail; however, it is possible that they also contribute to the total macroscopic  $K^+$  current elicited by a depolarizing pulse in the squid giant axon membrane. The voltage-dependence of the channel can be seen in the current versus time histograms (fig.3c). The time that the channels spent in the closed current level was less at more positive potentials. In the 100 mV histogram the main current peak (1.5 pA) and two larger ones are evident ( $c$  = closed channel current). At 100 mV the open time constants were 0.4 and 2.3 ms (606 events) and the closed ones 17.6 and 89 ms (667

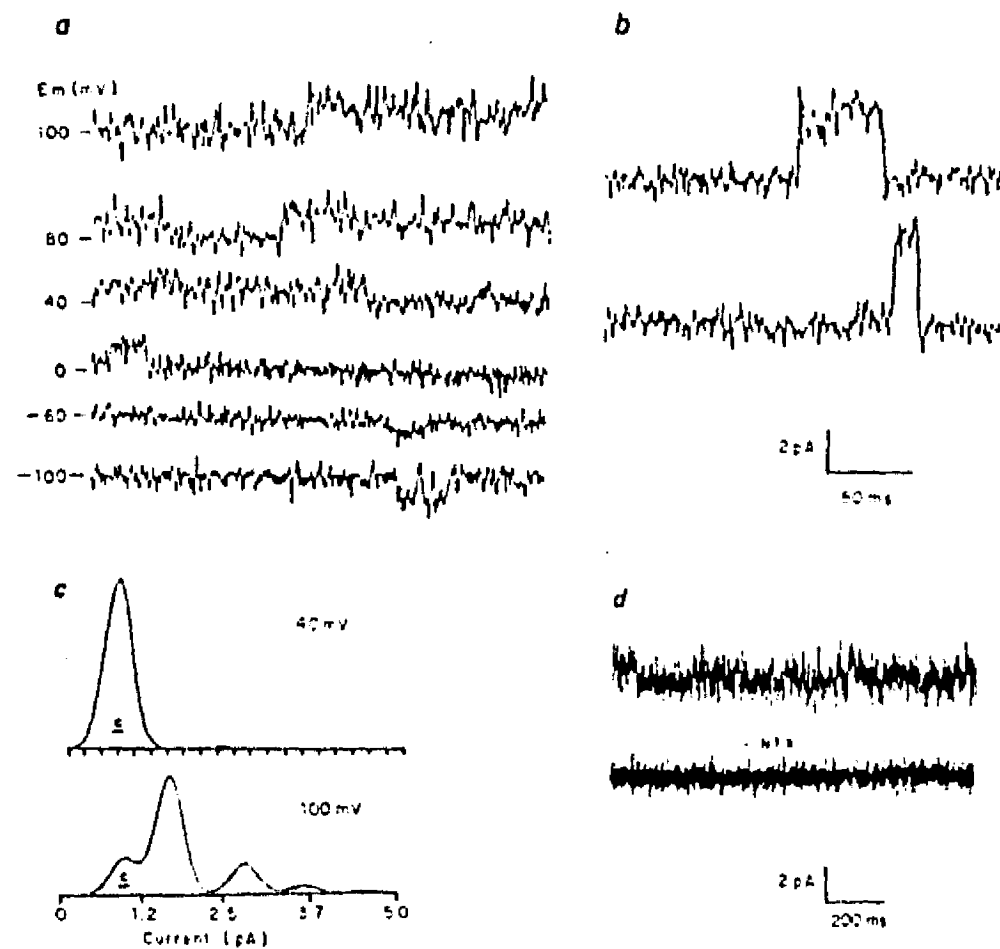


Fig.3. Properties of the main channel. (a) Representative single-channel records at the indicated voltages ( $E_m$ ), of the predominant channel filtered at 300 Hz, digitized at 2 kHz sampling interval and plotted by computer. (b) Current records of the two less frequent  $K^+$ -channels incorporated into bilayers. (c) Current level histograms from a bilayer. Records were filtered at 100 Hz and each histogram was constructed with 28 s of records at the indicated potentials. Each peak represents the percent of time that the current spent in each level.  $c$  indicates the basal bilayer current (closed state of the channel). (d) NTX block of the channel. Addition of  $2 \mu M$  NTX to the *cis* compartment blocked the current fluctuations. Upper record is the control before NTX addition. Membrane potential: 100 mV.



events). The biexponential fit of the open and closed dwell histograms agrees with the complex bursting kinetics seen in fig.2a. Preliminary results indicate that the K<sup>+</sup>-channel activity is blocked by NTX (fig.3d) and tetraethylammonium (TEA<sup>+</sup>). However, in some cases, after seeing blockage, we have observed increases in the current which could be due to further channel incorporation since the NTX receptor protein loaded liposomes are very fusogenic.

The results demonstrate that the purified NTX binding protein displays single-channel activity when incorporated into planar lipid bilayers. A main 11 pS conductance and two larger ones were observed. The reversal potential, the voltage dependence and the preliminary results with NTX and TEA<sup>+</sup> suggest that the purified fraction contains the delayed K<sup>+</sup> channel from the squid giant axon. To our knowledge, this is the first report in the literature showing both reconstitution and activity of a K<sup>+</sup> ion channel isolated by affinity column from a solubilized membrane preparation, and the used strategy could be useful for the purification of K<sup>+</sup> channels from other membrane preparations.

*Acknowledgements:* This study was supported by grants from CONACYT and The World Health Organization.

## REFERENCES

- [1] Hodgkin, A.L. and Huxley, A.F. (1952) *J. Physiol. (London)* 116, 497-506.
- [2] Conti, F. and Neher, E. (1980) *Nature* 285, 140-143.
- [3] Possani, L.D., Martin, B.M. and Svendsen, I. (1982) *Carlsberg Res. Commun.* 47, 285-289.
- [4] Carbone, E., Wanke, E., Prestipino, G., Possani, L.D. and Maelicke, A. (1982) *Nature* 296, 90-91.
- [5] Carbone, E., Prestipino, G., Spadavecchia, L., Franciolini, F. and Possani, L.D. (1987) *Pflügers Arch.* 408, 423-431.
- [6] Camejo, G., Villegas, G.M., Barnola, F.V. and Villegas, R. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 193, 247-259.
- [7] Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680-685.
- [8] Tempel, B.L., Pepasian, D.F., Schwarz, T.L., Jan, Y.N. and Jan, L.H. (1987) *Science* 237, 770-775.
- [9] Tempel, B.L., Jan, Y.N. and Jan, L.Y. (1988) *Nature* 332, 837-839.
- [10] Mehraban, F., Breeze, A.L. and Dolly, J.O. (1984) *FEDS Lett.* 174, 116-122.
- [11] Rehm, H. and Lazdunski, M. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4919-4923.
- [12] Llano, I., Webb, C.K. and Bezanilla, F.J. (1988) *J. Gen. Physiol.* 92, 179-196.
- [13] Mueller, P., Rudin, D.O., Tien, H.T. and Wescott, W.C. (1963) *J. Physiol. Chem.* 67, 534-535.
- [14] Miller, C. and Racker, E. (1976) *J. Memb. Biol.* 30, 283-300.
- [15] Coronado, R., Latorre, R. and Mautner, H.G. (1984) *Biophys. J.* 45, 289-299.
- [16] Stenden, N.B., Stanfield, P.R. and Ward, T.A. (1985) *J. Physiol.* 364, 339-358.
- [17] Bezanilla, F. (1985) *Biophys. J.* 47, 437-441.
- [18] Rudy, B. (1988) *Neuroscience* 25, 729-749.

**ANEXO - 3**

**PUBLICACIONES: HECTOR HORACIO VALDIVIA FLORES**

PUBLICACIONES

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Valdivia, Hector H., Jeffrey S. Smith, Brian M. Martin, Roberto Coronado and Lourival D. Possani (1988). Charybdotoxin and Noxiustoxin, two homologous peptide inhibitors of the K (Ca) channel. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Letters*: 226:280-284.

Valdivia, Hector H., William P. Dubinsky and Roberto Coronado (1988). Reconstitution and Phosphorylation of Chloride Channels from Airway Epithelium. *Science (Wash.)* 242:1441-1444.

Valdivia, Hector H. and Roberto Coronado (1988). Dihydropyridine Pharmacology of the Reconstituted Calcium Channel of Skeletal Muscle. In "The Calcium Channel: Structure, Function and Implications". (M. Morad and W.G. Nayler, Eds.) Springer-Verlag, Berlin.

Valdivia, Hector H. and Roberto Coronado (1989). Inhibition of Dihydropyridine-sensitive Calcium Channels by the Plant Alkaloid Ryanodine. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Letters* 244:333-337.

Prestipino, G., H. H. Valdivia, A. Liévano, A. Darszon, A. Ramírez and L. D. Possani (1989). Purification and Reconstitution of Potassium Channel Proteins from Squid Axon Membranes. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Letters* 250:570-574.

Valdivia, Hector H. and Roberto Coronado (1990). Internal and External Effects of Dihydropyridines in the Calcium Channel of Skeletal Muscle. *J. Gen. Physiol.* 95:1-27.

Valdivia, Carmen R., Hector H. Valdivia, Barry L. Potter and Roberto Coronado (1990). Calcium Release by 1,4,5-Triphosphorothioate in Triad Junctions of Skeletal Muscle. *Biophys. J.* 57:1233-1243.

Valdivia, Hector H., Carmen R. Valdivia, Jianjie Ma and Roberto Coronado (1990). Direct Binding of Verapamil to the Ryanodine Receptor of Skeletal Muscle. *Biophys. J.* 58:471-481.

Coronado, R., Kawano, S., Lee, C., Valdivia, C. and Valdivia, H. (1990). Planar Bilayer Recording of Ryanodine Receptors of Sarcoplasmic Reticulum. *Meth. Enzymol.* in press.

Valdivia, Hector H., William P. Dubinsky and Roberto Coronado (1990). Elementary Properties of a Phosphorylation-dependent Chloride Channel from Purified Airway Epithelium. *J. Gen. Physiol.* (submitted)

Ma, J., Valdivia, H. H., Campbell, K. P., and Coronado, R. (1990). Modifications Produced by Ryanodine and Ruthenium Red in the Purified Ryanodine Receptor. Implications for Channel Structure. *J. Gen. Physiol.* (submitted).

Valdivia, Hector H., Kirk Hogan and Roberto Coronado. (1990) An altered binding site for Ca<sup>++</sup> in the ryanodine receptor of human malignant hyperthermia. *Am. J. Physiol.* (submitted)

Valdivia, H. H., G. Gurrola, P. Herion, B. Martin, L. Escobar and L.D. Possani. Characterization of neuronal binding sites for Noxiustoxin, a K<sup>+</sup> channel blocker peptide from the scorpion *C. noxius*. *Arch. Biochem. Biophys.* (submitted)

McPherson, P. S., Y.K. Kim, H. H. Valdivia, C.M. Knudson, R. Coronado and K.C. Campbell. (1991) The brain ryanodine receptor: a caffeine sensitive calcium release channel. *Nature* (London). Submitted.

#### RESUMENES

William P. Schilling, Margaret Colden-Stanfield, Hector Valdivia, Lydia T. Navarro, Stephen J. Elliot, Lourival Possani, Suzanne Eskin and Diane L. Kunze. (1987) Activation and Inhibition of Ca-dependent K channels in cultured bovine aortic endothelial cells *Circulation (Suppl.)* 76:(Abstract N. 1524).

Hector Valdivia and Roberto Coronado (1988). Pharmacological profile of skeletal muscle calcium channels in planar lipid bilayers. *Biophys. J.* 53:555a.

L. Toro, H. Valdivia, R. Coronado, J. S. Smith and E. Stefani (1988) Single Channel Activity in Membrane Vesicles from Myometrial Cells incorporated into Lipid Bilayers. *Biophys. J.* 53:148a.

Hector Valdivia, Stanley Schultz, William Dubinsky and Roberto Coronado (1988). Planar Bilayer Recording and *in situ* Phosphorylation of Chloride Channels from Bovine Tracheal Epithelium. *Pediat. Pulmonol.* (Suppl. 2). 103:(Abs. 29).

Hector H. Valdivia and Roberto Coronado (1989). Verapamil, a T-tubule Calcium Channel Blocker, Inhibits Ryanodine Binding at the Triad Junction of Skeletal Muscle. *Biophys. J.* 55:207a.

Carmen Valdivia, Hector H. Valdivia, Jannen Vilven and Roberto Coronado (1989). Proton Gating of Calcium Release Channels in Vesicles Derived from Junctional Sarcoplasmic Reticulum. *Biophys. J.* 55:88a.

Hector H. Valdivia, William Dubinsky and Roberto Coronado (1989). Planar Bilayer Recording of Chloride Channels from Skeletal Muscle and Airway Epithelium Cells: Similarities and Differences. *Biophys. J.* 55:161a.

Hector H. Valdivia, William P. Dubinsky and Roberto Coronado (1989). Membrane Phospholipid Composition Modulates Conductance of Chloride Channels from Purified Airway Epithelia. *Pediat. Pulmunol.* (Suppl. 4) 113 (Abst. #11).

Hector H. Valdivia, Laura Escobar and Lourival D. Possani. The Binding Properties of Noxiustoxin, a K-Channel Blocking Peptide, to Mouse Brain Synaptosomes. In "*Ion Channels: Molecular Structure and Genetics*". 1989 Albany Conference. Albany, New York, 1989.

William P. Dubinsky, Hector H. Valdivia and Roberto Coronado (1989) Preparation of Enriched Plasma Membranes Fractions from Human Tracheal Epithelia and Reconstitution of Ion Channels. *Pediat. Pulmonol.* (Suppl. 4) 114 (Abst. #13).

Carmen Valdivia, Hector H. Valdivia, B.V.L. Potter and R. Coronado (1990)  $Ca^{2+}$  Release by  $IP_3$  in Triads of Rabbit Skeletal Muscle. *Biophys. J.* 57:345a.

Hector H. Valdivia, Carmen Valdivia and Roberto Coronado (1990). Direct Binding of Verapamil to the Ryanodine Receptor  $Ca^{2+}$  Release Channel of Sarcoplasmic Reticulum. *Biophys. J.* 57:345a.

Kirk Hogan, Hector H. Valdivia and Roberto Coronado. (1990). Ryanodine Receptors of Human, Rabbit, and Pig Skeletal Muscle: Differential Sensitivity to Ca and Halothane. VII International Congress on Neuromuscular Diseases, Munich, Germany.

Hector H. Valdivia, Kirk Hogan and Roberto Coronado (1990). Distinct Sensitivity to Caffeine in Malignant Hyperthermia Ca Release Channels from human and Pig Skeletal Muscle. VII International Congress in Neuromuscular Diseases, Munich, Germany.

McPherson, P.S., Y.K. Kim, H. Valdivia, R. Coronado and K. P. Campbell (1991). The brain ryanodine receptor: a caffeine sensitive calcium release channel. *Biophys. J.* (in press).

Kim, Y.K., H. H. Valdivia, E.B. Marion, P. Anderson, and R. Coronado. (1991). High molecular weight proteins in the nematode *C. elegans* display [ $^3H$ ]ryanodine binding activity and form a ~500 pS channel in planar lipid bilayers. *Biophys. J.* (in press)

Valdivia, H.H., O. Fuentes, J. Morrissette, R. El-Hayek, K. Hogan, and R. Coronado (1991). Ryanodine receptors of sarcoplasmic reticulum in pig and human malignant hyperthermia are highly sensitive to calcium and caffeine. *Biophys. J.* (in press).

Valdivia, H.H., and R. Coronado. (1991) Toxins of excitation-contraction coupling: *B. hottentota* scorpion venom enhances [ $^3H$ ]ryanodine binding and opens calcium release channels of sarcoplasmic reticulum. *Biophys. J.* (in press).

Valdivia, Hector H. (1991) Toxins of excitation-contraction coupling: *P. imperator* scorpion venom inhibits [ $^3H$ ]ryanodine binding and closes calcium release channels of sarcoplasmic reticulum. *Biophys. J.* (in press).