

Figura 14 - Efeito inibitório da toxina AbeTx1 nos diferentes subtipos de K_V . Os perfis representam a situação controle e quando aplicados 3 μM da toxina AbeTx1. O * representa o bloqueio ou não da corrente após a aplicação de 3 μM da toxina AbeTx1. A linha tracejada indica o nível basal de corrente (n= 6).

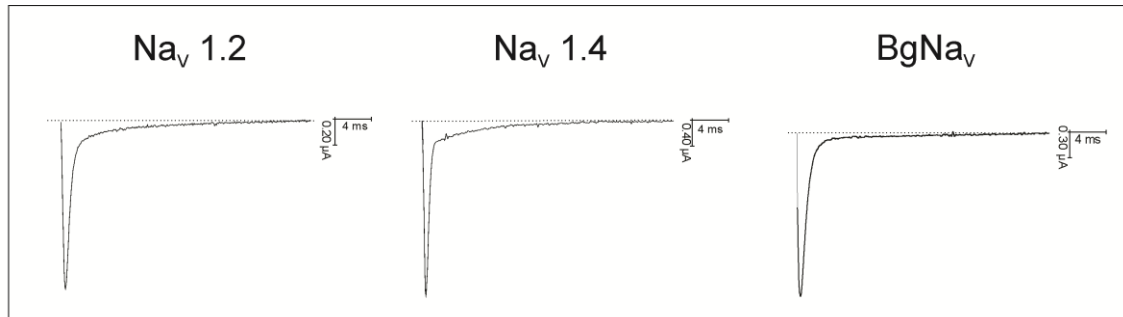


Figura 15 - Efeito inibitório da toxina AbeTx1 nos diferentes subtipos de Na_V . Os perfis representam a situação controle e quando aplicados 3 μM da toxina AbeTx1. O * representa o bloqueio ou não da corrente após a aplicação de 3 μM da toxina AbeTx1. A linha tracejada indica o nível basal de corrente (n= 3).

Como a AbeTx1 apresentou alta porcentagem de bloqueio da corrente dos íons K^+ nos subtipos de $K_V1.1$, $K_V1.2$ e $K_V1.6$, optou-se por utilizar estes subtipos para a realização dos seguintes experimentos eletrofisiológicos: ensaios de inibição da corrente em função da concentração da toxina (curvas de dose-resposta), relação entre voltagem e corrente em solução fisiológica (ND96) e com alta concentração de K^+ (HK-ND96). Experimentos de reversibilidade da ligação e interação competitiva utilizando-se a toxina TEA.

A concentração de AbeTx1 necessária para bloquear 50% da corrente dos íons K^+ do subtipo de $K_V1.1$ é de $671,95 \pm 150,31$ nM (Figura 16A). As curvas de corrente de ativação do canal em função da voltagem foram realizadas em uma situação controle e na presença da AbeTx1 (600 nM). A voltagem de ativação de 50% dos canais ($V_{1/2}$) na situação controle foi de $-1,94 \pm 1,34$ mV, enquanto que na presença da AbeTx1 $V_{1/2}$ foi igual a $17,88 \pm 1,26$ mV (Figura 16B). O bloqueio da corrente apresenta uma dependência de voltagem, sendo que este aumenta linearmente, conforme os valores de

voltagem tornam-se mais positivos (Figura 16C). Quando se aplica AbeTx1 (600 nM) em uma solução com alta concentração de K^+ , observa-se apenas 33% de bloqueio da corrente a -20mV, em vez dos 50% esperados (Figura 16D). A ligação da toxina ao K_V é reversível e a corrente é totalmente restaurada após a lavagem (Figura 16E). Os ensaios de interação competitiva demonstraram que quando aplicado TEA (200 μ M) é possível obter um bloqueio da corrente do $K_V1.1$ igual a $52,20 \pm 1,74\%$. Quando se aplica uma mistura de TEA (200 μ M) e AbeTx1 (600 nM), o bloqueio é de $71,20 \pm 2,18\%$ (Figura 16F). Para avaliar o estado de conformação estrutural em que a toxina AbeTx1 (3 μ M) se liga ao $K_V1.1$, esta foi aplicada (e homogeneizada) à solução ND96 quando a membrana do ovócito estava à -90 mV e, conseqüentemente, os canais encontravam-se no estado conformacional fechado. Após dois minutos de incubação mensurou-se a corrente, a qual apresentou um bloqueio de $82,00 \pm 2,65\%$ (Figura 17).

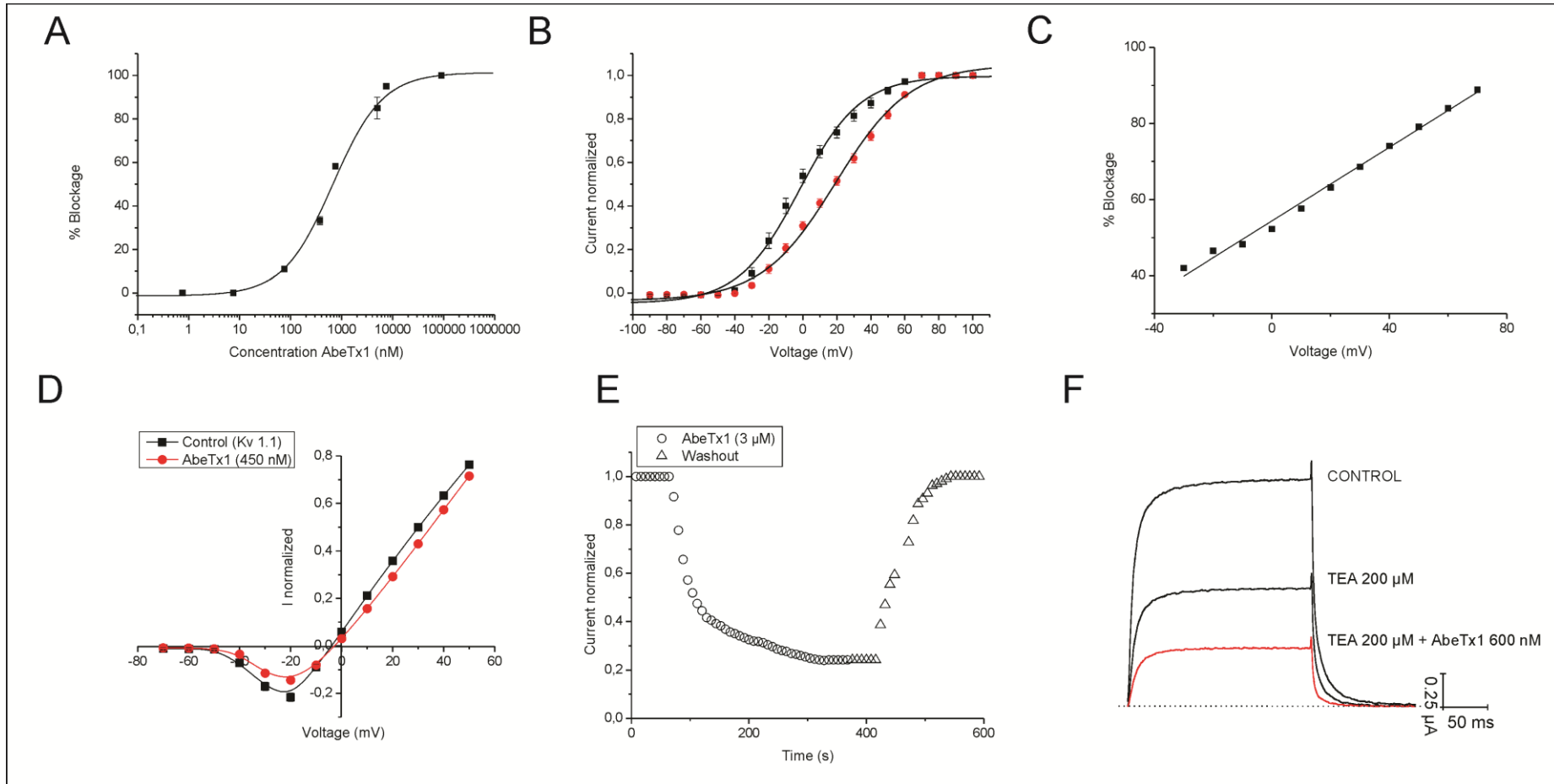


Figura 16 – Ensaio eletrofisiológicos em $K_V1.1$, utilizando-se a neurotoxina AbeTx1. **A** - Curva dose-resposta da toxina AbeTx1, valor de IC_{50} é de $671,95 \pm 150,31$ nM (n=6). **B** - Curva de corrente X voltagem na ausência e presença de AbeTx1 (600 nM). A curva com os pontos quadrados (pretos) é o controle e a curva com pontos circulares (vermelho) é na presença da toxina (n=6). **C** - Curva de dependência de voltagem do bloqueio da toxina AbeTx1 (600 nM) (n=6). **D** - Curva de corrente X voltagem na ausência e presença de AbeTx1 (450 nM) em solução ND96 com alta concentração de íons K^+ (HK-ND96). A curva com os pontos quadrados (pretos) é o controle e a curva com pontos circulares (vermelho) é na presença da toxina AbeTx1 (450 nM) (n= 5). **E** - Ensaio de reversibilidade da ligação da AbeTx1 (3 μ M). **F** - Ensaio de interação competitiva entre AbeTx1 (600 nM) e TEA (200 μ M) (n=5).

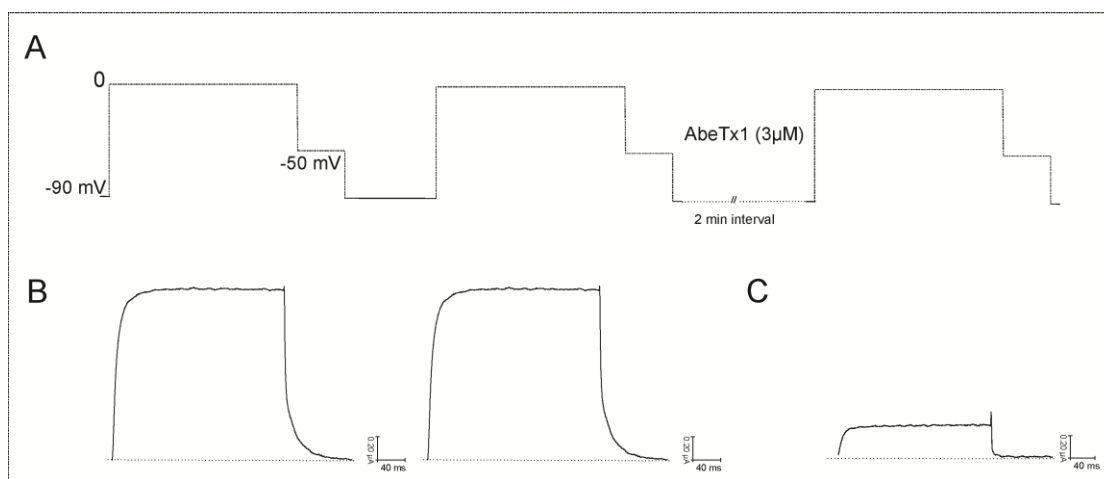


Figura 17 – Efeito inibitório da AbeTx1 na corrente dos íons K^+ em $K_V1.1$. **A** – Protocolo de ativação do $K_V1.1$. **B** – Curva controle de ativação do $K_V1.1$, antes da aplicação da toxina. **C** – Curva de ativação do $K_V1.1$, após a homogeneização da AbeTx1 na solução e o repouso de dois minutos. AbeTx1 bloqueou $82,00 \pm 2,65\%$ da corrente do $K_V1.1$ (n=4).

Os valores de IC_{50} para os subtipos $K_V1.2$ e $K_V1.6$ são de $167,36 \pm 38,58$ nM e $115,68 \pm 31,44$ nM, respectivamente (Figura 18A e Figura 19A). As curvas de corrente de ativação do canal em função da voltagem para o subtipo $K_V1.2$ na ausência da toxina tem um $V_{1/2}$ igual a $20,72 \pm 1,33$ mV e na presença de

AbeTx1 (160 nM) um $V_{1/2}$ igual a $22,82 \pm 1,55$ mV (Figura 18B). Para o subtipo de Kv1.6, na ausência de toxina $V_{1/2}$ é igual a $18,60 \pm 1,24$ mV e na presença desta $V_{1/2}$ é igual a $26,35 \pm 1,52$ mV (Figura 19B). O bloqueio da corrente dos subtipos de $K_V1.2$ e $K_V1.6$ apresentaram uma independência de voltagem (Figura 18C e Figura 19C). As curvas de corrente de ativação do canal em função da voltagem, em solução HK-ND96, resultaram em um bloqueio da corrente igual a 49% para o subtipo de $K_V1.2$ e de 55% para $K_V1.6$ (Figura 18D e Figura 19D). AbeTx1 se liga reversivelmente aos subtipos de $K_V1.2$ e $K_V1.6$ e a corrente é completamente restaurada após a lavagem (Figura 18E e Figura 19E). No subtipo de $K_V1.6$ foram realizados ensaios de interação competitiva, no qual aplicou-se primeiramente AbeTx1 (120 nM), obtendo-se $51,50 \pm 0,65\%$ de bloqueio da corrente e, posteriormente, uma solução contendo AbeTx1 (120 nM) e TEA (920 μ M), obtendo-se $55,33 \pm 2,47\%$ de bloqueio (Figura 19F)

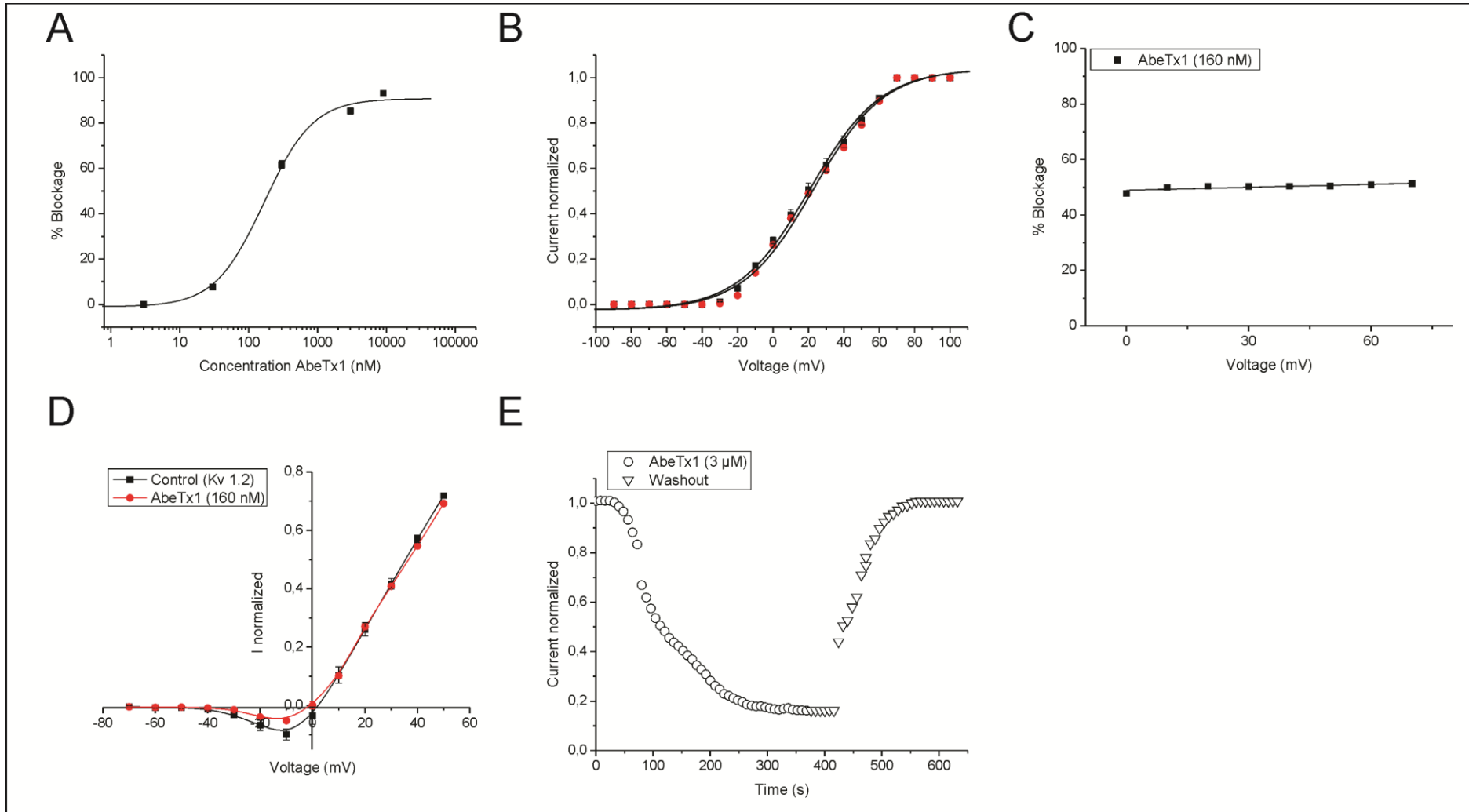


Figura 18 – Ensaio eletrofisiológicos em K_V 1.2, utilizando-se a neurotoxina AbeTx1. **A** - Curva dose-resposta da toxina AbeTx1, o valor de IC_{50} é de $167,36 \pm 38,58$ nM (n=6). **B** - Curva de corrente X voltagem na ausência e presença de AbeTx1 (160 nM). A curva com os pontos quadrados (pretos) é o controle e a curva com pontos circulares (vermelho) é na presença da toxina (n=3). **C** - Curva de dependência de voltagem do bloqueio da toxina AbeTx1 (160 nM) (n=3). **D** - Curva de corrente X voltagem na ausência e presença de AbeTx1 (160 nM), em solução com alta concentração de íons K^+ (HK-ND96). A curva com os pontos quadrados (pretos) é o controle e a curva com pontos circulares (vermelho) é na presença da toxina (n= 3). **E** - Ensaio de reversibilidade da ligação da AbeTx1 (3 μ M).

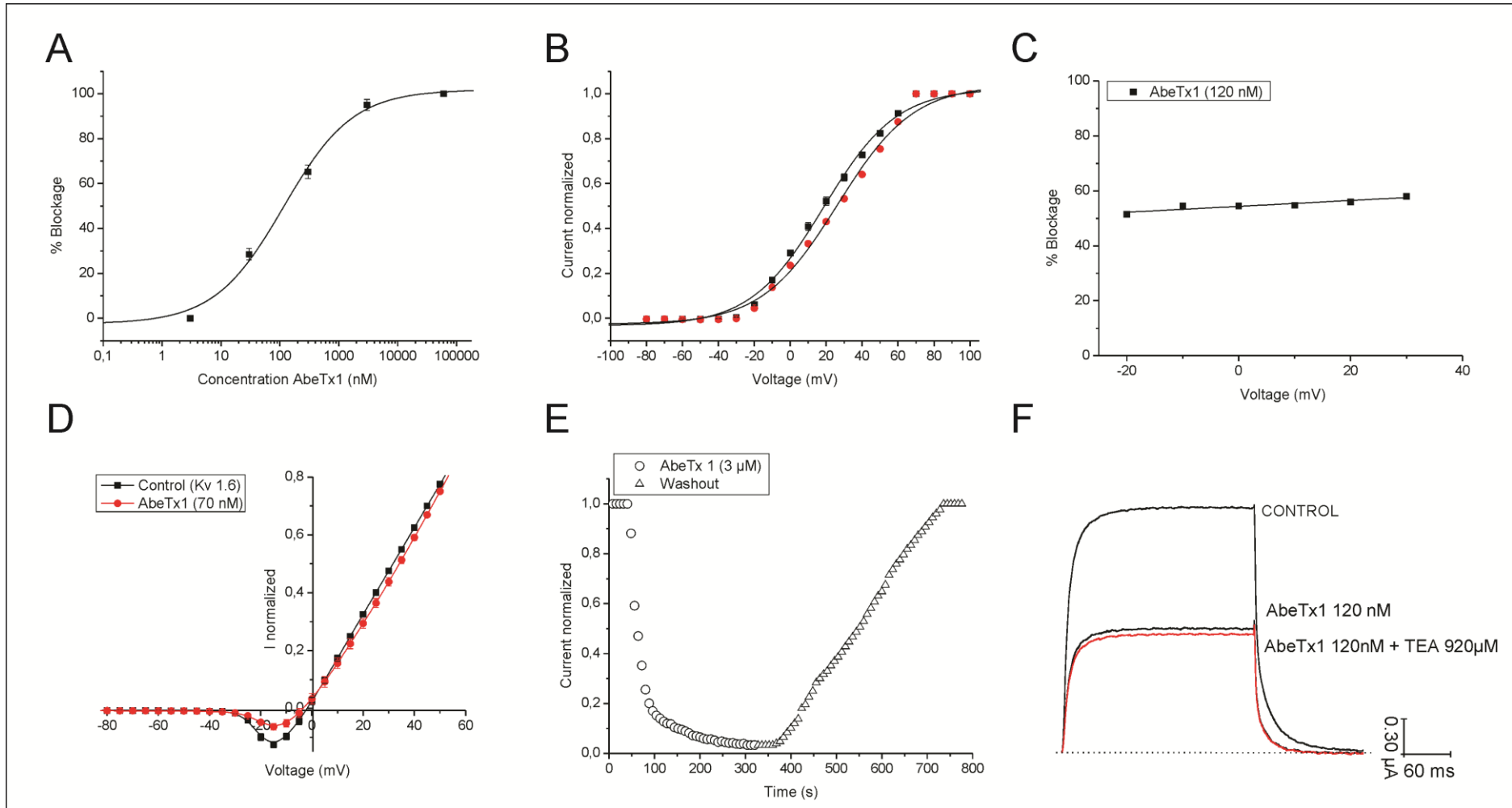


Figura 19 – Ensaio eletrofisiológicos em K_V 1.6. **A** - Curva dose-resposta da toxina AbeTx1, o valor de IC_{50} é de $115,68 \pm 31,44$ nM (n=6). **B** - Curva de corrente X voltagem na ausência e presença de AbeTx1 (120 nM). A curva com os pontos quadrados (pretos) é o controle e a curva com pontos circulares (vermelho) é na presença da toxina (n=3). **C** - Curva de dependência de voltagem do bloqueio da toxina AbeTx1 (120 nM) (n=3). **D** - Curva de corrente X voltagem na ausência e presença de AbeTx1 (70 nM) em solução com alta concentração de íons K^+ (HK-ND96). A curva com os pontos quadrados (pretos) é o controle e a curva com pontos circulares (vermelho) é na presença da toxina (n= 3). **E** - Ensaio de reversibilidade da ligação da AbeTx1 (3 μ M). **F** - Ensaio de interação competitiva entre as toxinas AbeTx1 (600 nM) e TEA (920 μ M) (n=5)

1.4. Ensaio para determinação da relação entre a estrutura e função da neurotoxina AbeTx1.

O peptídeo AbeTx1 (3 μ M) causa um bloqueio de $83,67 \pm 1,45\%$ na corrente do subtipo de K_V 1.1; $85,33 \pm 1,45\%$ para K_V 1.2 e $95,00 \pm 2,44\%$ para K_V 1.6. No entanto, quando se fez o 'screening' dos seis mutantes (3 μ M) no subtipo de K_V 1.1, o bloqueio da corrente foi igual à: AbeTx1 – R1A, $54,50 \pm 2,25\%$; AbeTx1 – K3A, $12,20 \pm 1,69\%$; AbeTx1 – K7A, $18,33 \pm 2,19\%$; AbeTx1 – R9A, $17,00 \pm 1,55\%$; AbeTx1 – R11A, $19,00 \pm 2,08\%$; AbeTx1 – K13A, $37,67 \pm 2,60\%$. No subtipo de K_V 1.2 a porcentagem de bloqueio da corrente dos íons K^+ é igual a zero (0,00%) para todos os mutantes a 3 μ M, ou seja, os mutantes não bloquearam a corrente dos íons K^+ . Para o subtipo de K_V 1.6, as porcentagens foram: AbeTx1 – R1A, $39,50 \pm 2,55\%$; AbeTx1 – K3A, $7,00 \pm 0,68\%$; AbeTx1 – K7A, $77,68 \pm 3,28\%$; AbeTx1 – R9A, $51,00 \pm 2,89\%$; AbeTx1 – R11A, $63,00 \pm 2,38\%$; AbeTx1 – K13A, $69,71 \pm 3,18\%$ (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores de inibição da corrente dos subtipos de K_V 1.1, K_V 1.2 e K_V 1.6 quando aplicados AbeTx1 natural e os seis mutantes a uma concentração de 3 μ M.

SAMPLE [3 μ M]	Kv 1.1	Kv 1.2	Kv 1.6
NATURAL	83,67 \pm 1,45 %	85,33 \pm 1,45 %	95,00 \pm 2,44 %
R1A	54,50 \pm 2,25 %	0,00%	39,50 \pm 2,55 %
K3A	12,20 \pm 1,69 %	0,00%	7,00 \pm 0,68 %
K7A	18,33 \pm 2,19 %	0,00%	77,68 \pm 3,28%
R9A	17,00 \pm 1,55 %	0,00%	51,00 \pm 2,89 %
R11A	19,00 \pm 2,08 %	0,00%	63,00 \pm 2,38 %
K13A	37,67 \pm 2,60 %	0,00%	69,71 \pm 3,18 %

Curvas de dose-resposta com os seis mutantes da AbeTx1 foram realizadas para os subtipos de Kv1.1 e Kv1.6 (Tabela 4). Os valores de IC₅₀ para o subtipo de Kv1.1 são: AbeTx1 – R1A 1.971,93 \pm 154,28 nM; AbeTx1 – K3A, 27.532,42 \pm 1.019,35 nM; AbeTx1 – K7A, 17.758,54 \pm 4.245,76 nM; AbeTx1 – R9A, 8.502,84 \pm 569,71 nM; AbeTx1 – R11A, 21.530,41 \pm 2.505,07 nM e AbeTx1 – K13A, 4.548,13 \pm 1.565,74 Nm (Figura 20A). Os valores de IC₅₀ no subtipo de Kv1.6 são: AbeTx1 – R1A foi de 3.530,87 \pm 469,18 nM; AbeTx1 – K3A, 18.856,89 \pm 128,02 nM; AbeTx1 – K7A, 851,76 \pm 89,99 nM; AbeTx1 – R9A, 2.441,76 \pm 263,98 nM; AbeTx1 – R11A, 810,68 \pm 179,17 nM e AbeTx1 – K13A, 1.076,82 \pm 142,23 nM (Figura 20C). No subtipo de Kv1.2 não foram realizadas curvas de dose-resposta, uma vez que a porcentagem do bloqueio quando aplicados 30 μ M de cada um dos mutantes foi de apenas: AbeTx1 – R1A, 5,90 \pm 1,84%; AbeTx1 – K3A, 8,00 \pm 1,53%; AbeTx1 – K7A, 7,13 \pm 2,01%; AbeTx1 – R9A, 3,71 \pm 2,01%; AbeTx1 – R11A, 8,38 \pm 2,34%; AbeTx1 – K13A, 13,34 \pm 1,54% (Tabela 4 e Figura 20B).

Tabela 4 – Valores de IC₅₀ da toxina AbeTx1 e dos seis mutantes nos subtipos de Kv1.1 e Kv1.6. Porcentagem de bloqueio de corrente do subtipo de Kv1.2 quando aplicados 30 μ M dos mutantes da AbeTx1.

SAMPLE	Kv 1.1 (IC ₅₀)	Kv 1.2	Kv 1.6 (IC ₅₀)
NATURAL	671,95 \pm 250,31 nM	100%	115,68 \pm 31,44 nM
R1A	1.971,93 \pm 154,28	5,90 \pm 1,84%	3.530,87 \pm 469,18
K3A	27.532,42 \pm 1.019,35	8,00 \pm 1,53%	18.856,89 \pm 128,02
K7A	17.758,54 \pm 4.245,76	7,13 \pm 2,01%	851,76 \pm 89,99
R9A	8.502,84 \pm 569,71	3,71 \pm 2,01%	2.441,76 \pm 263,98
R11A	21.530,41 \pm 2.505,07	8,38 \pm 2,34%	810,68 \pm 179,17
K13A	4.548,13 \pm 1.565,74	13,34 \pm 1,54%	1.076,82 \pm 142,23

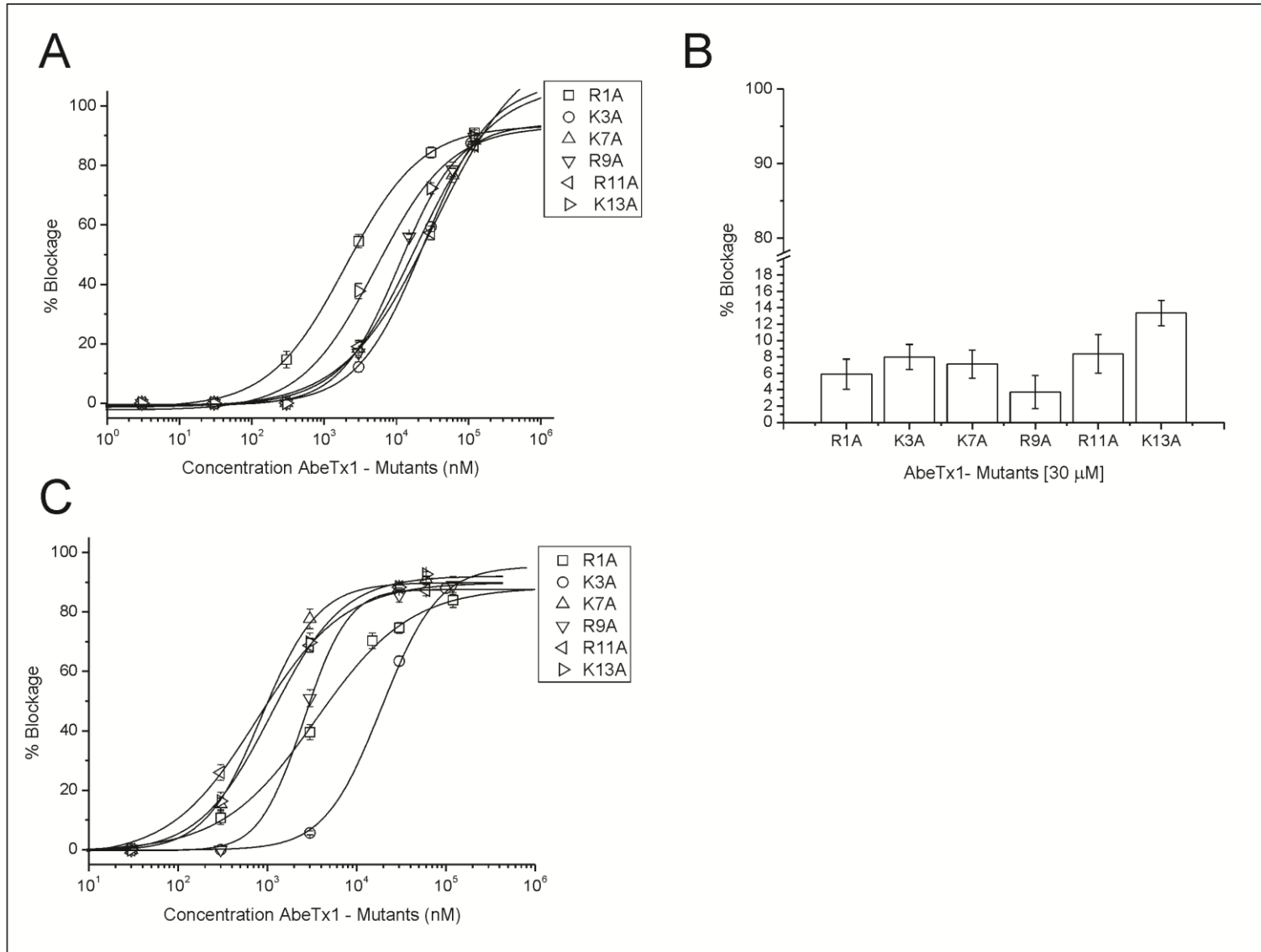


Figura 20 – Ensaio eletrofisiológico realizado em $K_V1.1$, $K_V1.2$ e $K_V1.6$, utilizando-se os seis mutantes da toxina AbeTx1. **A** – Curvas de dose-resposta dos mutantes AbeTx1 – R1A, K3A, K7A, R9A, R11A E K13A no subtipo de $K_V1.1$. **B** – Porcentagem de inibição da corrente dos íons K^+ do subtipo de $K_V1.2$ quando aplicados os mutantes da AbeTx1 (30 μ M). **C** – Curvas de dose-resposta dos seis mutantes da toxina AbeTx1 no subtipo de $K_V1.6$.

1.5. Perfil farmacológico da neurotoxina BcsTx4

A neurotoxina BcsTx4 também teve seu perfil farmacológico testado em 12 subtipos de canais voltagem - dependentes de K^+ das subfamílias *Shaker* (subtipos de $K_V1.1$ - $K_V1.6$ e *Shaker IR* (*Drosophila melanogaster*)), *Shab* ($K_V2.1$), *Shaw* ($K_V3.1$), *Shal* ($K_V4.2$ e $K_V4.3$) e EAG (*hERG*). Quando testada à 3 μ M, a BcsTx4 bloqueou a corrente dos subtipos de $K_V1.1$, $K_V1.2$ e $K_V1.6$. A porcentagem de bloqueio da corrente do subtipo de $K_V1.1$ foi de $79,00 \pm 0,81\%$ do $K_V1.2$ foi de $8,33 \pm 1,45\%$ e do $K_V1.6$ foi de $86,5 \pm 1,22\%$. Os subtipos de $K_V1.3$, $K_V1.4$, $K_V1.5$, *Shaker IR*, $K_V2.1$, $K_V3.1$, $K_V4.2$, $K_V4.3$ e *hERG* não apresentaram bloqueio da corrente (Figura 21). A toxina BcsTx4 (3 μ M) também teve sua atividade verificada nos subtipos de $Na_V1.2$, $Na_V1.4$ e $BgNa_V$, mas esta não apresentou um bloqueio da corrente ou retardo na inativação do canal (Figura 22).

A concentração de BcsTx4 necessária para bloquear 50% da corrente dos íons K^+ do subtipo de $K_V1.1$ é de $1267,72 \pm 77,83$ nM (Figura 23A). As curvas de corrente de ativação do canal em função da voltagem foram realizadas em uma situação controle e na presença da BcsTx4 (1200 nM). A voltagem de ativação de 50% dos canais ($V_{1/2}$) na situação controle foi de $0,27 \pm 1,43$ mV, enquanto que na presença da BcsTx4 foi de $19,03 \pm 1,70$ mV (Figura 23B). O bloqueio da corrente apresenta uma dependência de voltagem, sendo que este aumenta linearmente, conforme os valores de voltagem tornam-se mais positivos (Figura 23C). A ligação da toxina ao K_V é reversível e a corrente é totalmente restaurada após a lavagem da solução contendo o ovócito (Figura 23D). O valor de IC_{50} para o subtipo de $K_V1.6$ é $226,10 \pm 76,39$

nM (Figura 24A). As curvas de corrente de ativação do canal em função da voltagem na ausência da toxina tem um $V_{1/2}$ igual à $16,30 \pm 1,32$ mV e, na presença de BcsTx4, $V_{1/2}$ é igual a $20,90 \pm 1,80$ mV (Figura 24B). O bloqueio da corrente ocorre independentemente da voltagem (Figura 24C). BcsTx4 liga-se reversivelmente ao $K_v1.6$ e a corrente é completamente restaurada após a lavagem (Figura 24D). Foram realizados ensaios de interação competitiva, nos quais primeiramente se aplicou AbeTx1 (120 nM) obtendo-se $49,00 \pm 1,37\%$ de bloqueio da corrente e, posteriormente, uma solução contendo AbeTx1 (120 nM) e BcsTx4 (250 μ M), obtendo-se $57,67 \pm 1,67\%$ de bloqueio (Figura 24E).

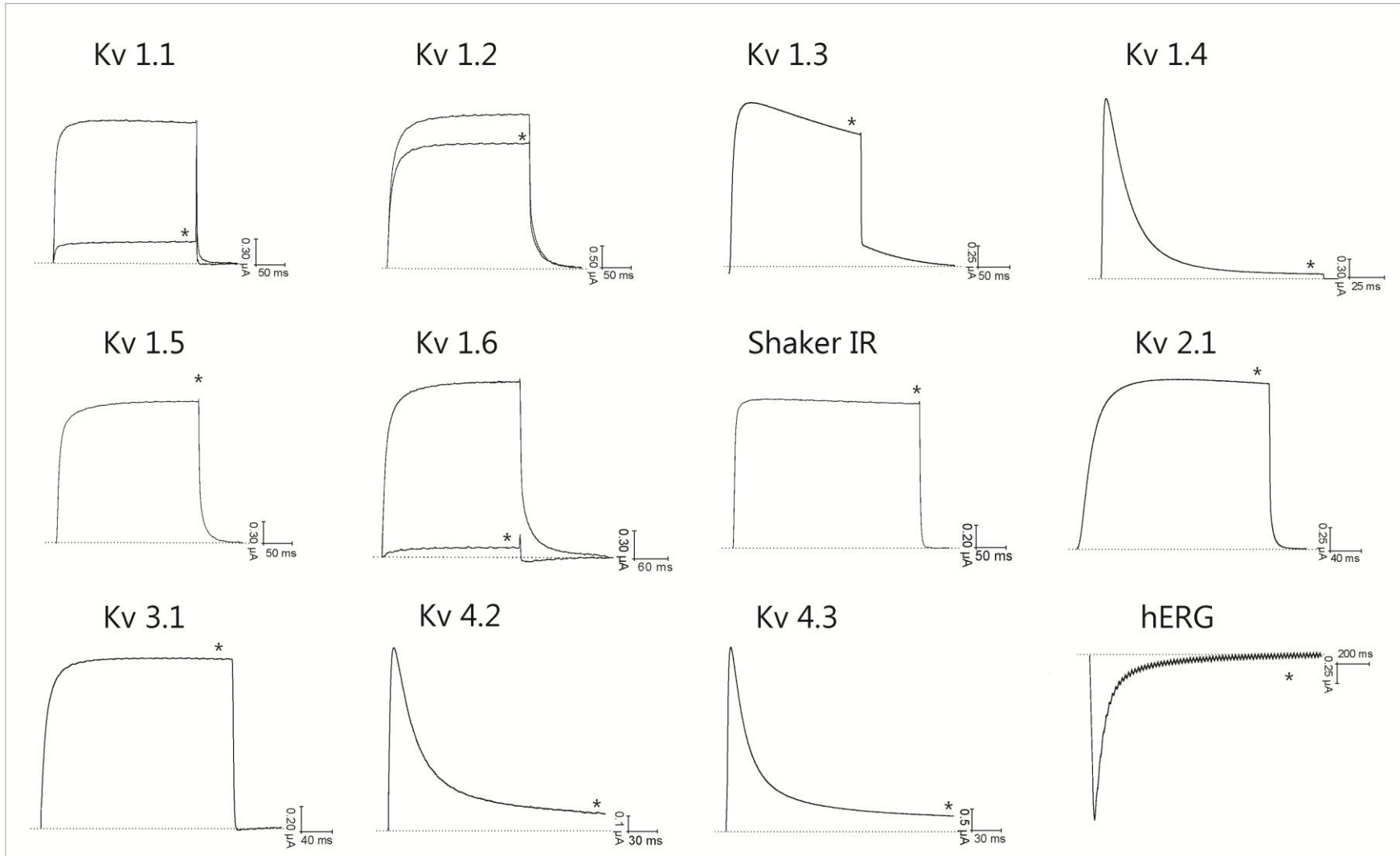


Figura 21 – Efeito inibitório da toxina BcsTx4 nos diferentes subtipos de K_V . Os perfis representam a situação controle e quando aplicados 3 μM da toxina BcsTx4. O * representa o bloqueio ou não da corrente após a aplicação de 3 μM da toxina AbeTx1. A linha tracejada indica o nível basal de corrente (n= 6).

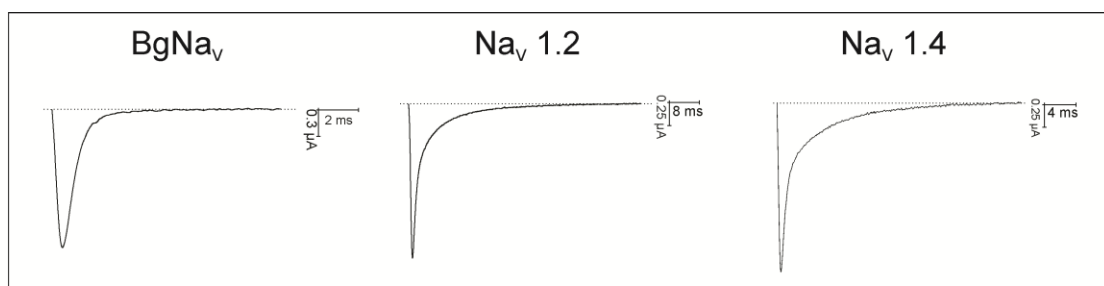


Figura 22 – Efeito inibitório da toxina BcsTx4 nos diferentes subtipos de Na_V . Os perfis representam a situação controle e quando aplicados 3 μM da toxina BcsTx4. O * representa o bloqueio ou não da corrente após a aplicação de 3 μM da toxina BcsTx4. A linha tracejada indica o nível basal de corrente (n= 3).

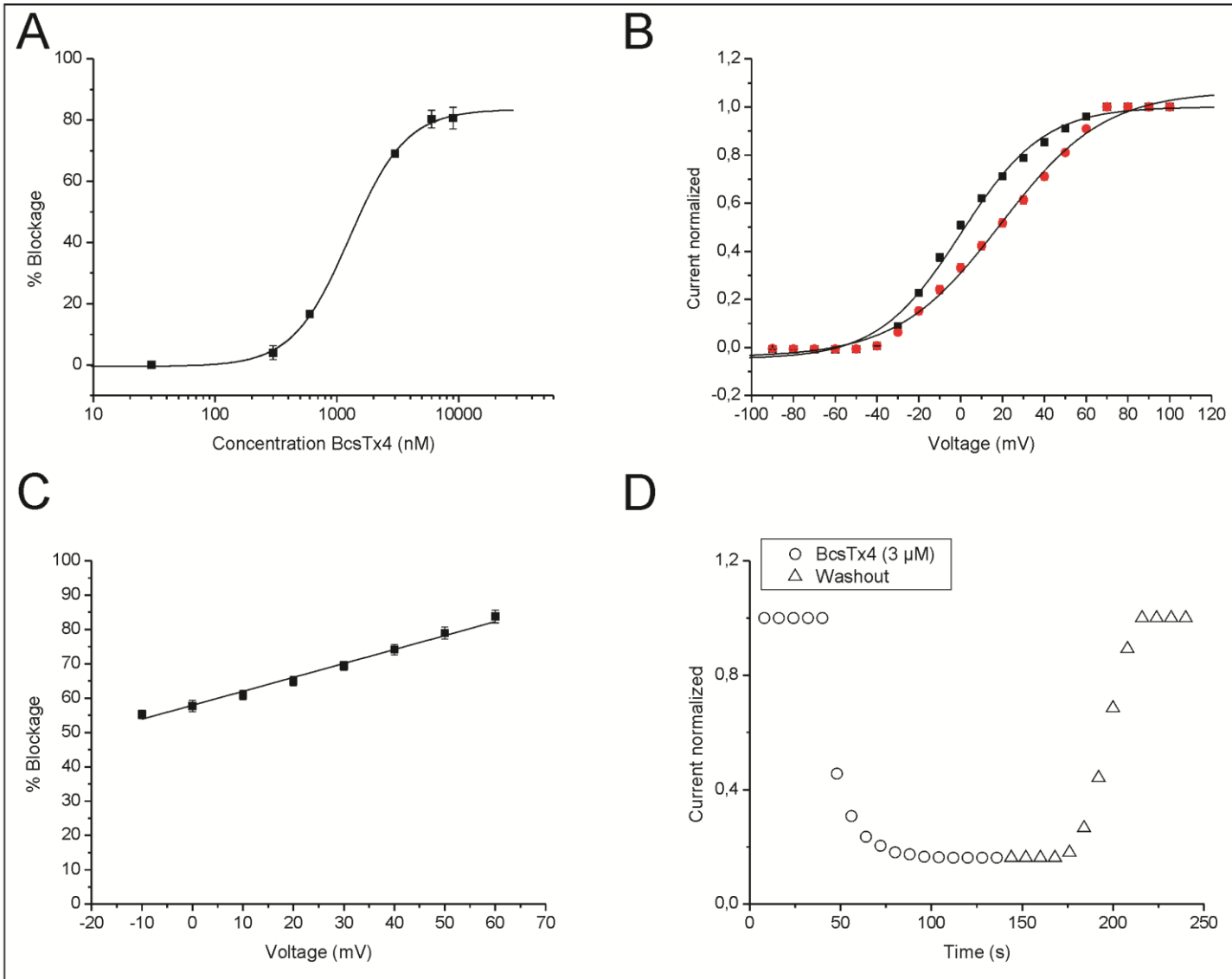


Figura 23 – Ensaio eletrofisiológicos com a neurotoxina BcsTx4 no subtipo de K_V 1.1. **A** - Curva dose-resposta da toxina BcsTx4, o valor de IC_{50} é de $1267,72 \pm 77,83$ nM (n=6). **B** - Curva de corrente X voltagem na ausência e presença de BcsTx4 (1200 nM). A curva com os pontos quadrados (pretos) é o controle e a curva com pontos circulares (vermelho) é na presença da toxina (n=3). **C** - Curva de dependência de voltagem do bloqueio da toxina BcsTx4 (1200 nM) (n=3). **D** - Ensaio de reversibilidade da ligação da BcsTx4 (3 μ M) com o K_V (n=3)

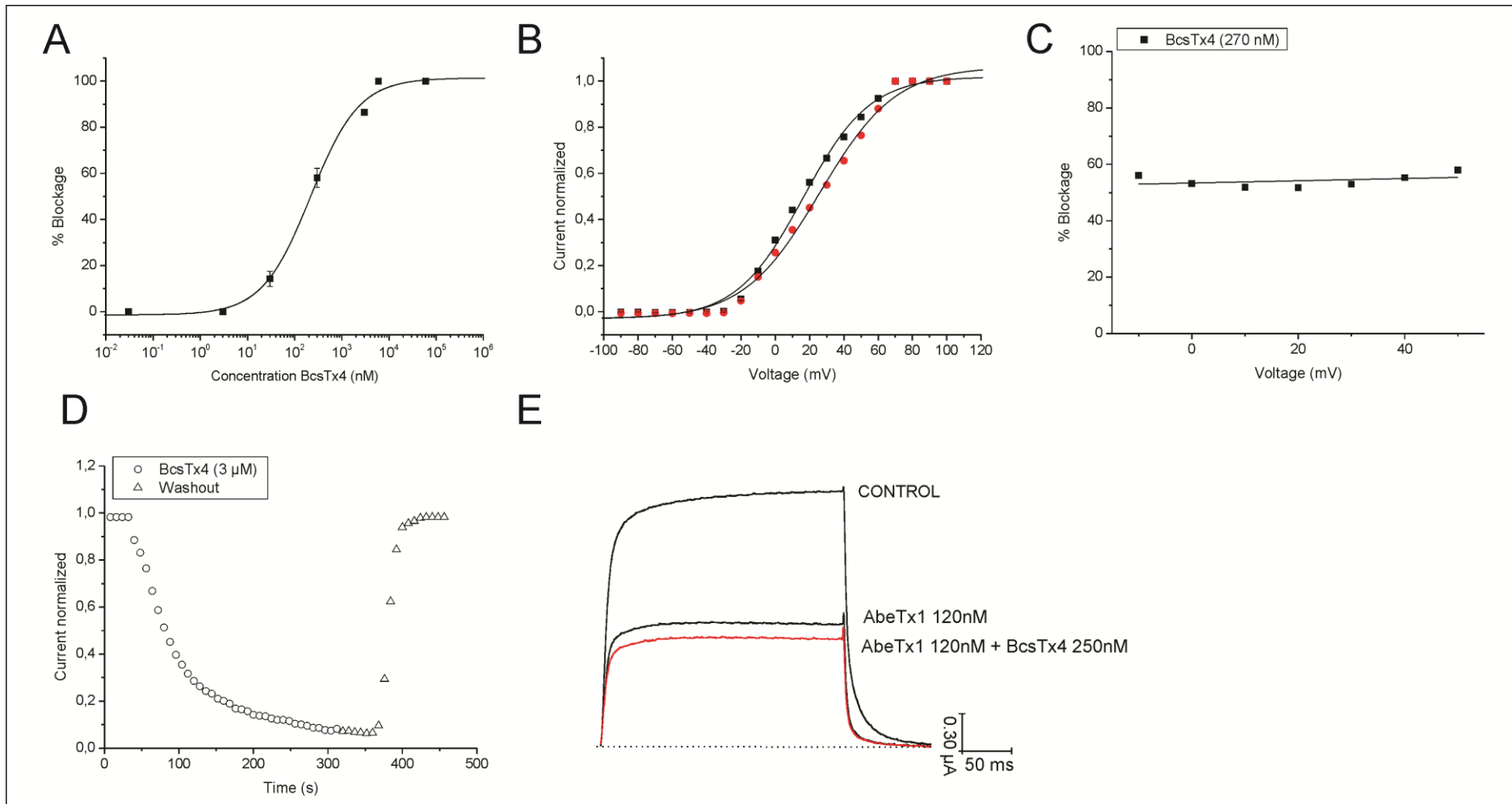


Figura 24 – Ensaio eletrofisiológicos com a neurotoxina BcsTx4 no subtipo de $K_V1.6$. **A** - Curva dose-resposta da toxina AbeTx1, o valor de IC_{50} é de $226,10 \pm 76,39$ nM (n=6). **B** - Curva de corrente X voltagem na ausência e na presença de BcsTx4 (270 nM). A curva com os pontos quadrados (pretos) é o controle e a curva com pontos circulares (vermelho) é na presença da toxina (n=3). **C** - Curva de dependência de voltagem do bloqueio da toxina BcsTx4 (270 nM) (n=3). **D** - Ensaio de reversibilidade da ligação da AbeTx1 (3 μ M). **E** - Ensaio de interação competitiva entre as toxinas AbeTx1 (120 nM) e BcsTx4 (250 μ M) (n=5).

1.6. Análise da estrutura primária das neurotoxinas AbeTx1 e BcsTx4.

Os peptídeos AbeTx1 e BcsTx4 tiveram suas sequências de aminoácidos alinhadas com neurotoxinas da família “*kappa-toxinas*”, uma vez que apresentam o mesmo padrão de pareamento das Cisteínas e atuam em canais voltagem - dependentes de K^+ (Tabela 5). Para a criação do dendograma funcional, utilizou-se o método “*Neighbour joining*”, seguido do “*bootstrap*” teste. O dendograma foi então linearizado e condensado (“*cut off*” de 50%), resultando em uma separação da família das “*kappa-toxinas*” em sete subfamílias. A primeira subfamília (κ -KTx1) é formada por cinco membros: κ -hefutoxin1, 2 e 3, κ -KTx1.3 e, HSP009C (Gopalakrishnakone et al, 2002; Ma et al, 2010; Nirathanan et al, 2005), κ -KTx2 é composta pelas toxinas OmTx1–4, OcyC8 e 9 e, HSP053C.1 e 2 (Camargos et al, 2011; Chagot et al, 2005b; Ma et al, 2010) Os peptídeos HSP040C.1 e HSP040C.3–5 formam a subfamília κ -KTx3 (Ma et al, 2010). O peptídeo HSP040C.2 e a toxina HelaTx1 pertencem às subfamílias κ -KTx4 e κ -KTx5, respectivamente (Ma et al, 2010; Vandendriessche et al, 2012). As Conotoxinas flf14a – c formam a sexta subfamília (Moller et al, 2005) e as neurotoxinas AbeTx1 e BcsTx4 são os primeiros membros de uma nova subfamília (κ -KTx7) (Figura 25).

Tabela 5 – Descrição das 22 *kappa-toxinas* utilizadas no dendograma funcional. Nº de acesso no UniProt, nomenclatura das toxinas, espécie e animal de onde foram extraídas e sequências de aminoácidos.

N°	UniProt	Nomenclatura	Espécie (animal)	Sequências de aminoácidos
1		AbeTx1	<i>Actinia bermudensis</i> (anêmona do mar)	RCKTCSKGRRCRPKPNCG
2		BcsTx4	<i>Bunodosoma caissarum</i> (anêmona do mar)	GCKEVCVKGRRCRPKPNCG
3	P82850	k-Hefutoxin1 (kappa-KTx 1.1)	<i>Heterometrus fulvipes</i> (escorpião)	GHACYRNCWREGNDEETCKERC
4	P82851	k-Hefutoxin2 (kappa-KTx 1.2)	<i>Heterometrus fulvipes</i> (escorpião)	GHACYRNCWREGNDEETCKERCG
5		k-Hefutoxin3	<i>Heterometrus fulvipes</i> (escorpião)	GFGCYRSCWKAGHDEETCKKECS
6	P83655	kappa-KTx 1.3	<i>Heterometrus spinifer</i> (escorpião)	GFGCYRSCWKAGHDEETCKKECS
7	P0C1Z3	OmTx1 (kappa-KTx 2.1)	<i>Opisthacanthus madagascariensis</i> (escorpião)	DPCYEVCLQQHGNVKECEEACKHPVE
8	P0C1Z3	OmTx2 (kappa-KTx 2.2)	<i>Opisthacanthus madagascariensis</i> (escorpião)	DPCYEVCLQQHGNVKECEEACKHPVEY
9	P0C1Z3	OmTx4 (kappa-KTx 2.4)	<i>Opisthacanthus madagascariensis</i> (escorpião)	DPCYEVCLQQHGNVKECEEACKHP
10	P0C1Z4	OmTx3 (kappa-KTx 2.3)	<i>Opisthacanthus madagascariensis</i> (escorpião)	NDPCYEVCLQHTGNVKACEEACQ
11	P84705	Conotoxin flf14a	<i>Conus floridanus floridensis</i> (molusco)	WDVNDCIHFCLIGVVERSYTECHTMCT
12	P84706	Conotoxin flf14b	<i>Conus floridanus floridensis</i> (molusco)	WDVNDCIHFCLIGVGRSYTECHTMCT
13	P84707	Conotoxin flf14c	<i>Conus floridanus floridensis</i> (molusco)	WDAYDCIQFCMRPEMRHTYAQCLSICT
14	P0DJ41	HelaTx1 (kappa-KTx 5.1)	<i>Heterometrus laoticus</i> (escorpião)	SCKKECSGSRRTKKCMQKCNREHGH
15	P0DJ36	HSP040C.1 (kappa-KTx 3.1)	<i>Heterometrus petersii</i> (escorpião)	QWINACFNVCMKIISDQKYCKYLCGKN
16	P0DJ40	HSP040C.2 (kappa-KTx 4.1)	<i>Heterometrus petersii</i> (escorpião)	DIPCFETCMKLYHIPKLCYIKCRKH
17	P0DJ37	HSP040C.3 (kappa-KTx 3.2)	<i>Heterometrus petersii</i> (escorpião)	HWINACFNICMKIISDQKYCKSFSG
18	P0DJ38	HSP040C.4 (kappa-KTx 3.3)	<i>Heterometrus petersii</i> (escorpião)	QWINACFNICMKIISDQKYCKSFSG
19	P0DJ39	HSP040C.5 (kappa-KTx 3.4)	<i>Heterometrus petersii</i> (escorpião)	QWINACFNVCMKIISDQKYCKYLCGKS
20	P0DJ33	HSP009C (kappa-KTx 1.4)	<i>Heterometrus petersii</i> (escorpião)	GFGCFRSCWKAGHDDKTCKSMCG
21	P86110	OcyC8 (kappa-KTx 2.5)	<i>Opisthacanthus cayaporum</i> (escorpião)	YDACVNACLEHHPNVRECEAAACKNPVPP
22	C5J893	OcyC9 (kappa-KTx 2.6)	<i>Opisthacanthus cayaporum</i> (escorpião)	FPPCVEVCVQHTGNVKECEAACGE
23	P0DJ34	HSP053C.1 (kappa-KTx 2.7)	<i>Heterometrus petersii</i> (escorpião)	GNACIEVCLQHTGNPAECDKACDK
24	P0DJ35	HSP053C.2 (kappa-KTx 2.8)	<i>Heterometrus petersii</i> (escorpião)	GNACIEVCLQHTGNPAECDKPCDK

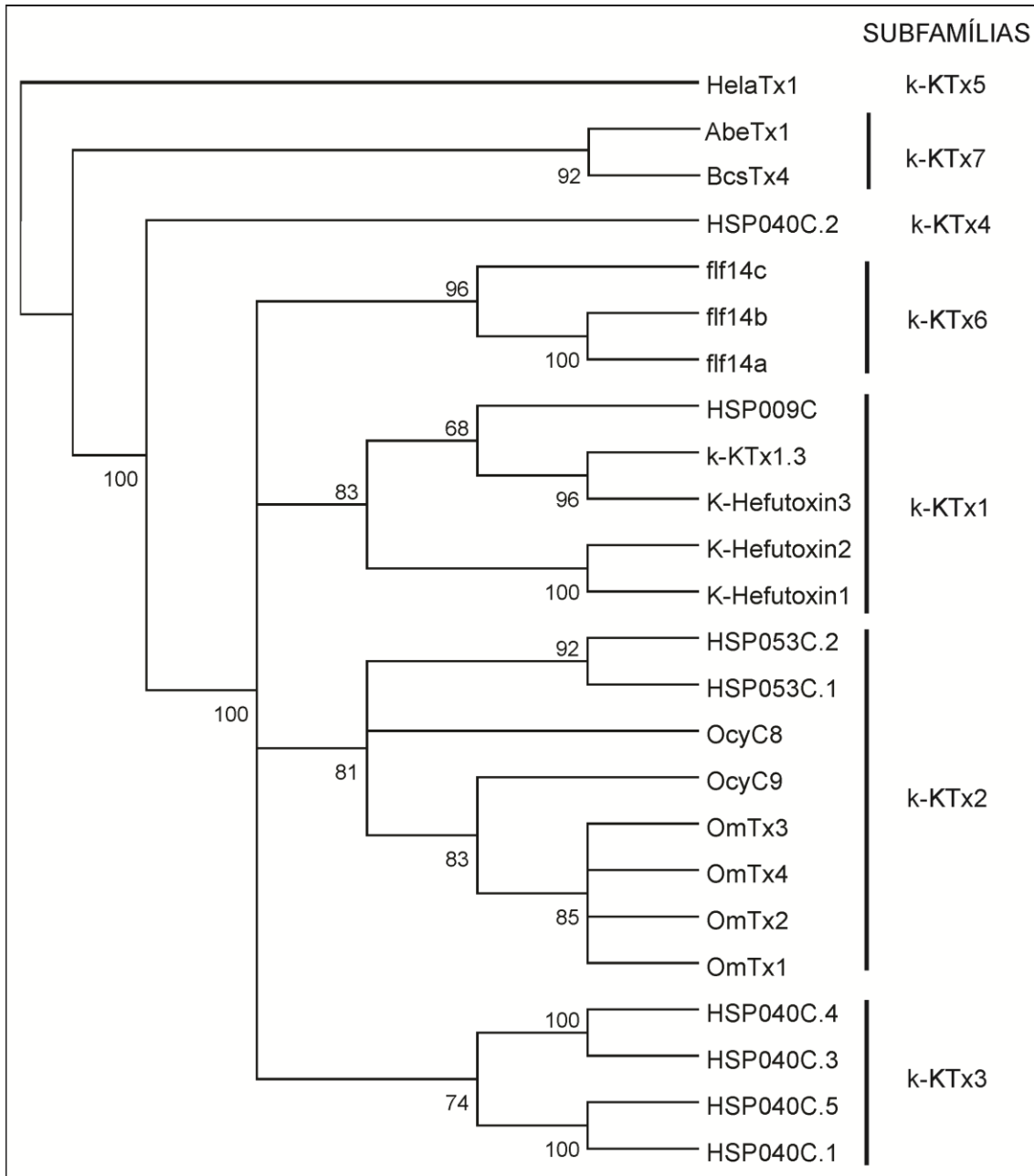


Figura 25 - Dendrograma funcional construído a partir do alinhamento das seqüências das “*kappa-toxinas*” da Tabela 4. Descrição das sete subfamílias de *kappa-toxinas* (κ -KTx1 - κ -KTx7). AbeTx1 e BcsTx4 são os primeiros membros de uma nova subfamília de “*kappa-toxinas*”.

2. Discussão

2.1. Obtenção das peçonhas das anêmonas do mar *A. bermudensis* e *B. caissarum*

Com o intuito de se compreender a peçonha das anêmonas *A. bermudensis* e *B. caissarum*, optou-se por obtê-las através de um estímulo elétrico (Malpezzi et al, 1993). Este procedimento é muito eficaz, pois possibilita a obtenção dos compostos hidrofílicos que são diretamente secretados dos nematocistos, sem que haja interferência de outras substâncias provenientes de tecidos corpóreos com outras funções fisiológicas. Isso se faz relevante uma vez que neste trabalho nós temos como objetivos (1) entender a finalidade (predação, competição e/ou defesa) da produção das toxinas pelas anêmonas do mar, (2) caracterizar novos tipos de compostos neurotóxicos e compreender seus mecanismos de ação em canais voltagem - dependentes de K^+ e (3) utilizar neurotoxinas como ferramentas para o estudo da estrutura e função do K_v .

2.2. Fracionamento das peçonhas

Desde 1975, quando a primeira toxina de uma anêmona do mar foi isolada e caracterizada (Beress & Beress, 1975), uma série de trabalhos envolvendo a purificação de toxinas demonstrou que enzimas, citolisinas, peptídeos e compostos provenientes do metabolismo celular secundário são comumente encontrados na peçonha de diversas espécies de anêmonas do mar, sendo responsáveis por efeitos neurotóxicos, proteolíticos e citolíticos (Frazao et al, 2012). Comparando-se os resultados obtidos do fracionamento das peçonhas das anêmonas do mar *A. bermudensis* e *B. caissarum* com trabalhos publicados com espécies das mais variadas regiões do mundo, concluímos que os perfis de gel-filtração das peçonhas são semelhantes e que compostos peptídicos (entre 1 e 10 KDa), que em geral atuam em canais iônicos, estão presentes nas frações que correspondem à fração III da Gel-filtração da peçonha das anêmonas *A. bermudensis* e *B. caissarum* (Figura 10)

(Lagos et al, 2001; Lanio et al, 2001; Malpezzi et al, 1993; Minagawa et al, 1998; Oliveira et al, 2004)

2.3. Purificação das neurotoxinas AbeTx1 e BcsTx4

As neurotoxinas de anêmonas do mar já descritas são peptídeos que possuem entre 2,5 e 6 KDa e atuam em canais voltagem - dependentes de K^+ , Na^+ e sensíveis ao pH (“*Acid Sensitive Ion Channels*” - ASIC). Durante o processo de purificação das frações III (AbeIII e BcsIII, provenientes da Gel-filtração), todas as subfrações (picos dos cromatogramas) foram analisadas através de um espectrômetro de massas (dados não apresentados), permitindo inferir a existência de compostos com massas moleculares menores que 2,5 KDa e superiores a 6 KDa, os quais poderiam representar novos tipos de neurotoxinas de anêmonas do mar. Dessa forma, em duas etapas de purificação, por meio de cromatografias líquidas de fase-reversa em HPLC, obtivemos os peptídeos AbeTx1 da anêmona *A. bermudensis* e BcsTx4, da *B. caissarum* (Figura 10). A pureza desses compostos também foi determinada por espectrometria de massas (MALDI-TOF), a partir da qual obtivemos uma relação massa/carga (m/z) de 1889,8 Da para o peptídeo AbeTx1 e de 1830,7 Da para o BcsTx4 (Figura 11).

2.4. Potência e seletividade das neurotoxinas AbeTx1 e BcsTx4

AbeTx1 (3 μ M) apresentou uma especificidade no bloqueio da corrente dos íons K^+ dos subtipos de $K_V1.1$ - $K_V1.3$, $K_V1.6$ e *Shaker* IR (Figura 14), ao passo que BcsTx4 (3 μ M) somente bloqueou os subtipos de $K_V1.1$, $K_V1.2$ e $K_V1.6$ (Figura 21) e ambas não atuam em canais voltagem dependentes de Na^+ (Figura 15 e Figura 22). A potência com que a AbeTx1 atua nos subtipos de $K_V1.1$, $K_V1.2$ e $K_V1.6$ indica uma maior afinidade para os subtipos de $K_V1.2$ e $K_V1.6$, uma vez que o valor de IC_{50} para estes subtipos são iguais a $167,36 \pm 38,58$ nM e $115,68 \pm 31,44$ nM, enquanto que o IC_{50} para o $K_V1.1$ é de $671,95 \pm 150,31$ nM, ou seja, aproximadamente quatro vezes maior que os valores para $K_V1.2$ e $K_V1.6$. Por sua vez, BcsTx4 é aproximadamente cinco vezes mais potente para o subtipo $K_V1.6$ (IC_{50} $226,10 \pm 76,39$ nM), se comparado ao

subtipo de $K_V1.1$ (IC_{50} $1267,72 \pm 77,83$ nM). Comparando-se sua potência com a da AbeTx1, conclui-se que em ambos os subtipos ($K_V1.1$ e $K_V1.6$), a BcsTx4 atua com uma menor potência. Estas diferenças na seletividade da atividade e potência devem ser consequência da mutação natural da Arg1 da AbeTx1 pela Gly1 da BcsTx4 (Figura 26). Essa afirmação pôde ser comprovada com a substituição da Arg1 da AbeTx1 por uma Alanina, o que causou uma drástica perda na afinidade com o $K_V1.2$ (Tabela 3 e Tabela 4). Nós também podemos supor que a mutação da Serina (na posição 6) da AbeTx1 por uma Valina na BcsTx4 possa ser responsável por essas diferenças, uma vez que esta mutação natural substitui um aminoácido hidrofílico por um hidrofóbico. No entanto, nós não temos dados experimentais para comprovar esta suposição.

AbeTx1	1	RCKTCSKGRCRPKPNCG	17
BcsTx4	1	GCKECVKGRCRPKPNCG	17

Figura 26 – Alinhamento das sequências de aminoácidos da AbeTx1 e BcsTx4. Aminoácidos grifados em preto são idênticos. Aminoácidos não grifados possuem características físico-químicas distintas.

Comparando-se a potência do bloqueio da corrente dos íons K^+ das toxinas AbeTx1 e BcsTx4 com toxinas da família das “*kappa-toxinas*”, observamos que a κ -hefutoxin1 (Gopalakrishnakone et al, 2002), as OmTx1 a OmTx3 (Chagot et al, 2005b), a OcyC8 (Camargos et al, 2011) e a HelaTx1 (Vandendriessche et al, 2012) são menos potentes, uma vez que os valores de IC_{50} para os subtipos de $K_V1.1$ e $K_V1.2$ são altas concentrações micromolares (μ M), enquanto que para a AbeTx1 e BcsTx4, os valores são na faixa nanomolar (nM) (Tabela 6). Interessantemente, até o presente trabalho, era questionável se os alvos biológicos das “*kappa-toxinas*” são de fato os canais voltagem – dependentes de K^+ , uma vez que todas as toxinas já descritas possuem baixa afinidade (Camargos et al, 2011).

Tabela 6 – Potência e seletividade das “*kappa-toxinas*” que atuam em K_V . As toxinas κ -hefutoxin1 (isolada do escorpião *Heterometrus fulvipes*), OmTx1-3 (*Opisthacanthus madagascariensis*), OcyC8 (*Opisthacanthus cayaporum*) e

HelaTx1 (*Heterometrus laoticus*) são as únicas “*kappa-toxinas*” que já tiveram sua seletividade e/ou potência verificadas para diferentes subtipos de K_V . Os valores de IC_{50} foram obtidos através de ensaios eletrofisiológicos, utilizando-se ovócitos de *Xenopus laevis* e/ou células de ovários de hamster chinês.

Toxinas	Subtipo de K_V	Potência
k-hefutoxin1	$K_V1.1$	Não bloqueia
	$K_V1.2$	$IC_{50} \sim 150 \mu M$
	$K_V1.3$	$IC_{50} \sim 40 \mu M$
OmTx1	$K_V1.1$	500 μM (17 % bloqueio)
	$K_V1.2$	500 μM (12 % bloqueio)
	$K_V1.3$	500 μM (24 % bloqueio)
OmTx2	$K_V1.1$	500 μM (08 % bloqueio)
	$K_V1.2$	500 μM (10 % bloqueio)
	$K_V1.3$	500 μM (36 % bloqueio)
OmTx3	$K_V1.1$	500 μM (33 % bloqueio)
	$K_V1.2$	500 μM (08 % bloqueio)
	$K_V1.3$	500 μM (70 % bloqueio)
OcyC8	$K_V1.1$	$IC_{50} \sim 217 \mu M$
	$K_V1.4$	$IC_{50} \sim 71 \mu M$
HelaTx1	$K_V1.1$	$IC_{50} \sim 9,9 \mu M$

Em geral, toxinas bloqueadoras do poro dos canais da subfamília *Shaker* (K_V1) possuem dois aminoácidos, distantes $6,6 \pm 1 \text{ \AA}$, que formam uma “*díade funcional*” (Dauplais et al, 1997). Esta díade é formada por um aminoácido polar (Lys ou Arg), cuja cadeia lateral interage com os aminoácidos do poro do canal (Asp ou Glu) e um aminoácido aromático/hidrofóbico (Tyr, Phe ou Leu), que interagirá através de forças hidrofóbicas com os aminoácidos Tyr e Trp do canal. Estes aminoácidos participam da interação com o canal, aumentando sua afinidade, pois servem como um segundo ponto de ancoramento para as toxinas (Sabatier et al, 2004a; Sabatier et al, 2008; Sabatier et al, 2005).

Srinivasan e colaboradores (2002) demonstraram a existência e a importância da “díade funcional” da κ -hefutoxin 1, através de ensaios de mutação sítio-dirigida, em que se criaram mutantes com as substituições: (i) da Tirosina na posição 5 por um resíduo de Alanina (Y5A), (ii) da Lisina da posição 19, por uma Alanina (K19A) e (iii) pelas duas substituições ao mesmo tempo (Y5A/K19A). Estas mutações causaram a perda e/ou diminuição da atividade da toxina nos subtipos de $K_V1.2$ e $K_V1.3$ (Gopalakrishnakone et al, 2002). Posteriormente, Chagot e colaboradores (2005), baseando-se na importância que a “díade funcional” da κ -hefutoxin 1 tem para a sua interação e afinidade com os canais voltagem-dependentes de K^+ , comprovaram a existência de uma “díade funcional” formada pela Lisina 15 e a Tirosina 4 das toxinas OmTx 1, 2 e 4, do escorpião *Heterometrus fulvipes* (Chagot et al, 2005b). No entanto, como discutido anteriormente, tanto a AbeTx1, quanto a BcsTx4, apresentam uma maior afinidade para os subtipos de $K_V1.1$ e $K_V1.2$ e, sendo assim, diferentemente do que se tem proposto na literatura, dentro da família das “*kappa-toxinas*”, as toxinas (AbeTx1 e BcsTx4) que não possuem em sua estrutura uma “díade funcional” são mais potentes que as toxinas com a “díade funcional”.

2.5. Interação da AbeTx1 e da BcsTx4 com o subtipo de $K_V1.1$

Tanto para a AbeTx1 quanto para a BcsTx4, o bloqueio da corrente dos íons K^+ é dose-dependente e dependente de voltagem, uma vez que a porcentagem do bloqueio altera-se em uma faixa de voltagem entre -30 e 80 mV (Figura 16 e Figura 23). Conforme os valores de voltagem tornam-se mais positivos, o bloqueio da corrente aumenta, sugerindo que as toxinas se ligam a regiões do $K_V1.1$ que ficam mais expostas quando o canal se abre (*p.ex.*: aminoácidos presentes nos segmentos transmembranares do *domínio sensor de voltagem*). No entanto, nossos dados não nos permitem confirmar esta proposição, pois experimentos de mutações sítio-dirigidas do $K_V1.1$ ainda não foram realizados. Vandendriessche e colaboradores (2012), ao estudarem a toxina HelaTx1, do escorpião *Heterometrus laoticus*, também observaram um bloqueio dependente de voltagem. Porém, conforme os valores de voltagem aumentavam, o bloqueio diminuía. Tal efeito foi atribuído ao grande número de

aminoácidos positivos da toxina, que causariam uma força de repulsão quando a membrana se encontra em valores positivos de voltagem (Vandendriessche et al, 2012). Interessantemente, a AbeTx1 e a BcsTx4 também possuem uma grande quantidade de aminoácidos positivos e seus pontos isoelétricos (AbeTx1, 9,94; BcsTx4, 9,25) são relativamente iguais à HelaTx1 (PI igual a 9,70), sugerindo que a explicação para a diminuição do bloqueio da toxina HelaTx1 pode estar incorreta.

A *ativação* do canal requer uma maior energia, quando na presença de AbeTx1 ou BcsTx4, (Figura 16 e Figura 23), refletindo uma possível modulação da cinética de *ativação* do $K_v1.1$. Já se tem descrito na literatura, toxinas capazes de modular a cinética de *ativação* de diferentes subtipos de K_v . Estas toxinas atuam no *domínio do sensor de voltagem*, causando uma alteração na probabilidade de abertura do canal, através de sua estabilização em um dos estados de conformação estrutural que surgem durante o processo de abertura ("*gating*") (Swartz, 2007). O "*gating*" do canal envolve uma série de alterações conformacionais que ocorrem independentemente nos quatro sensores de voltagem (presentes nas quatro subunidades do canal). Estas alterações são populações de estados conformacionais que transitam entre o estado de repouso do canal até a sua *ativação*. Evidências sugerem que, em geral, toxinas moduladoras da cinética de *ativação* interagem com a alça de ligação extracelular entre os segmentos S3 e S4, causando a estabilização de um estado de conformação estrutural de repouso do canal e, conseqüentemente, retardando sua *ativação* (Ledwell & Aldrich, 1999; Smith-Maxwell et al, 1998; Swartz, 2007).

A Hanatoxin (HaTx), isolada da tarântula *Grammostola spatulata*, foi a primeira toxina a ser descrita como moduladora da cinética de *ativação* do K_v e é também a que vem sendo mais estudada (Swartz & MacKinnon, 1995). HaTx desloca a cinética de *ativação* do $K_v2.1$ para valores mais positivos (aproximadamente 40 mV), ao se ligar aos resíduos de aminoácido entre os segmentos transmembranares S3 e S4. A primeira evidência de que a HaTx não atuava como uma bloqueadora do poro do canal (através da obstrução física da passagem dos íons K^+), surgiu quando o *domínio do poro* (S5-poro-

S6) do $K_V2.1$ foi substituído pelo de um subtipo de canal que a HaTx não atuava e, ainda assim, a toxina causou um retardo na *ativação* deste canal quimérico (Swartz & MacKinnon, 1995). Posteriormente, mutações sítio dirigidas (“*Alanine scan*”) dos aminoácidos dos segmentos transmembranares S1 a S4 demonstraram que a substituição da Fenilalanina na posição 274 (F274) e do Ácido Glutâmico (E277), ambos da região C-terminal do segmento S3, causam as maiores alterações na afinidade da toxina (Li-Smerin & Swartz, 2000).

Outros exemplos de toxinas moduladoras da cinética de *ativação* de diferentes subtipos de K_V são: a SGTx1 (da aranha *Scodra griseipes*) (Marvin et al, 1999), GxTx1E (*Plesiophrictus guangxiensis*) (Herrington et al, 2006), ScTx1 (*Stromatopelma calceata*), HmTx1 e HmTx2 (*Heteroscodra maculate*) (Escoubas et al, 2002), entre outras. Estas toxinas possuem quatro pontes dissulfeto com um padrão de pareamento C1 – C4, C2 – C5 E C3 – C6, formando um motivo estrutural conhecido como “*inhibitory cysteine knot*” (“ICK – *motif*”). Algumas destas toxinas (HaTx, SGTx1, VSTx1 entre outras) já tiveram suas estruturas tridimensionais determinadas, sendo formadas por três fitas β antiparalelas. Interessantemente, estas toxinas possuem um grupo de aminoácidos hidrofóbicos que estão cercados por aminoácidos positivos e ácidos, formando um núcleo anfipático que interage tanto com aminoácidos ácidos, como com os hidrofóbicos da alça de ligação entre os segmentos S3-S4. Para algumas toxinas, já foi demonstrado que seus aminoácidos hidrofóbicos interagem com os lipídios de membrana, permitindo que estas se insiram no meio da membrana e, então, interajam com os aminoácidos do segmento S4 (Milescu et al, 2007; Swartz & MacKinnon, 1997b; Takahashi et al, 2000).

Na família das *kappa-toxinas*, as toxinas κ -hefutoxin 1 e Ocy8 apresentam propriedades biofísicas e eletrofisiológicas interessantes. Ambas apresentam um retardo na constante de tempo ou “*time constant*” (definida como o tempo que leva para que a membrana altere 63% da voltagem final) e uma independência de voltagem no bloqueio da corrente dos subtipos de $K_V1.1$ e $K_V1.3$. Experimentos de interação competitiva entre a κ -hefutoxin 1 e a toxina

bloqueadora do poro, Agitoxin-2 (AgTx2, do escorpião *Leiurus quinquestriatus hebraeus*), demonstraram que seus sítios de ligação estão completamente sobrepostos e, dessa forma, permitem afirmar que a κ -hefutoxin 1 bloqueia o poro do canal e, ao mesmo tempo modula sua cinética. No entanto, como os valores de $V_{1/2}$ não foram alterados, os autores sugerem que a toxina estabiliza o canal em um estado conformacional de repouso, que é mantido independentemente do valor de voltagem da membrana (Camargos et al, 2011; Garcia et al, 1994; Gopalakrishnakone et al, 2002)

Também já se têm descrito na literatura toxinas de anêmonas do mar que atuam como moduladoras da cinética de *ativação* de diferentes subtipos de K_V . As toxinas BDS I e BDS II, da anêmona *Anemonia sulcata*, atuam bloqueando subtipos da subfamília K_{V3} (Diocot et al, 1998) e a APETx1, da *Anthopleura elegantissima*, atua em *hERG* (Diocot et al, 2003). Para ambas as toxinas, a energia necessária para a *ativação* do canal é maior e, no caso específico da BDS II, experimentos envolvendo mutagênese do segmento S3, comprovaram sua interação com o *domínio sensor de voltagem*, sugerindo que assim como a HaTx, estas toxinas atuam bloqueando a corrente dos íon K^+ , através da modulação da cinética de *ativação* do canal (Diocot et al, 2003; Yeung et al, 2005).

Medidas eletrofisiológicas da AbeTx1 em solução com alta concentração de K^+ (HK-ND96) demonstraram que a entrada da corrente dos íons K^+ (*inward current*) em direção ao meio intracelular ocorreu entre -40 e 0 mV, ao passo que a corrente do meio intracelular para o meio extracelular (*outward current*) se deu em valores de voltagem positivos. O potencial de reversão dos íons K^+ (E_K) não sofreu alteração, porém mesmo aplicando-se concentrações de AbeTx1 capazes de bloquear 50% da corrente dos canais presentes na membrana, a porcentagem de bloqueio observada à -20 mV é de aproximadamente 30%, o que nos permite concluir que a AbeTx1 e os íons K^+ não estão competindo pelo mesmo sítio de ligação, ou seja, AbeTx1 não está causando uma obstrução física do poro que bloquearia a passagem dos íons K^+ (Figura 16).

Dessa forma, para se determinar o possível sítio de ligação da AbeTx1 com o $K_v1.1$, os seguintes experimentos foram realizados. Após a aplicação de AbeTx1 (3 μ M), os ovócitos foram lavados e observou-se a restauração da corrente, pois a toxina se liga ao canal por meio de interações com os aminoácidos que estão no meio extracelular (o mesmo foi observado para a BcsTx4) (Figura 16 e Figura 23). Posteriormente, para determinar se a inibição da corrente ocorre durante o estado aberto ou fechado do canal, aplicou-se AbeTx1 (3 μ M) à solução onde os ovócitos estavam com sua membrana mantida a -90 mV e, após 2 min os ovócitos foram despolarizados à 0 mV. Neste experimento observou-se $82,00 \pm 2,65\%$ de bloqueio da corrente após a imediata despolarização da membrana, indicando que a AbeTx1 interage com o canal no estado fechado, sugerindo que os aminoácidos envolvidos na sua interação estão sempre acessíveis/expostos ao meio extracelular da membrana (Figura 17). De modo semelhante ao observado para a AbeTx1, a toxina SGTx1, moduladora do $K_v2.1$, também é capaz de bloquear a corrente dos íons K^+ quando o canal se encontra no estado fechado, pois se liga aos aminoácidos da alça extracelular de ligação entre os segmentos S3 e S4 (Lee et al, 2004). A ShK (da anêmona do mar *Stichodactyla helianthus*) também é capaz de bloquear a corrente do $K_v1.3$ quando este se encontra no estado fechado, porém esta toxina é uma bloqueadora do poro do canal e ensaios de mutação sítio dirigida já comprovaram que a Lys25 interage com os aminoácidos do *Filtro de Seletividade*. Dessa forma, podemos concluir que caso a AbeTx1 interaja com os aminoácidos do *Filtro de Seletividade*, esta interação é secundária e não causa grande alteração na potência da toxina.

Experimentos de interação competitiva também foram realizados para ajudar na elucidação do mecanismo de ação e do sítio de ligação da AbeTx1. O raciocínio lógico utilizado para a realização dos experimentos de interação competitiva entre AbeTx1 e o TEA foi: caso estas duas toxinas atuem através do mesmo mecanismo de ação e seus sítios de ligação sejam parcial ou totalmente sobrepostos, os efeitos da concentração de cada uma das toxinas na inibição da corrente de íons K^+ será igual. Se o efeito observado for superior ao esperado, ou seja, se ocorrer uma potencialização da inibição da corrente

dos íons K^+ após a aplicação conjunta das toxinas, será por que estas atuam em sítios de ligação distintos e/ou seus mecanismos de ação são diferentes.

Primeiramente, aplicou-se TEA (200 μ M), o que causou um bloqueio de $52,20 \pm 1,74\%$ da corrente dos íons K^+ . Posteriormente, aplicou-se uma mistura de TEA (200 μ M) e AbeTx1 (600 nM), resultando em um bloqueio total de $71,20 \pm 2,18\%$ (Figura 16). Este resultado indica que o TEA e a AbeTx1 não têm os mesmos sítios de ligação. Como o TEA se liga ao aminoácido tirosina (Y) do *Filtro de Seletividade* dos canais da subfamília *Shaker* (K_V1) (Heginbotham & MacKinnon, 1992), pode-se afirmar que AbeTx1 não está interagindo com os aminoácidos do poro do $K_V1.1$ e nos permite concluir que AbeTx1 não causa o bloqueio da corrente dos íons K^+ através de uma obstrução física do poro. Resultados semelhantes foram obtidos quando Swartz & MacKinnon (1997) estudaram a interação competitiva entre a HaTx e a Agitoxin-2 (AgTx2), permitindo a estes autores concluir que há no canal $K_V2.1$ mais de um sítio de ligação para ambas as toxinas e que estes sítios não são sobrepostos (Swartz & MacKinnon, 1997a).

2.6. Interação da AbeTx1 e BcsTx4 com os subtipos de $K_V1.2$ e $K_V1.6$

A caracterização eletrofisiológica da interação da AbeTx1 e BcsTx4 com os subtipos de $K_V1.2$ e $K_V1.6$ demonstrou que não há uma modulação na dependência de voltagem de abertura do canal. A relação entre a corrente em função da voltagem, em solução com alta concentração de K^+ , mostrou que a condutividade do íon K^+ foi alterada após a ligação das toxinas, permitindo inferir que os íons K^+ e as toxinas estão competindo pelo mesmo sítio de ligação. A inibição da corrente dos subtipos de $K_V1.2$ e $K_V1.6$ são dependentes de concentração da toxina, porém não apresentam dependência de voltagem e o bloqueio da corrente pode ser revertido após a lavagem, sugerindo que as toxinas se ligam na região extracelular do canal (Figura 18, Figura 19 e Figura 24).

A aplicação conjunta de AbeTx1 e TEA para a realização de experimentos de interação competitiva no $K_V1.6$ comprovaram que quando se aplica AbeTx1 (120 μM) obtém-se $51,50 \pm 0,65\%$ de bloqueio da corrente. Posteriormente, quando se aplica uma mistura de AbeTx1 (120 μM) e TEA (920 μM), o bloqueio da corrente é de $55,33 \pm 2,47\%$ (Figura 19), permitindo concluir que a AbeTx1 atua como uma bloqueadora da passagem dos íons K^+ , através da obstrução física do poro do canal. Ensaio de interação competitiva entre a AbeTx1 e a BcsTx4 também foram realizados no subtipo de $K_V1.6$. Primeiramente, aplicou-se AbeTx1 (120 nM), obtendo-se $49,00 \pm 1,37\%$ do bloqueio da corrente dos íons K^+ . A seguir, foi aplicada uma solução contendo AbeTx1 (120 nM) e BcsTx4 (250 μM), resultando em um bloqueio de $57,67 \pm 1,67\%$ (Figura 24) permitindo concluir que as duas toxinas têm seus sítios de ligação sobrepostos e que ambas se ligam aos aminoácidos do *Filtro de seletividade* ou próximos a esta região.

No subtipo de $K_V1.2$ não foram realizados experimentos de interação competitiva, pois o valor de IC_{50} do TEA é em torno de 5 mM, o que torna o pH da solução muito ácido para a realização das medidas eletrofisiológicas. No entanto, na presença de AbeTx1 e BcsTx4, a relação entre a voltagem e a corrente, a reversibilidade da ligação e, a independência de voltagem no bloqueio da corrente dos íons K^+ sugerem que também são toxinas bloqueadoras da passagem dos íons K^+ , através da obstrução física do poro do canal.

2.7. Relação entre a estrutura da AbeTx1 e o bloqueio da corrente dos subtipos de K_V

Com a finalidade de se compreender a seletividade e a potência da toxina AbeTx1, foram realizados experimentos eletrofisiológicos com seis mutantes, cada qual substituindo um dos resíduos de aminoácido básico (Lisina ou Arginina) por um com carga neutra (Alanina). O raciocínio lógico para a escolha dos mutantes se deu com base nos estudos que vêm sendo realizados com toxinas que atuam junto aos diferentes subtipos de K_V da

subfamília *Shaker*. Além dos aminoácidos da “díade funcional” (no caso de toxinas que a possuem), um conjunto de aminoácidos básicos está envolvido com a seletividade e potência das toxinas. Por exemplo, na *Charybdotoxin*, a Lys27 e a Tyr36 formam a “díade funcional” e, adicionalmente, os resíduos básicos Lys11, Arg25 e Arg31 também estão interagindo com o canal. Outro exemplo é a toxina Pi1, do escorpião *Pandinus imperator*, cuja “díade funcional” (Lys24 e Tyr33) não é essencial para o bloqueio da corrente do K_V , uma vez que os aminoácidos básicos (Arg5, Arg12, Arg28 e Lys31) que circundam a díade são por si só suficientemente capazes de bloquear o canal (Mouhat et al, 2004b). Dessa forma, como na estrutura primária da AbeTx1 não há aminoácidos hidrofóbicos/aromáticos, postulou-se que a interação do canal se dá através de uma interação multipontual formada pelos aminoácidos básicos.

Os dados eletrofisiológicos sugerem que a toxina AbeTx1 interage com o $K_V1.1$ através de uma modulação da cinética de *ativação* e, o resultado da interação dos mutantes com o canal permitem inferir que a substituição da Lisina na posição três (K3A), da K7A e, da Arginina na posição onze (R11A) causam uma grande diminuição na potência da toxina (entre 28 e 45 vezes), enquanto que os outros mutantes (R1A, R9A e K13A) causam uma menor perda de afinidade (entre 3 e 10 vezes). Porém, ainda assim, todos os resíduos de aminoácidos básicos estão envolvidos no bloqueio da corrente dos íons K^+ (Figura 20 e Tabela 4). Os aminoácidos do $K_V1.1$ envolvidos nesta interação ainda estão sendo caracterizados, uma vez que AbeTx1 é a primeira toxina de anêmona do mar moduladora de um subtipo de K_V da subfamília *Shaker* e, por isso, requer uma certa cautela na interpretação dos resultados da interação entre o canal e a AbeTx1.

Interessantemente, todas os mutantes causaram uma perda significativa da potência com que a AbeTx1 se liga ao subtipo de $K_V1.2$. Quando aplicada AbeTx1 natural (3 μ M), observa-se um bloqueio de $85,33 \pm 1,45$ % da corrente dos íons K^+ . No entanto, todos os mutantes, quando testados em uma concentração dez vezes maior (30 μ M), não foram capazes de bloquear nem ao menos 15% da corrente do $K_V1.2$ (Figura 20 e Tabela 4). Essa concentração

testada (30 μ M) equivale a aproximadamente 200 vezes o valor da IC_{50} da AbeTx1 natural (167,36 \pm 38,58 nM) e, por isso, curvas de dose-resposta não foram realizadas. Porém, ainda assim é possível concluir que a contribuição de cada um dos resíduos básicos é equitativa para a potência da AbeTx1.

No subtipo de $K_V1.6$, todos os mutantes também causaram uma perda na potência da toxina, sendo que a substituição da Lisina, na posição três, por uma Alanina (K3A), causou uma diminuição da potência de aproximadamente 156 vezes. Já as substituições R1A e R9A causaram uma moderada diminuição na potência da AbeTx1 (aproximadamente 30 e 20 vezes, respectivamente) (Figura 20 e Tabela 4). As demais substituições alteraram a potência, porém com uma pequena diferença (menor que oito vezes).

Estes resultados nos permitem afirmar que a toxina AbeTx1 interage com os diferentes subtipos de K_V através de um conjunto de aminoácidos básicos que conferem uma carga superficial eletrostática positiva à toxina. Consequentemente, a AbeTx1 é atraída pela superfície eletrostática do canal que é carregada negativamente, resultando em uma alta afinidade e potência, se comparada às outras toxinas da família das “*kappa-toxinas*”.

2.8. Análise comparativa e evolutiva da AbeTx1 e BcsTx4

Juntamente com a enorme diversidade molecular e funcional dos canais voltagem – dependentes de K^+ , uma impressionante diversidade estrutural de toxinas animais tem sido descoberta. Estas toxinas peptídicas têm evoluído ao longo do tempo, em distintos motivos estruturais, adaptando-se a diferentes estratégias para o bloqueio da corrente dos íons K^+ . As toxinas que atuam em K_V têm entre 17 e 60 aminoácidos, que estão conectados por entre duas e até quatro pontes dissulfeto e, são classificadas em oito diferentes tipos, de acordo com suas estruturas secundárias. Podendo ser formadas somente por fitas β ou α hélices, ou ainda uma mistura de fitas β e α hélices (Mouhat et al, 2004a).

Os membros da família das “*kappa-toxinas*” já foram isolados e caracterizados da peçonha de diversas espécies de moluscos do gênero

Conus, escorpiões e de anêmonas do mar (presente trabalho). Possuem entre 17 e 28 aminoácidos e duas pontes dissulfeto, que formam um padrão de conectividade C1 – C4 e C2 – C3. O número de aminoácidos entre as Cisteínas é variável, tendo como consenso a seguinte sequência estrutural: $X_{1-6}CX_{2-3}CX_{4-11}CX_{3-6}CX_{1-6}$, onde X pode ser qualquer aminoácido. Sua estrutura arquitetônica é formada por duas α hélices antiparalelas, denominadas de “*helical hairpin-like motif*” (Chagot et al, 2005b; Gopalakrishnakone et al, 2002; Moller et al, 2005).

A presença dessas toxinas em diferentes Filos sugere uma divergência evolutiva a partir de um ancestral comum, uma vez que proteínas e peptídeos encontrados nas peçonhas são consequências de eventos de recrutamento, nos quais o gene de uma proteína envolvida em um processo regulatório/fisiológico do animal é duplicado e, então, o novo gene passa a ser seletivamente expresso na glândula/célula/tecido produtor da peçonha (Fry et al, 2009). No entanto, também sugerem uma convergência funcional, uma vez que estas toxinas possuem diferentes sequências de aminoácidos, com baixa similaridade estrutural, mas que ainda assim são capazes de atuar em diferentes subtipos de canais voltagem – dependentes de K^+ .

3. Conclusão

Em resumo, podemos concluir que as toxinas AbeTx1 e BcsTx4 são membros de um novo tipo de toxinas de anêmonas do mar que atuam em K_V , com um motivo estrutural semelhante ao das “*kappa-toxinas*”. Estas toxinas apresentam diferentes mecanismos para o bloqueio da corrente dos canais voltagem – dependentes de K^+ e, por isso, servirão como ferramentas para o estudo da estrutura dos subtipos de K_V da subfamília *Shaker*.

Capítulo 2

Biochemical and electrophysiological characterization of two sea anemone Type 1 potassium toxins from a geographically distant population of *Bunodosoma caissarum*

Diego J.B. Orts, Steve Peigneur, Bruno Madio, Juliana S. Cassoli, Gabriela G. Montandon, Adriano M. C. Pimenta, José E.P.W. Bicudo, José C. Freitas, André J. Zaharenko and Jan Tytgat

Marine Drugs (2013)

Abstract: Sea anemone (Cnidaria, Anthozoa) venom is an important source of bioactive compounds used as tools to study the pharmacology and structure-function of voltage-gated K⁺ channels (K_V). These neurotoxins can be divided into four different types, according to their structure and mode of action. In this work, for the first time, two toxins were purified from the venom of *Bunodosoma caissarum* population from Saint Peter and Saint Paul Archipelago, Brazil. Sequence alignment and phylogenetic analysis reveals that BcsTx1 and BcsTx2 are the newest members of the sea anemone type 1 potassium channel toxins. Their functional characterization was performed by means of a wide electrophysiological screening on 12 different subtypes of K_V channels (K_V1.1–K_V1.6; K_V2.1; K_V3.1; K_V4.2; K_V4.3; hERG and *Shaker* IR). BcsTx1 shows a high affinity for rKv1.2 over rKv1.6, hKv1.3, *Shaker* IR, and rKv1.1, while Bcstx2 potently blocked rKv1.6 over hKv1.3, rKv1.1, *Shaker* IR, and rKv1.2. Furthermore, we also report for the first time a venom composition and biological activity comparison between two geographically distant populations of sea anemones.

Keywords: sea anemone; *Bunodosoma caissarum*; neurotoxins; voltage-gated potassium channels; two-electrode voltage-clamp; *Xenopus laevis*; intraspecific venom variation; Saint Peter and Saint Paul Archipelago

1. Introduction

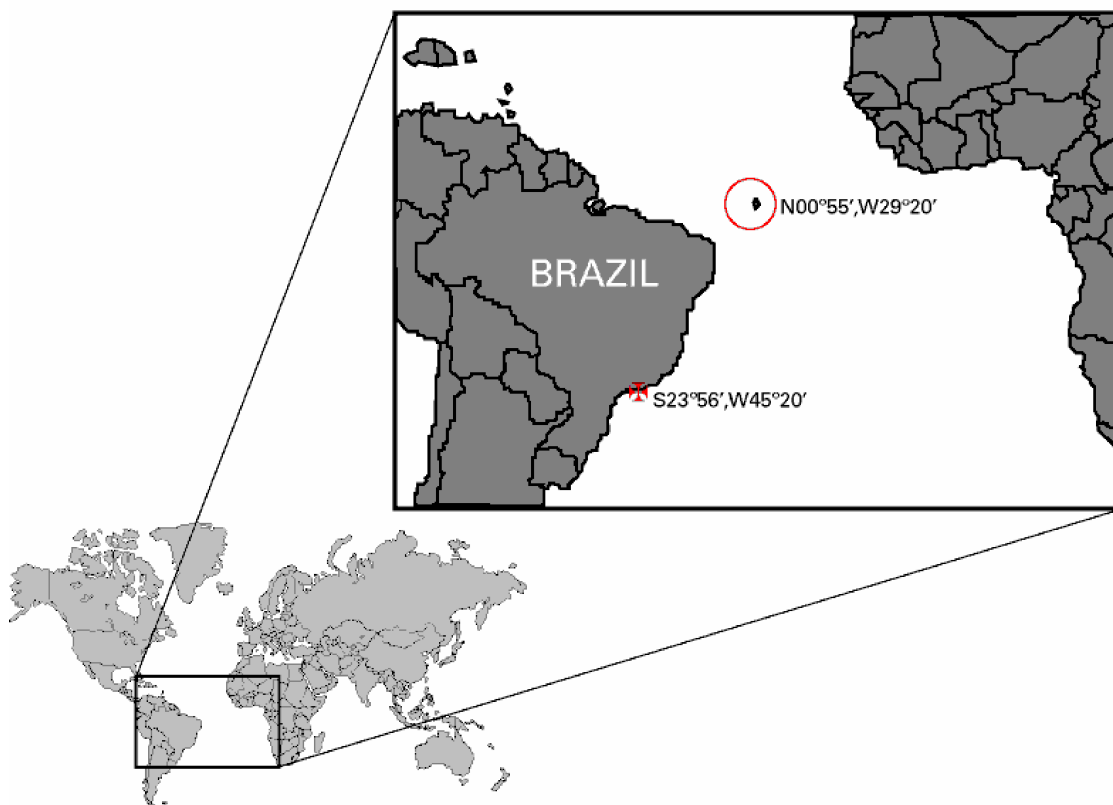
As the most ancient venomous animals on Earth, cnidarians (classes Anthozoa, Scyphozoa, Cubozoa and Hydrozoa) have evolved a large amount of pore-forming toxins, phospholipases A₂, protease inhibitors, neurotoxins and toxic secondary metabolites (Castaneda & Harvey, 2009; Fenical, 1987; Kristan et al, 2009; Lassen et al, 2010; Nevalainen et al, 2004; Tibballs, 2006). The biological and ecological roles of these toxins present in cnidarians venom are (1) immobilization and death of the prey, (2) defense against predators, and (3) intra- and interspecific competition (Bak & Borsboom, 1984; Bakus et al, 1986; Coll et al, 1982; Honma et al, 2005; Sheppard, 1979). Sea anemones (Anthozoa, Actiniaria) are a well-known pharmacological source of a large number of neurotoxins acting upon a diverse panel of ion channels, such as voltage-gated sodium and potassium channels. Toxins that target sodium channels are the best-studied group with more than 100 described toxins (Moran et al, 2009); however, no more than 20 potassium channel toxins have been characterized (Yamaguchi et al, 2010).

Despite of the small number of neurotoxins which have been characterized up to date, potassium channel toxins are valuable tools for the investigation of the physiology, pharmacology, biochemistry and structure-function of K⁺ channels; the largest and most diverse family of ion channels. Among the K⁺ channel family, 15 subfamilies can be subdivided, according to their structure and function (Hille, 2001). Of these different subfamilies, the voltage-gated potassium channel (K_v) subfamily represents one of them, and have an essential role in repolarizing the membrane after the initiation of an action potential (Armstrong & Hille, 1998). They are also involved in physiological processes such as regulation of heart rate, neuronal excitability, muscle contraction, neurotransmitter release, insulin secretion, Ca²⁺ signaling, cellular proliferation and migration, and cell volume regulation (Coetzee et al, 1999; Gutman et al, 2005).

Sea anemone K_V channel toxins can be divided into 4 structural classes according to structural differences and activity profile. Type 1 toxins inhibit *Shaker*-related K_V channel currents by a 'functional dyad' directly interacting with the channel pore. These toxins were purified from the venom of sea anemones belonging to the *Actiniidae*, *Hormathiidae*, *Thalassianthidae* and *Stichodactylidae* families (Yamaguchi et al, 2010); and were exclusively characterized on mammalian K_V channels, using T lymphocytes native currents, competitive binding experiments against ^{125}I -dendrotoxins and different transfection cell expression systems (Diochot & Lazdunski, 2009; Honma & Shiomi, 2006). Therefore, the biological meaning for the expression of these neurotoxins present in sea anemone venoms still remains unknown.

The sea anemone *Bunodosoma caissarum* (Corrêa, 1964) (Belém, 1988) is an endemic Brazilian species, and can be found along the entire coastline and some oceanic islands (Belém, 1988; Zamponi et al, 1998). Saint Peter and Saint Paul Archipelago (SPSPA; N00°55', W29°20') is densely populated by this species, which is mostly found attached to the lower mid-littoral as well as infra-littoral (Amaral et al, 2000). In this study, we report for the first time the characterization of the 'neurotoxic fraction' from the venom of *B. caissarum* SPSPA population, and under the same experimental conditions, we compare it to the population found in the State of São Paulo littoral (Southeast coast of Brazil; S23°56', W45°20') (Figure 27). Furthermore, we present the purification, biochemical analyses and electrophysiological characterization of two new type 1 sea anemone toxins as well as, their relationship with other known toxins based on sequence, structural, and evolutionary analyses.

Figure 27 – Map showing the geographic localization of the collection sites of *B. caissarum* populations used in this study. The red circle indicates Saint Peter and Saint Paul Archipelago (SPSPA) location at the North Atlantic Ocean (0°55'N; 29°20'W). The red cross indicates Southeast coast of Brazil (São Sebastião beach – S23°56', W45°20'), more than 4,000 km distant from the SPSPA.



2. Experimental Section

2.1. Sea anemone Collection, Venom Isolation and Neurotoxins Purification

Specimens of the sea anemone *Bunodosoma caissarum* (3.5 – 4.0 cm of diameter) were collected at the Saint Peter and Saint Paul Archipelago (N00°55', W29°20'), Brazil. The sea anemones were maintained in aquarium for 24 h, and then the venom was obtained by electrical stimulation of animals, according to the method of Malpezzi *et al.*(1993) (Malpezzi et al, 1993). The venom was fractionated first by gel-filtration chromatography using a Sephadex G-50 column (1.9 × 131 cm, GE Healthcare) and afterwards the fraction containing the neurotoxic peptides was submitted to Reverse-Phase HPLC chromatography in an ÄKTA Purifier system (GE Healthcare), using a semi preparative CAPCELL PAK C-18 column (1 × 25 cm, Shiseido Corp.). Elution was done in a linear gradient from 10 to 50% of acetonitrile containing 0.1% TFA at a flow rate of 2.5 mL/min, during 35 min, and the peptides were monitored at UV 214 nm. Pure BcsTx1 and BcsTx2 were obtained using an

analytical CAPCELL PAK C-18 column (0.46 x 15 cm, Shiseido Corp.), and different gradients of the solvent described above, at a flow rate of 1 mL/min. The protein content of the pure peptides was estimated by the BCA method (Pierce, USA).

2.2. Mass Spectrometry Analysis

Mass spectrometry analyses were performed on an Ultraflex II TOF/TOF MALDI (Bruker Daltonics) equipped with Nd-YAG Smartbeam laser (MLN 202, LTB), under reflectron mode. The laser frequency was adjusted to 50 Hertz. Matrix, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (Sigma-Aldrich Co.), was prepared at a concentration of 20 mg/ml in 1:1 acetonitrile containing 0.1% TFA solution. External calibration was performed using peptide calibration standard II (Bruker Daltonics). Sample solution (1 μ l) dropped onto the MALDI sample plate was added to the matrix solution (1 μ l) and dried at room temperature. Data were analyzed using FlexAnalysis 3.0 program (Bruker Daltonics).

2.3. Amino acid sequence determination

Samples of the native peptides (BcsTx1 and BcsTx2) (50–200 pmol) were sequenced by Edman degradation using the automated PPSQ-33A protein sequencers (Shimadzu - Kyoto, Japan) coupled to reverse phase separation of PTH-amino acids on a WAKOSIL-PTH (4.6 x 250 mm) column (Wako, Osaka, Japan), according to the manufacturer's instructions

2.4. Expression of voltage-gated ion channels in Xenopus laevis oocytes

Stage V–VI of *X. laevis* oocytes were harvested by partial ovariectomy under anesthesia (3-aminobenzoic acid ethyl ester methanesulfonate salt, 0.5 g/L from Sigma). The oocytes were defolliculated for 2 h by treatment with 2 mg/mL collagenase (Sigma) in Ca²⁺ free ND96 solution (in mM: 96 NaCl; 2 KCl; 1 MgCl₂; 5 HEPES adjusted pH 7.4). For the expression of K_V channels (K_V1.1-1.6, K_V2.1, K_V3.1, K_V4.2, K_V4.3, *h*ERG, and the insect channel *Shaker* IR),

the linearized plasmids were transcribed using the T7 or SP6 mMessage-mMachine transcription kit (Ambion). Oocytes were injected with 50 nL of cRNA at a concentration of 1 ng/nL using a microinjector (Drummond Scientific). The oocytes were maintained in a ND96 solution (in mM: 96 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 2 MgCl₂, and 5 HEPES; adjusted pH 7.4), supplemented with 50 µg/mL gentamicin sulfate.

2.4.1. Electrophysiological recordings

Two-electrode voltage-clamp recordings were performed at room temperature (18–22°C) using a Geneclamp 500 amplifier (Molecular Devices) controlled by a pClamp data acquisition system (Axon Instruments, Union City, CA, USA). Whole-cell currents from oocytes were recorded from 1 to 3 days after injection. Bath solution was the same ND96 solution described above. Voltage and current electrodes were filled with 3 M KCl. Resistances of both electrodes were kept between 0.8 and 1.0 ΩM. The elicited currents were filtered at 500 Hz using a four-pole lowpass Bessel filter. Leak subtraction was performed using a $-P/4$ protocol. K_V1.1-K_V1.6 and *Shaker* IR currents were evoked by 500 ms depolarizations to 0 mV followed by a 500 ms pulse to – 50 mV, from a holding potential of –90 mV. Current traces of *hERG* channels were elicited by applying a + 40 mV prepulse for 2 s followed by a step to – 120 mV for 2s. K_V3.1, K_V 4.2 and K_V4.3 currents were elicited by 500 ms pulses to +20 mV from a holding potential of – 90 mV. To assess the concentration-response relationships, data were fitted with the Hill equation:

$$[y = 100/[1 + (EC50/[toxin])^h] \quad (1)$$

where y is the amplitude of the toxin-induced effect, EC_{50} is the toxin concentration at half maximal efficacy, $[toxin]$ is the toxin concentration, and h is the Hill coefficient. In order to investigate the current-voltage relationship, current traces were evoked by 10 mV depolarization steps from a holding potential of -90 mV. The activation curves were fitted with a Boltzmann relationship of the form:

$$[1 / 1 + e^{-(V - V_{1/2})/S}] \quad (2)$$

$V_{1/2}$ is the voltage for half-maximal activation and s is the slope factor. The activation kinetics was obtained by mono-exponential fits to the raw current traces.

2.5. Phylogenetic Analysis and Sequence Alignment

The functional dendrogram reported here was constructed using the *Neighbor-joining* method (Saitou & Nei, 1987) of the publicly available software MEGA4 (Tamura et al, 2007). A multiple sequence alignment of BcsTx1 and 2 and sea anemone type 1 voltage-gated potassium channel toxins was done with ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>). Sequences analyzed were that of Aek (=Swiss-Prot # P81897) from the venom of the sea anemone *Actinia equine* (Minagawa et al, 1998); AETX-K (=Swiss-Prot # Q0EAE5) from *Anemonia erythraea* (Hasegawa et al, 2006); AsKs (=Swiss-Prot # Q9TWG1), from *Anemonia sulcata* (Schweitz et al, 1995); ; Bgk (=Swiss-Prot # P29186) from *Bunodosoma granulifera* (Cotton et al, 1997); HmK (=Swiss-Prot # O16846) from *Radianthus magnifica* (Gendeh et al, 1997); κ 1.3-SHTX-Sha1a (=Genbank#AB595205) from *Stichodactyla haddoni* (Honma et al, 2008; Yamaguchi et al, 2010); κ 1.3-TLTX-Ca1a (=Genbank#AB595207) (*Cryptodendrum adhaesivum*), κ 1.3-TLTX-Hh1a (=Genbank#AB595208) (*Heterodactyla hemprichi*), κ 1.3-SHTX-Sg1a (=Genbank#AB595204) (*Stichodactyla gigantean*), κ 1.3-SHTX-Sm1a (=Genbank AB595206) (*Stichodactyla mertensii*) and, κ 1.3-TLTX-Ta1a (=Genbank# AB595209) (*Thalassianthus aster*) (Yamaguchi et al, 2010); ShK (=Swiss-Prot#P29187) from *Stichodactyla helianthus* (Castaneda et al, 1995); FK724096, FK755121, FK747792 from *Anemonia viridis* (Sabourault et al, 2009) and FC850067 from *Metridium senile*. The tree shown is a bootstrap consensus based upon 1000 replications of the *Neighbor-joining* algorithm with Poisson correction. Numbers are bootstrap percentages.

2.6. Structure Computational Modeling

3D-structures of *B. caissarum* toxins were modeled using the publicly available program MODELLER9v10 (Sali & Blundell, 1993). BcsTx1 and 2 were modeled using as template BgK, a voltage-gated potassium channel toxin from the venom of the sea anemones *Bunodosoma granulifera* (PDB code: 1BGK). Models were refined based on predicted secondary structure using SCRATCH Protein Predictor (Cheng et al, 2005) and PROCHECK (Laskowski et al, 1993).

2.7. Statistical Assessment

Comparison of two sample means was made using a paired Student's *t* test ($P < 0.05$). All data represent at least three independent experiments ($n \geq 3$) and are presented as mean \pm standard error. All data were analyzed using Clampfit 10.3 (Molecular Devices) and Origin 7.5 software (Origin Lab.).

3. Results and Discussion

3.1. Venom Purification and Biochemical Characterization of BcsTx1 and BcsTx2

Sea anemone venom extraction by electric stimulus provides a massive release of proteins, peptides and low molecular weight compounds from the nematocysts (Malpezzi et al, 1993; Zaharenko et al, 2008; Zaharenko et al, 2011). When this toxic mixture is applied to a Sephadex G-50 gel-filtration column, the peptide content of the venom is separated from enzymes, such as phospholipases and cytolysin (Anderluh & Macek, 2002; Lagos et al, 2001; Martins et al, 2009). Gel filtration of *B. caissarum* venom on Sephadex G-50 yielded five fractions named Fraction I to V (FrI – FrV) (Figure 28A), as previously described for the venom of *B. cangicum* (Lagos et al, 2001) and *B. caissarum* population from the Southeastern coast of Brazil (Oliveira et al, 2004). Gel-filtration fraction III (FrIII) from *B. caissarum* SPSPA population had the highest neurotoxicity when tested on swimming crabs (*Callinectes danae*) (data not shown), and it was further purified by reverse-phase high performance liquid chromatography (rp-HPLC) (Figure 28B). Elution peaks, labeled as 1 and 2 (Figure 2B) were able to fully block the insect channel *Shaker* IR, and thus were subjected to a second purification step leading to the pure toxins BcsTx1 and BcsTx2 (Figure 28C and 28D). MALDI–TOF measurements of BcsTx1 and 2 generated an *m/z* data of 4151.91 and 3914.521, respectively (Figure 28E and 28F). These experimental masses correspond well with the theoretical molecular masses of 4151.93 Da of BcsTx1 and 3914.80 Da for BcsTx2.

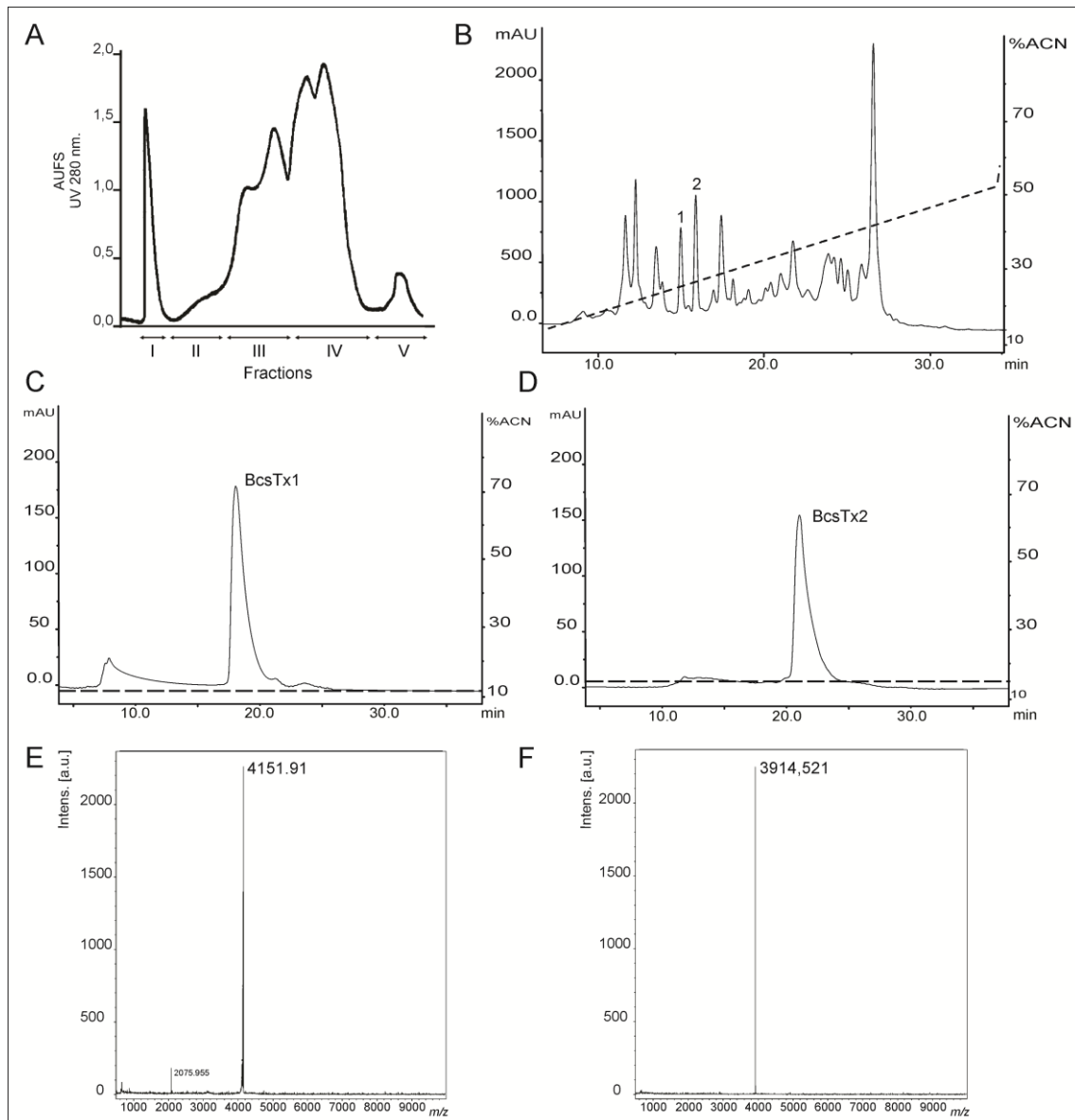


Figure 28 – Isolation, purification and characterization of *B. caissarum* venom. (A) Gel-filtration chromatography of *B. caissarum* venom. Approximately 3.0 g of venom was injected into a Sephadex G-50 column and the fractions were eluted with 0.1 M ammonium acetate buffer (pH 7.0). Fractions I to V were collected during UV (280 nm) monitoring. (B) rp-HPLC chromatogram of fraction III resulting from gel-filtration. The peptides from FrIII were eluted as described under ‘*Experimental Section*’. Peaks labeled (1 and 2) were subjected to a second C18 rp-HPLC chromatography. (C) Peak 1 (BcsTx1) was purified on an analytical C18 column using an isocratic condition of 13% of acetonitrile containing 0.1% TFA. (D) Purification of peak 2 (BcsTx2) using an isocratic condition of 16% of acetonitrile containing 0.1% TFA. (E) Mass measurement of

purified BcsTx1 determined by MALDI-TOF, indicating a m/z of 2075,955 ($z = 2$) and 4151.91 ($z = 1$). (F) Mass spectrometry profile of purified BcsTx2 (m/z 3914.521).

Interestingly, the venom of *B. caissarum* population from the Southeastern coast of Brazil shows hemolytic activity, and one Actinoporin, named Bcs I, had been purified and biochemically characterized (de Oliveira et al, 2006; Malpezzi & Freitas, 1991). However, neither the whole venom, nor the fraction II (FrII) of SPSPA population (Figure 28A) showed cytolytic activity when tested on erythrocytes (data not shown). Up to date, cytolytic peptides have been found in all classes of cnidarians and, more than 32 species of sea anemones have been reported to produce lethal cytolytic peptides (Anderluh & Macek, 2002; Anderluh et al, 2011). Also, it has been shown that one species of sea anemone (e.g. *Actinia equina*) can produce more than one isoform, while others are devoid of any cytolytic activity (e.g. *Anemonia viridis*) (Anderluh et al, 1999; Anderluh & Macek, 2002). Also, the incidence of cytolytic activity in corals (Anthozoa and Hydrozoa) is high, resembling the sea anemones where cytolytic peptides are widespread (Anderluh et al, 2011). Gunthorpe and colleagues compared the bioactivity of aqueous extracts of scleractinian corals (Cnidaria, Anthozoa, Hexacorallia) from different families and concluded that the occurrence of cytolytic activity do not differ significantly among the genera and the species considered, except for the extracts of colonies of *Goniastrea australensis*, where intraspecific differences were found (Gunthorpe & Cameron, 1990).

The rp-HPLC profile of fraction III (FrIII) of the SPSPA *B. caissarum* population yielded a very similar profile to that from the Southeastern coast of Brazil (Oliveira et al, 2006), suggesting that both populations releases a similar pattern of neurotoxic peptides (Figure 29). Until now, only two toxins from *B. caissarum* venom have been investigated: (i) BcIII that belongs to type 1 neurotoxins and bind at the site 3 of the voltage-gated sodium channel (Na_v), delaying the inactivation process (Oliveira et al, 2004), and (ii) BcIV, which does not have its exact target determined yet. However, experiments using crab leg

sensory nerve suggest a Na_V -activity (Oliveira et al, 2006). A superimposition of both rp-HPLC profiles of 'neurotoxic fractions' from *B. caissarum* populations allows us to point out the following: (1) SPSPA sea anemone population has a BcIII-like toxin, and (2) at the same retention time of BcIV no elution peak is observed on the chromatographic profile of the SPSPA population. To our knowledge, such a degree of intraspecific variation in the peptide composition of sea anemone venom is novel.

Moran and colleagues (Moran & Gurevitz, 2006; Moran et al, 2008) analyzed the evolution of a voltage-gated Na^+ channel neurotoxin genes family from three genetically and geographically distinct populations of the sea anemone *Nematostella vectensis* (Darling et al, 2004; Reitzel et al, 2008) and, from single specimens of *Actinia equina* and *Anemonia viridis*. Genomic data indicated much higher similarity among toxin genes within each species than to toxin genes of other species, suggesting that related neurotoxin genes family in sea anemones are subjected to a concerted evolution (Nei & Rooney, 2005). The authors also demonstrated that evolution driven by positive Darwinian selection would have occurred, as observed by the numerous substitutions in the putative neurotoxin genes from *A. equina* and *A. viridis*.

Intraspecific diversity in the venom composition of various animal species, such as cone snails (Duda et al, 2009; Jakubowski et al, 2005), bees (Ferreira Junior et al, 2010), ants (Brand et al, 1973; Deslippe & Guo, 2000), spiders (Binford, 2001; Herzig et al, 2002), scorpions (Abdel-Rahman et al, 2009; Newton et al, 2007) and snakes (Gibbs et al, 2009; Nunez et al, 2009) have been report using biochemical, pharmacological, proteomic and/or transcriptomic approaches. Abdel-Rahman and colleagues (Abdel-Rahman et al, 2011) used a combination of proteomic and biochemical assays to examine variations in the venom composition of the vermivorous *Conus vexillum* taken from two distinct geographical locations and concluded that the venom is highly diversified. Moreover, has been reported intraspecific variation in the peptides present in the venom from two species of fish-hunting cone snails (*C. striatus* and *C. catus*). However, the venom compositions of individual snails of both species remained quite constant over time in captivity (Jakubowski et al, 2005).

In contrast, proteomic analyzes of the venom of several specimens of a piscivorous cone snail (*C. consors*) revealed dramatic variations over time, which could be related to dynamics of peptide production by the secretory epithelium in the venom gland (Dutertre et al, 2010).

Similarly to cone snails, it has been shown venom variability in specimens of *Tityus serrulatus* scorpion, collected within the same geographical area. Specimens showed venom constituent variations, which were related to extraction events and, to dynamics in gland production and peptide maturation (Kalapothakis & Chavez-Olortegui, 1997; Pimenta et al, 2003). Furthermore, investigation of intraspecific venom variation of four different populations of *Scorpio maurus palmatus* from geographically distant locations revealed highly significant differences among all populations and within each population studied. This may be due to geographic differential distribution of prey species, as well as their relative abundance in the environment (Abdel-Rahman, 2008; Abdel-Rahman et al, 2009). Also, it has been demonstrated that ontogenetic variation of viperid snakes (Chordata, Reptilia, Viperidae) venoms could be related to differences between the feeding habits of juvenile and adult snakes. Suggesting that variation in venom composition may reflect natural selection for greater efficiency in killing and digesting different prey types within the same location or in different locations (Andrade & Abe, 1999; Daltry et al, 1996; MacKessy et al, 2003).

Thus, the relationship between geographic distance and patterns of venom composition implicates spatial scale and localized ecological and genetic factors, such as gender, elapsed time after capture, dynamic expression of the gland and peptide maturation, genetic variation, environmental conditions, seasonality, and geographical locations. In the current work, these factors were not standardized (except for venom collection and sea anemone size, presuming a similar age of specimens of each population) and, additional studies will be necessary in order to assess more precisely these variations in venom composition, and to enhance our understanding of the forces driving sea anemone venom evolution.

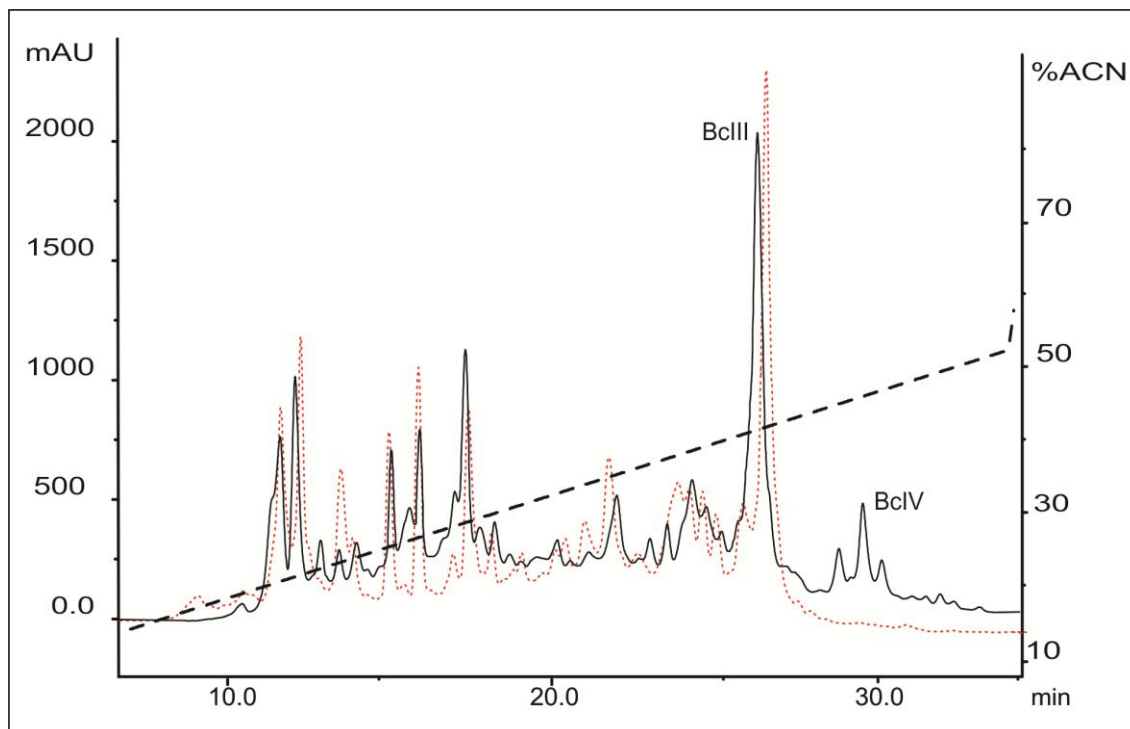


Figure 29 – Comparison of the ‘*neurotoxic fraction*’ (FrIII) from two populations of the sea anemone *B. caissarum*: Southeastern coast of Brazil and Saint Peter and Saint Paul Archipelago. The black continuous line represents the rp-HPLC profile of FrIII from the Southeastern coast population. Labeled peaks were the previously characterized neurotoxins BcIII (Oliveira et al, 2004) and BcIV (Oliveira et al, 2006). Red dotted line is the FrIII chromatographic profile of the SPSPA population. ‘*Neurotoxic fractions*’ were submitted to rp-HPLC chromatography, using a semi preparative CAPCELL PAK C-18 column (1 × 25 cm, Shiseido Corp.), and their components were eluted with a linear gradient from 10 to 60% of acetonitrile containing 0.1% TFA, as described in the ‘*Experimental Section*’.

3.2. Amino Acid Sequences and Phylogenetic Analysis

The native and non-reduced toxins were directly sequenced by automated Edman degradation, which gave unequivocal amino acid sequences. Cysteines were assumed as blank cycles. Sequences similarity indicated that BcsTx1 and 2 are new members of the type 1 sea anemone toxins, acting on voltage-gated potassium channels (K_v), which also include the peptides BgK

(*Bunodosoma granulifera*) (Cotton et al, 1997); ShK (*Stichodactyla helianthus*) (Castaneda et al, 1995); HmK (*Heteractis magnifica*) (Gendeh et al, 1997); AsKS (*Anemonia viridis*) (Schweitz et al, 1995); AeK (*Actinia equina*) (Minagawa et al, 1998); AETxK (*A. erythraea*) (Hasegawa et al, 2006); κ 1.3-SHTX-Sha1a (*S. haddonii*), κ 1.3-TLTX-Ca1a (*Cryptodendrum adhaesivum*), κ 1.3-TLTX-Hh1a (*Heterodactyla hemprichi*), κ 1.3-SHTX-Sg1a (*S. gigantean*), κ 1.3-SHTX-Sm1a (*S. mertensii*), κ 1.3-TLTX-Ta1a (*Thalassianthus aster*) (Yamaguchi et al, 2010), FC850067 (*Metridium senile*), FK724096, FK755121 and FK747792 (*Anemonia viridis*) (Sabourault et al, 2009) (Figure 30A). The sequences reported as FC850067, FK724096, FK755121, FK747792 are the Expressed Sequence Tags (ESTs) accession numbers of deduced mature peptide sequences from translated nucleotides of the above mentioned species.

Members of the type 1 have 35–38 amino acid residues and three disulfide bridges are paired as C1–C6, C2–C4, C3–C5, by similarity. Toxins are moderately conserved, all sharing 39.5–100% sequence similarity and thus can be further divided into subtype 1a, which has four amino acids between the second and third Cys residues from the N-terminus and, subtype 1b with eight amino acids (Hasegawa et al, 2006; Yamaguchi et al, 2010). BcsTx1 and 2, together with toxins BgK (from *B. granulifera*), AsKs (*Anemonia viridis*), AeK (*Actinia equina*) and, the four sequences of the mature portions of the putative toxins (from *A. viridis* and *Metridium senile*) are members of subtype 1b toxins (Figure 33B). Subtype 1a is composed by nine toxins (HmK, AETX-K, ShK, κ 1.3-SHTX-Sha1a, κ 1.3-TLTX-Ca1a, κ 1.3-TLTX-Hh1a, κ 1.3-SHTX-Sg1a, κ 1.3-SHTX-Sm1a and κ 1.3-TLTX-Ta1a) that share more than 80% sequence identity with one another (Figure 30B). Type 1 toxins block potassium currents of *Shaker* and *Shaw* subfamilies of K_V channels, and also block the intermediate conductance calcium-activated K^+ channels; and they can differ markedly in potency or selectivity (Castaneda & Harvey, 2009). Moreover, all peptides possess a conserved functional core composed of a key basic residue (Lysine) associated with a $6.6 \pm 1 \text{ \AA}$ distant key aromatic residue (Tyrosine) (Dauplais et al, 1997). The side chain of the Lysine residue enters the ion channel pore and is surrounded by four Asparagine residues of the selective filter of the channel. The key aromatic residue will interact through both electrostatic forces and

hydrogen bonding with a cluster of aromatic residues in the P-loop region (Pennington et al, 1995b; Sabatier et al, 2004a).

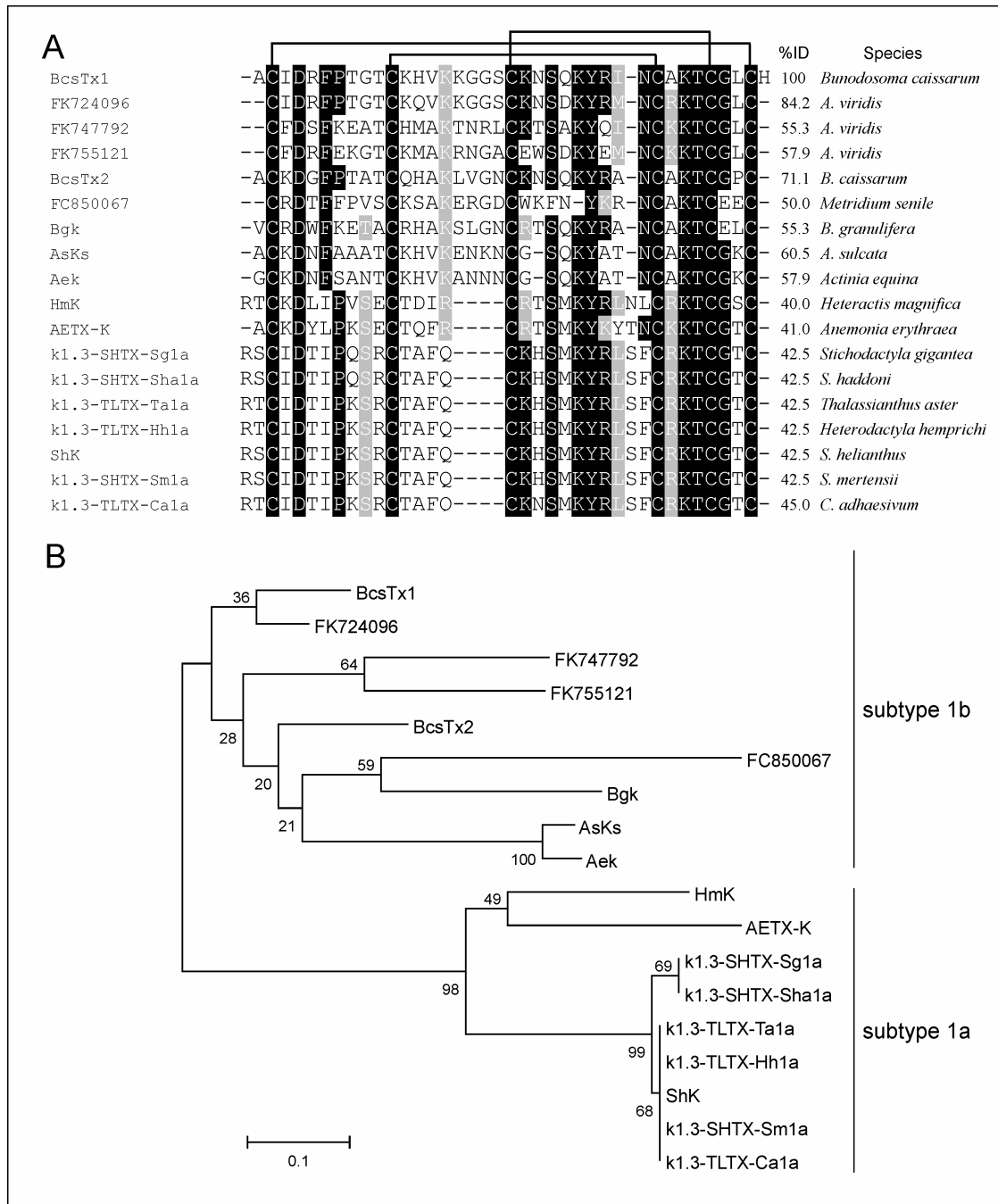


Figure 30 – Phylogenetic Analysis and Sequence Alignment. (A) Amino acid sequence of BcsTx1 and BcsTx2 and multiple sequence alignment with the other members of type 1 sea anemone toxins. Alignment was based on the cysteine residues. Disulfide bridge pattern are indicated. Amino acid identities (black boxes) and similarity (grey boxes) are shown. (B) The phylogenetic tree

of type 1 sea anemone K_V -toxins was constructed with the *Neighbor-joining* algorithm of MEGA 4.0. The consensus tree shown supports the suggested division of sea anemone type 1 into two different subtypes. The scale bar shows amino acid substitution rates. Only the mature region of the sequences reported as FC850067, FK724096, FK755121 and FK747792 were used in the analysis.

Interestingly, type 1 sea anemone toxins could be classified as belonging to the six-cysteine (SXC) protein domain, whose first members were identified in surface coat components of the dog ascaridid *Toxocara canis* (Nematoda, Secernentea) and, later has also been identified in many additional nematodes (Gems et al, 1995; Gems & Maizels, 1996). This domain is composed of short (36 to 42 amino acids) peptides, with six conserved cysteines, that can be found in many parasitic nematodes, such as *Ascaris suum* and *Necator americanus* (Blaxter, 1998). The physiological role of these peptides has not been established yet; however it is believed that they might interfere with the local and systemic immune system, and with gut muscles of the host (Daub et al, 2000). As already mentioned, sea anemone type 1 toxins possess a conserved '*functional dyad*' motif, which is not universally present in nematodes (Figure 31). However, if we observe the basic and aromatic residues (Lysine and Phenylalanine) of the putative protein from *Ascaris suum*, we might suggest a possible K_V channel blocker activity. Thus, considering that throughout evolution, proteins found in venoms are the result of toxin recruitment events in which a protein gene involved in a regulatory process is duplicated and the new gene is selectively expressed in the venom apparatus (Fry et al, 2009), we may suppose that the existence of SXC domain in different phyla reflect their common ancestry.

		%ID	Specie
BcsTx1	ACIDREPTGTCCKHVKKGGSCKNS----QKYRI-----NCAKTCGLCH	100	<i>B. caissarum</i>
BcsTx2	ACKDGFPTATCQHAKLVGNCKNS----QKYRA-----NCAKTCGPC	71.1	<i>B. caissarum</i>
FP964166	VCRDQSPTSNCLSWKSNNGFCKED---YSKLY-----CEKTCGFC	39.5	<i>Clytia hemisphaerica</i>
BQ529521	-CKDRSPTAMCLRHKSVGRCTGDNGDWTSLMKMN----CRKTCEFC	34.9	<i>N. brasiliensis</i>
BM281246	-CKDYFPSGLCSVEKYSNGCNKG---NLKFH-----CTKTCGRC	42.1	<i>Ascaris suum</i>
BG734468	-CVDRAPTAVCENIKRKHDCKGP---MEMTAQ----MCCQKTCNLC	37.5	<i>Necator americanus</i>
GE626467	-CRDRIPQNVCEQMKNNGNCDDPR--MSTIAE----LCCPKTCGKC	39.0	<i>N. americanus</i>
FP995933	ACRDRDPEATTCCHAGKLGKCC--SE--EAHIER-----CEMTCGKC	43.6	<i>Pleurobrachia pileus</i>

Figure 31 – Alignment. Amino acid sequences of BcsTx1 and BcsTx2 were aligned with part of the mature portion of the putative proteins from *Ascaris suum* (Nematoda, Secernentea) (GenBank # BM281246), *Necator americanus* (Nematoda, Rhabditea) (GenBank # BG734468 and GE626467), and *Nippostrongylus brasiliensis* (Nematoda, Secernentea) (GenBank # BQ529521) after conducting a Blast homology search of the Expressed Sequence Tags (ESTs) on databases.

3.3. BcsTx1 and BcsTx2 Pharmacological Profiles

Sequence alignment and phylogenetic analysis (Figure 30A and 30B) indicated that BcsTx1 and 2 are new members of the type 1 (subtype 1b) toxins from sea anemones that are known to be potent inhibitors of K_V channels. The pharmacological profile of BcsTx1 and 2 were determined on a wide range of twelve K_V channels (rK_V1.1, rK_V1.2, hK_V1.3, rK_V1.4, rK_V1.5, rK_V1.6, rK_V2.1, rK_V3.1, rK_V4.2, rK_V4.3, hERG, and the insect channel *Shaker* IR; r: rat and h: human). Channels were expressed in *X. laevis* oocytes and their currents were recorded by using two-electrode voltage-clamp technique. BcsTx1 (0.5 μ M) inhibited rK_V1.1, rK_V1.2, rK_V1.3, rK_V1.6 and *Shaker* IR channels with $44 \pm 2\%$, 100%, 100%, $88 \pm 3\%$ and $64 \pm 4\%$, respectively (Figure 32). BcsTx2 (3 μ M) showed effect on potassium currents inhibiting $96 \pm 2,1\%$, 100%, 100%, $98 \pm 1,75\%$ and $94 \pm 2\%$ of rK_V1.1, rK_V1.2, hK_V1.3, rK_V1.6 and *Shaker* IR, respectively (Figure 33). Type 1 toxins, such as BgK and ShK, have been extensively characterized. BgK was found to block K_V1.1-3 and K_V1.6 channels with potencies in the nanomolar range (Cotton et al, 1997). ShK was originally found to block K_V1.3 channels (Pennington et al, 1995a; Pennington et al, 1995b), but also blocks K_V1.1-4 and K_V1.6 (Castaneda et al, 1995; Kalman et al, 1998); and more recently it has been found that ShK shows activity against K_V3.2 channels (Yan et al, 2005). Both BgK and ShK block intermediate conductance K(Ca) channels (Rauer et al, 1999). Some of the other type 1 toxins were indirectly assayed by competitive inhibition of the binding of ¹²⁵I-dendrotoxins, allowing conclusion that they will show activity on K_V1.1, K_V1.2 and/or K_V1.6, since dendrotoxins only block the current of these K_V channels. The AsKs toxin has been characterized as a blocker of K_V1.2 current expressed

in *Xenopus* oocytes and, no biological activity has been reported to FC850067, FK724096, FK755121 and FK747792 (Gendeh et al, 1997; Hasegawa et al, 2006; Minagawa et al, 1998; Schweitz et al, 1995; Yamaguchi et al, 2010). Thus, it is worth mentioning that our work represents the first electrophysiological characterization of type 1 sea anemone toxin activity on cloned *Shaker* IR insect channel.