

**Neurotoxinas de anêmonas do mar como
ferramentas para o estudo da fisiologia de canais
voltagem – dependentes de potássio**

Sea anemones neurotoxins as tools to study the physiology of
voltage-gated potassium channels.

Diego Jose Belato y Orts

São Paulo

2013

Diego Jose Belato y Orts

**SEA ANEMONES NEUROTOXINS AS TOOLS TO STUDY THE
PHYSIOLOGY OF VOLTAGE-GATED POTASSIUM CHANNELS**

Neurotoxinas de anêmonas do mar como ferramentas para o estudo da
fisiologia de canais voltagem – dependentes de potássio.

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção do Título de
Mestre em Ciências, na Área de
Fisiologia Geral.

Orientadores:

José Carlos de Freitas
(Fevereiro de 2010 a Fevereiro de 2011)

José Eduardo Pereira Wilken Bicudo
(Fevereiro de 2011 a Fevereiro de 2013)

São Paulo

2013

Diego Jose Belato y Orts

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Orts, Diego Jose Belato

Neurotoxinas de anêmonas do mar como ferramentas para o estudo da fisiologia de canais voltagem – dependentes de potássio / Diego Jose Belato Orts ; orientador José Eduardo Pereira Wilken Bicudo. – São Paulo, 2013.

92 f.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia Geral.

1. Toxinologia. 2. Anêmonas do mar. 3. Neurotoxinas. 4. Canais voltagem – dependentes de K^+ . I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia Geral.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. José Eduardo Pereira Wilken Bicudo

Prof. Dr.

Prof. Dr.

***“A Universidade é um local onde se ensina
porque se pesquisa***

Carlos Chagas Filho

Gostaria de agradecer aos meus pais, por acreditarem que a educação e a cultura são essenciais para o desenvolvimento de uma sociedade e, em especial, para o crescimento de seus filhos. Agradeço pelas inúmeras situações em que eles foram altruístas, privando-se de bens e consumo, pois acreditavam que valia mais a pena investir no futuro de um cidadão. Se não fosse por eles, teria sido impossível ter a oportunidade, neste momento, de agradecer às inúmeras pessoas que fizeram e ainda fazem parte da minha vida pessoal e acadêmica! Agradeço também ao meu irmão e aos meus familiares por sempre terem me apoiado e contribuído para o meu desenvolvimento.

Agradeço à minha querida companheira, Luana Valente Senise, que esteve presente comigo em todos esses anos. Sempre me apoiando e aconselhando-me nos vários momentos delicados. Agradeço por compreender a importância que a minha ausência teria para o meu crescimento profissional e para o nosso crescimento pessoal. Peço desculpas pelas noites mal dormidas e pelos momentos de impaciência! Sem dúvida a tua constante presença foi responsável por grandes melhorias na minha vida.

Agradeço ao professor José Carlos de Freitas por ter me dado à oportunidade de trabalhar em seu laboratório e, ao prof. José Eduardo Pereira Wilken Bícudo, por ter aceitado a minha orientação em 2012, quando o prof. Freitas passou por uma série de problemas pessoais que o impossibilitaram de continuar trabalhando. Agradeço imensamente pela confiança que o prof. Bícudo depositou em mim e, pelos conselhos em momentos difíceis! Sem dúvida, muitos destes ensinamentos foram importantes para o meu crescimento pessoal e serão úteis ao longo da minha vida acadêmica.

Agradeço ao Mestre Bruno Madio que teve uma contribuição intelectual muito relevante para o desenvolvimento

do meu Mestrado. As intermináveis conversas, propostas de projeto e delineamentos experimentais nunca serão esquecidos. Sou grato também pela sua sincera amizade, algo que em minha opinião é muito difícil de encontrar no meio acadêmico.

Agradeço à Dr^a. Juliana Silva Cassoli e Dr^a. Camila Takeno Cologna por terem me ajudado ao longo desses anos e pelas várias noitadas regadas a muita cerveja belga, que nunca serão esquecidas. Agradeço também ao Steve Peigneur e Beatriz García Mille por todo suporte ao longo da minha estadia em Leuven e, obviamente, pela amizade que se formou!

Agradeço ao Eduardo, da Tesouraria do Instituto de Biociências, pelas inúmeras dicas que com certeza me ajudaram e, evitaram que eu me afundasse em um labirinto burocrático. À Sr^a. Cristine e Sr^a. Yoco, da Administração do IB, por terem me ajudado em todo o trâmite envolvido na compra dos reagentes que foram utilizados ao longo da minha estadia na Bélgica. Agradeço também ao Diretor do IB, o prof. Carlos Eduardo Falavigna da Rocha, por ter acreditado na qualidade do meu projeto de pesquisa e, ter financiado grande parte da compra dos reagentes necessários.

Agradeço à Roseli, secretária do Programa de Pós-graduação em Fisiologia, por sempre ter me ajudado em tudo o que eu precisei e, ao então coordenador da Pós-graduação, prof. José Guilherme Chauí-Berlínck por ter me dado todo o suporte necessário durante o processo de alteração da minha orientação, sempre zelando para que eu não fosse academicamente prejudicado.

Por fim, agradeço aos meus amigos de longa data e, às amizades que se formaram ao longo desses anos. Uma vida social é essencial para a sanidade mental de um pós-graduando!

Índice

1. Introdução	1
1. Canais iônicos	2
1.1. Canais iônicos dependentes de voltagem.....	3
1.1.1. Descoberta dos canais voltagem – dependentes	3
1.1.2. Estrutura dos canais voltagem – dependentes	6
1.1.3. Teoria evolutiva dos canais voltagem – dependentes	9
1.1.4. Fisiologia dos canais voltagem – dependentes	10
1.2. Canais voltagem – dependentes de K ⁺	11
1.2.1. Classificação e distribuição	11
1.2.2. Cinética de ativação e inativação e seletividade iônica	15
1.2.3. Farmacologia e Importância médica (“Canalopatias”)	27
1.3. Canais voltagem – dependentes de K ⁺ são alvos biológicos de neurotoxinas animais	30
1.4. Anêmonas do mar – Aspectos ecológicos, fisiológicos e evolutivos ...	31
1.5. Composição do veneno das anêmonas do mar	32
1.5.1. Neurotoxinas – Importância, seletividade e mecanismos de ação	33
1.5.2. Toxinas que atuam em canais voltagem – dependentes de K ⁺	34
1. Conclusões	41
2. Resumo	133
3. Abstract	137
4. Referências	139

1. Introdução

1. Canais iônicos

A membrana celular de eucariotos consiste de um mosaico de lipídios, carboidratos e proteínas. As proteínas são o segundo maior constituinte, sendo classificadas como periféricas e integrais. As proteínas integrais, também conhecidas como transmembrana, possuem uma região hidrofóbica e outra hidrofílica. Cada região possui uma composição de aminoácidos e uma estrutura secundária característica, permitindo sua interação, através de ligações não covalentes, com a membrana plasmática, tanto em sua porção hidrofílica, quanto hidrofóbica (Hill et al, 2012a).

Cinco tipos funcionais de proteínas transmembrana são encontrados: canais, transportadoras (carreadoras), enzimas, receptores e proteínas estruturais. Os canais iônicos permitem a passagem de íons, presentes em soluções aquosas, pelo processo de difusão, seguindo seu gradiente elétrico e químico através da membrana. Este mecanismo de transporte se faz necessário, uma vez que a membrana plasmática possui um caráter hidrofóbico em seu interior, impossibilitando que solutos hidrofílicos a atravessem (Hill et al, 2012a).

Do ponto de vista estrutural, estes canais iônicos são constituídos de uma ou mais proteínas que atravessam a membrana, formando uma região central, denominada de poro. Este permite a passagem seletiva de diferentes íons, como consequência de uma alteração de sua conformação causada por um estímulo, que aumenta ou diminui a sua permeabilidade. De acordo com o mecanismo de *ativação* do canal, estes são classificados em: (1) canais que se abrem em resposta ao estiramento, (2) canais controlados por proteínas cinases, (3) canais com mecanismo de abertura e fechamento controlado por um ligante e (4) canais voltagem – dependentes (Hill et al, 2012b).

1.1. Canais iônicos dependentes de voltagem

1.1.1. Descoberta dos canais voltagem – dependentes

Em meados dos anos 1950, em uma série de artigos, Hodgkin e Huxley definiram as três principais características biofísicas envolvidas com a geração e a propagação do potencial de ação: ativação dependente de voltagem, seletividade iônica e a permeabilidade mediada pelo movimento. No entanto, na época, não se sabia da existência dos canais iônicos e, portanto, os autores caracterizaram a permeabilidade como sendo uma consequência do movimento de alguns componentes da membrana, que se comportam como se tivessem uma grande carga, ou um momento dipolo orientado pela diferença de voltagem da membrana (Armstrong & Hille, 1998; Hodgkin & Huxley, 1952a; Hodgkin & Huxley, 1952b; Hodgkin & Huxley, 1952c; Hodgkin et al, 1949).

As primeiras evidências de como seria a estrutura destes componentes de membrana (canais iônicos) surgiram em 1959, quando Mullins propôs que a membrana celular possuía poros que somente permitiam a passagem de íons após sua desidratação, sendo a seletividade iônica uma consequência da diferença em seus raios atômicos (Mullins, 1959). Posteriormente, novas evidências apoiaram esta hipótese e demonstrou-se que a força eletrostática do *Filtro de Seletividade* do canal e a termodinâmica do sistema também eram importantes para a seletividade (Bezanilla, 2008; Bezanilla & Armstrong, 1972; Eisenman & Dani, 1987; Noskov et al, 2004)

Em 1964, Narahashi e colaboradores caracterizaram a tetrodotoxina (TTX) como uma toxina que bloqueia especificamente a corrente dos íons Na^+ (Narahashi et al, 1964). Posteriormente, com a descoberta que o cátion tetraetilamônio (TEA) era capaz de bloquear somente a corrente dos íons K^+ , confirmou-se a proposição inicial de que a condutividade dos íons Na^+ e K^+ ocorre por meio de diferentes componentes (canais iônicos) presentes na membrana (Armstrong & Binstock, 1965; Tasaki & Hagiwar, 1957).

Durante a década de 1970, experimentos eletrofisiológicos utilizando-se o TEA permitiram provar que os canais voltagem – dependentes de K^+ sofriam alterações em suas conformações mediadas pela diferença de voltagem. Uma vez que ao se substituir um dos grupos etil do TEA, o bloqueio da corrente somente ocorreu após a despolarização da membrana. Também se descreveu a competição direta entre o TEA e os íons K^+ , o que sugeria uma única região do canal que ao mesmo tempo era responsável pela seletividade e, pela passagem dos íons (posteriormente caracterizada como o *Filtro de Seletividade* do poro do canal) (Armstrong, 1971; Bezanilla, 2008; Bezanilla & Armstrong, 1972; Hille, 1975).

Apesar das evidências conduzirem a uma provável estrutura dos canais iônicos, a confirmação somente ocorreu em consequência do avanço das técnicas de biologia molecular, na década de 1980. A clonagem molecular permitiu caracterizar a sequência de aminoácidos dos canais iônicos, sendo que o primeiro a ser clonado foi o canal voltagem – dependente de Na^+ (Noda et al, 1984), seguido pela clonagem do canal voltagem – dependente de Ca^{2+} (Tanabe et al, 1987) e, posteriormente determinou-se a estrutura primária do canal voltagem – dependente de K^+ (Kamb et al, 1987; Papazian et al, 1987; Pongs et al, 1988).

A descoberta da sequência de aminoácidos permitiu a caracterização estrutural dos canais em seis segmentos transmembranares, sendo que os canais voltagem – dependentes de Na^+ e Ca^{2+} apresentavam quatro repetições (domínios) destes seis segmentos transmembranares (Noda et al, 1984; Tanabe et al, 1987). Por sua vez, o canal voltagem – dependente de K^+ é formado por quatro subunidades e, para que seu modelo estrutural fosse determinado, utilizou-se de técnicas biofísicas e eletrofisiológicas, com o auxílio de toxinas escorpiônicas que serviram como ferramentas experimentais (Christie et al, 1990; MacKinnon, 1991a; MacKinnon & Miller, 1989).

Com o aumento do número de sequências determinadas, começou-se a estudar a função de grupos de aminoácidos que eram conservados ao longo das diferentes sequências primárias. Para tal, experimentos envolvendo mutações sítio-dirigidas dos aminoácidos do segmento transmembrana S4

foram realizados, comprovando-se sua importância na abertura do canal em resposta à diferença de voltagem da membrana (Papazian et al, 1991; Stuhmer et al, 1989). Também foram realizados experimentos de mutação sítio-dirigida com o *Filtro de Seletividade*, para verificar sua importância na seletividade iônica (Garcia et al, 2001; Heginbotham et al, 1992; Heginbotham et al, 1994; Heginbotham & MacKinnon, 1992).

Outro aspecto relevante foi a utilização de toxinas peptídicas isoladas de escorpiões, aranhas, anêmonas do mar, serpentes, entre outros animais, que serviram de modelos para o estudo da estrutura e função dos canais voltagem – dependentes, permitindo a compreensão da funcionalidade das diferentes regiões do canal, suas subunidades e unidade auxiliares (Banks et al, 1979; Blatz & Magleby, 1986; Dolly et al, 1984; Jenkinson, 2006; Miller et al, 1985).

O acúmulo de evidências tornava o modelo proposto para os canais voltagem – dependente cada vez mais sólido, até que em 1998 determinou-se a primeira estrutura tridimensional de um canal de voltagem – dependente de K^+ (KcsA) com apenas dois segmentos transmembrana, isolado da bactéria *Streptomyces lividans* (Doyle et al, 1998). Posteriormente, outros canais iônicos tiveram suas estruturas determinadas: em 2002, Jiang e colaboradores determinaram a estrutura de um canal de K^+ ativado por Ca^{2+} (MthK) (Jiang et al, 2002a). Em 2003, determinou-se a estrutura de um canal (K_vAP) da bactéria *Aeropyrum pernix* (Jiang et al, 2003a) e em 2005 foi determinada a estrutura do subtipo de $K_v1.2$ de mamífero (Long et al, 2005a). Em 2007, determinou-se a estrutura de um canal quimérico, formado pelas subunidades de $K_v1.2$ e $K_v2.1$ (Long et al, 2007) e recentemente, a primeira estrutura do canal voltagem – dependente de Na^+ foi elucidada (Payandeh et al, 2011).

Contudo, pode-se afirmar que concomitantemente aos avanços das técnicas de experimentação biológica, novas descobertas foram sendo realizadas e, atualmente, dada a grande diversidade de canais já descritos e caracterizados, estes são classificados como membros de uma superfamília de proteínas, a qual inclui os canais voltagem – dependente de Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , canais ativados por nucleotídeos cíclicos e canais TRP (sigla de '*Transient Receptor Potential*') (Figura 1) (Yu & Catterall, 2004).

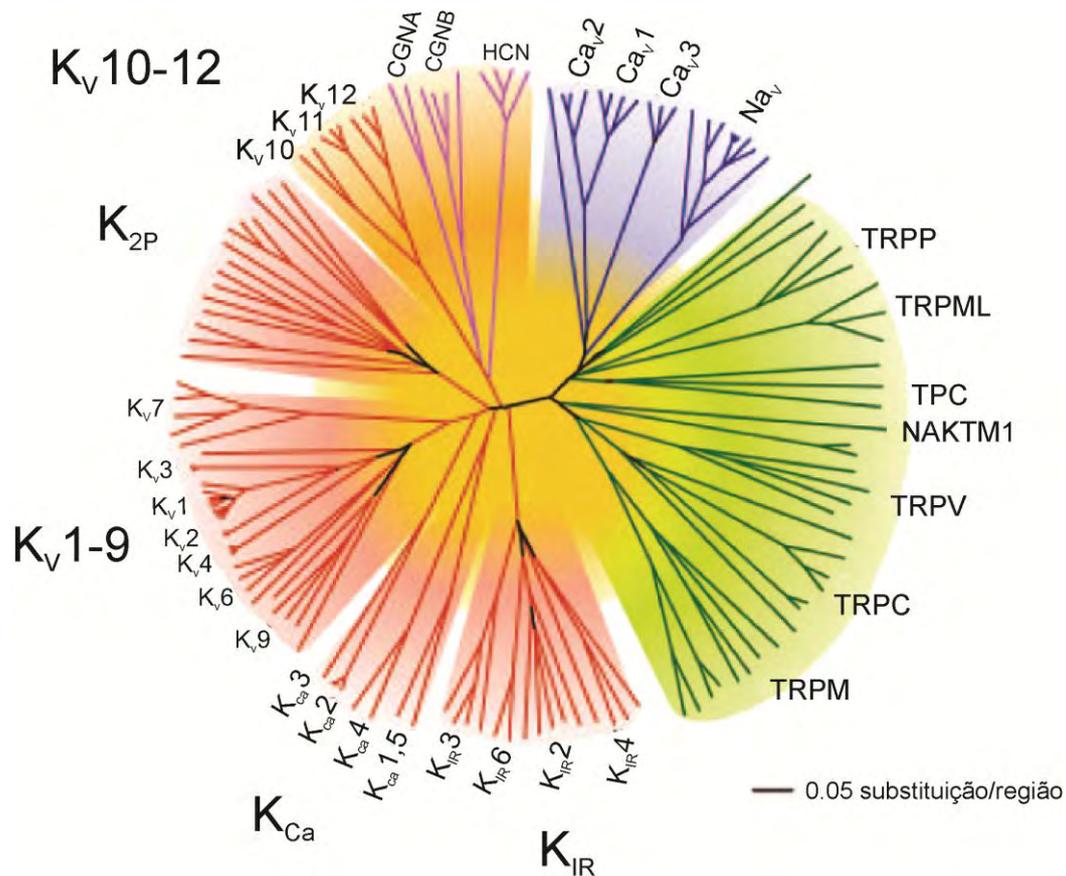


Figura 1 – Superfamília de canais iônicos. O dendograma representa 143 membros das diferentes famílias de canais iônicos. Os ramos em azul são representados pelos canais voltagem – dependentes de Na⁺ e Ca²⁺. Os ramos vermelhos indicam os canais seletivos para os íons K⁺. Em magenta estão os canais ativados por nucleotídeos cíclicos e em verde tem-se os diferentes “*Transient Receptor Potential*”. Figura modificada de Catterall e colaboradores (Catterall et al, 2005).

1.1.2. Estrutura dos canais voltagem – dependentes

Canais voltagem – dependentes de Na⁺, Ca²⁺ e K⁺ são membros de uma superfamília de proteínas integrais com uma arquitetura estrutural semelhante. Os canais voltagem – dependentes de Na⁺ e Ca²⁺ são compostos de uma única cadeia polipeptídica, denominada de α subunidade, responsável pela formação do poro do canal, a qual pode estar associada a diferentes subunidades auxiliares (Catterall, 1988). A α subunidade é composta por quatro

domínios homólogos (I – IV), sendo que cada domínio é formado por um núcleo estrutural (*'core motif'*) com seis segmentos transmembranares em α hélice (segmentos S1 a S6) (Kayano et al, 1988; Noda et al, 1984; Tanabe et al, 1987).

Por sua vez, os canais voltagem – dependentes de K^+ são tetrâmeros, ou seja, são formados por quatro proteínas (subunidades), cada qual contendo seis segmentos transmembranares em α hélice (S1–S6), que se ligam covalentemente para formar o canal. Esses canais podem também estar associados a diferentes subunidades auxiliares ($K_v\beta 1$ – $K_v\beta 3$) (Baumann et al, 1987; Kamb et al, 1987; Papazian et al, 1987).

As subunidades auxiliares possuem sequências primárias que não se assemelham à da subunidade principal (α subunidade), e são capazes de alterar as propriedades eletrofisiológicas e/ou biofísicas e os níveis e padrões de expressão dos canais voltagem – dependentes de Na^+ , Ca^{2+} e K^+ . Além disso, estes canais também podem interagir com proteínas adicionais, tais como enzimas reguladoras e os elementos do citoesqueleto (Isom et al, 1994).

Os segmentos S1 a S4 dos canais voltagem – dependentes formam o “*domínio sensor de voltagem*”, responsável por alterações de conformação estrutural que ocorrem em resposta às diferenças de voltagem da membrana (Catterall et al, 2005). O segmento S4 é considerado o principal segmento transmembrana do *sensor de voltagem*, sendo responsável pelo deslocamento de cargas positivas (“*gating charges*”) ao longo do campo elétrico transmembranar (Bezanilla, 2000).

Este segmento é composto por aminoácidos positivos (geralmente Arginina) e aminoácidos hidrofóbicos. A disposição repetitiva destes aminoácidos na cadeia peptídica (um aminoácido positivo, seguido de dois aminoácidos hidrofóbicos) confere uma estrutura secundária em α hélice, na qual as cadeias laterais dos aminoácidos positivos formam interações eletrostáticas com os aminoácidos negativos dos segmentos transmembranares S1, S2 e S3 (Catterall, 1988; Papazian et al, 1995; Tiwari-Woodruff et al, 1997).

Os segmentos S5 e S6 formam o “domínio do poro” do canal. Na alça de ligação entre os segmentos S5 e S6, tem-se a região do poro, também conhecida como “*P-region*”. Quando quatro “*P-regions*”, de cada uma das subunidades ou domínios dos canais voltagem – dependentes estão tridimensionalmente próximas, forma-se o poro por onde ocorre a passagem dos íons (Yellen, 1998). No entanto, a passagem dos íons é seletiva, uma vez que nesta região se encontram os aminoácidos do *Filtro de Seletividade*, além de outros que estão presentes nos segmentos S5 e S6, que também são importantes para a seletividade iônica (Figura 2) (Lopez et al, 1994; Ragsdale et al, 1994; Shieh & Kirsch, 1994).

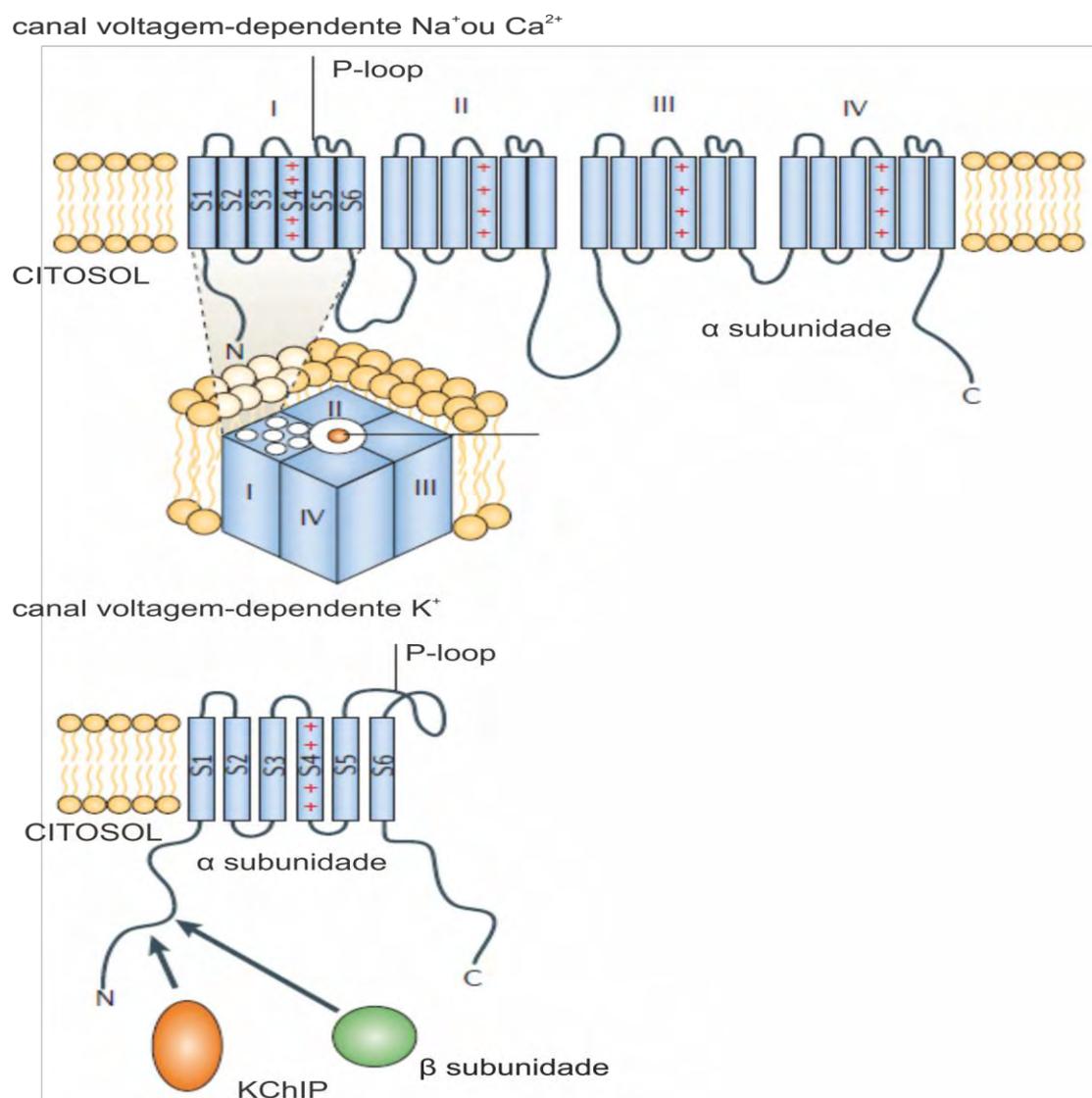


Figura 2 – Estrutura dos canais voltagem – dependentes de Na^+ , Ca^{2+} e K^+ . Os canais voltagem – dependentes de Na^+ e Ca^{2+} são formados por uma única cadeia polipeptídica com quatro domínios (I – IV), cada qual contendo seis segmentos transmembrana. O canal voltagem – dependente de K^+ (K_V) é formado por quatro subunidades, cada qual contendo seis segmentos transmembrana. Assim como os canais voltagem – dependentes de Na^+ e Ca^{2+} , o K_V pode estar associado a subunidades auxiliares (β subunidade ou KChIP). Figura modificada de (Lai & Jan, 2006).

1.1.3. Teoria evolutiva dos canais voltagem – dependentes

Dada à alta identidade da estrutura primária, principalmente na região do segmento S4 do *domínio sensor de voltagem* e, a grande similaridade estrutural entre os canais voltagem – dependentes de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} , postulou-se uma divergência evolutiva a partir de uma arquitetura estrutural ancestral em comum. Acredita-se que primeiramente surgiram os canais de voltagem – dependentes de K^+ , derivados de canais de K^+ ancestrais. Provavelmente, estes canais ancestrais eram semelhantes aos encontrados atualmente, desde bactérias até mamíferos, com apenas dois segmentos transmembranares em cada uma das quatro subunidades, os quais correspondem ao “*domínio do poro*” (segmentos S5 e S6) dos canais voltagem – dependentes com seis segmentos.

Acredita-se que este canal ancestral com apenas dois segmentos (que não era voltagem – dependente) se associou a outra proteína, a qual provavelmente era formada pelos segmentos S1 a S4, responsáveis pelo “*domínio sensor de voltagem*”. A partir daí, surgiram os canais voltagem – dependentes de K^+ e, a partir destes, surgiram os canais que possuem uma extensão de sua cadeia peptídica na região N-terminal, responsável pelo seu mecanismo de *inativação*, os canais de K^+ ativados por Ca^{2+} e os canais de K^+ ativados por nucleotídeos cíclicos presentes no citosol.

Acredita-se, também, que os canais voltagem – dependentes de Na^+ e Ca^{2+} evoluíram a partir dos canais de K^+ voltagem – dependentes, como consequência da duplicação gênica e sucessivas mutações, que resultaram em uma única proteína formada por quatro repetições (domínios I – IV) de seis segmentos transmembranares. Atualmente, os canais voltagem – dependentes de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} são membros da terceira maior superfamília de proteínas sinalizadoras presentes no genoma humano, estando atrás somente de proteínas cinases e receptores acoplados à proteína G (Anderson & Greenberg, 2001; Catterall et al, 2005; Hill et al, 2012c; Yu & Catterall, 2003)

1.1.4. Fisiologia dos canais voltagem – dependentes

Canais voltagem – dependentes de Na^+ e K^+ são responsáveis pela sinalização elétrica celular, estando envolvidos com a liberação de Ca^{2+} intracelular, sinapses elétricas, secreção hormonal de sinapses químicas, contração da musculatura, percepção do meio ambiente, além de muitas outras funções em células não excitáveis, tais como expressão gênica e divisão celular. Em suma, são os principais responsáveis pela geração e propagação do potencial de ação e, conseqüentemente, da integração do funcionamento do sistema nervoso (Ackerman & Clapham, 1997).

A geração do potencial de ação é o resultado da diferença de permeabilidade da membrana celular aos íons Na^+ e K^+ . Este fenômeno tem início quando ocorre uma mudança no potencial de repouso da membrana, capaz de gerar a abertura de canais voltagem – dependentes, permitindo, conseqüentemente, a passagem destes íons através da membrana plasmática.

Durante o potencial de ação, observa-se uma diferença na permeabilidade dos íons Na^+ e K^+ e, para se determinar o potencial de membrana (V_m) deve-se levar em consideração o fato da corrente total que flui através da membrana ser o resultado da soma das correntes iônicas individuais, como determinado pela equação de Goldman-Hodgkin-Katz:

$$V_m = \frac{RT}{zF} \ln \frac{P_K [K^+]_o + P_{Na} [Na^+]_o}{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i}$$

Onde, V_m é o potencial de membrana, R é a constante dos gases, T é a temperatura, z é a valência da carga do íon, F é a constante de Faraday, \ln , logaritmo na base 10, P_K e P_{Na} , permeabilidades dos íons K^+ e Na^+ , $[K^+]_o$ e $[Na^+]_o$, são as concentrações dos íons K^+ e Na^+ no meio extracelular e, $[K^+]_i$ e $[Na^+]_i$, são as concentrações dos íons K^+ e Na^+ no meio intracelular (Hodgkin & Huxley, 1952c).

Dessa forma, é possível observar diferentes fases do potencial de ação de acordo com a permeabilidade dos íons. Inicialmente, tem-se uma reversão do potencial de membrana, causada pelo aumento da permeabilidade dos íons Na^+ , em decorrência da abertura de canais voltagem – dependentes de Na^+ . Posteriormente, estes canais ficam inativados e, concomitantemente, ocorre à abertura tardia, por alguns milissegundos, dos canais voltagem – dependentes de K^+ . Aumentando a permeabilidade dos íons K^+ e restaurando o potencial de repouso da membrana (Hill et al, 2012c).

1.2. Canais voltagem – dependentes de K^+

1.2.1. Classificação e distribuição

Os canais de K^+ são responsáveis por aproximadamente 50% dos genes da superfamília de proteínas sinalizadoras, com mais de 80 membros já descritos. Estes são classificados em quatro tipos, de acordo com o número de segmentos transmembrana e o seu mecanismo de atuação: canais '*inwardly rectifying*', com dois segmentos transmembrana (K_{ir}), canais com dois poros e quatro segmentos transmembranares (K_{2P} ou "*leak channels*"), canais com seis segmentos transmembranares, ativados por Ca^{2+} (K_{Ca}), canais voltagem –

dependentes (K_V), que também são formados por seis segmentos transmembranares, e os canais com oito segmentos transmembranares e dois poros. Cada um destes tipos pode ser classificado em famílias e subdividido em subfamílias, cada qual contendo vários membros (subtipos) estritamente relacionados (Wulff et al, 2009).

Os primeiros estudos realizados com o genoma da popularmente conhecida mosca de fruta (*Drosophila melanogaster*) identificaram quatro diferentes subfamílias de canais voltagem – dependentes de K^+ : *Shaker* (K_V1), *Shab* (K_V2), *Shaw* (K_V3) e, *Shal* (K_V4) (Butler et al, 1989). Posteriormente, trabalhos realizados com o genoma de mamíferos permitiram a identificação de outras quatro subfamílias: K_V5 , K_V6 , K_V8 e K_V9 . Estas oito subfamílias são caracterizadas pela rápida cinética de ativação e são classificadas como pertencentes à família K_V . Outros subtipos de canais voltagem – dependentes também foram posteriormente caracterizados e classificados como pertencentes às famílias EAG, formada pelas subfamílias K_V10 , K_V11 e K_V12 , e família KQT, formada pela subfamília K_V7 (subtipos KCNQ1 – KCNQ5) (Figura 3) (Coetzee et al, 1999; Gutman et al, 2003).

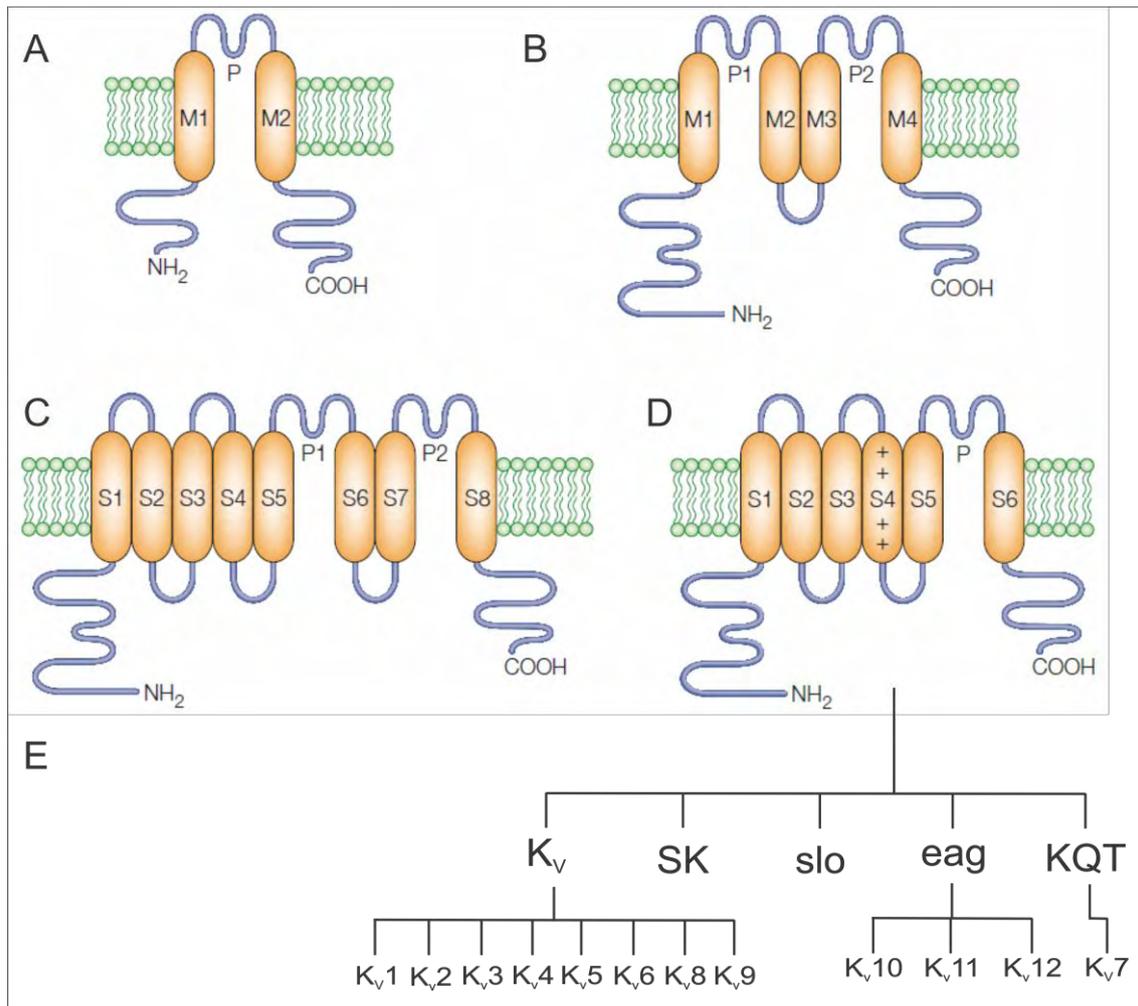


Figura 3 – Classificação dos canais seletivos para o íon K^+ . **A** – canais 'inwardly rectifying', com dois segmentos transmembrana (Kir). **B** – canais com dois poros e quatro segmentos transmembranares ($K2P$ ou "leak channels"), **C** – canais com oito segmentos transmembranares e dois poros. **D** – canais com seis segmentos transmembranares que podem ser ativados por Ca^{2+} (K_{Ca}) ou dependentes de voltagem (K_V). **E** – Subdivisão dos canais com seis segmentos transmembrana em cinco famílias: K_V , eag, KQT, SK e slo. As famílias SK e slo são formadas por canais ativados por Ca^{2+} , ao passo que as famílias K_V , eag e KQT são formadas por canais voltagem – dependentes (subfamílias de K_V1 – K_V12). Figura modificada de (Choe, 2002; Coetzee et al, 1999)

Devido à grande quantidade de famílias e subfamílias já caracterizadas, apresentaremos a seguir uma descrição mais detalhada a respeito de algumas

subfamílias pertencentes à família K_V , uma vez que estes canais constituem o foco da nossa investigação.

Subfamília Shaker (K_V1)

Já se têm descrito oito genes dentro desta subfamília, os quais correspondem aos subtipos de $K_V1.1$ a $K_V1.8$. No entanto, como estes podem formar complexos heterotetraméricos no sistema nervoso central, a diversidade de subtipos encontrados é muito maior. Estes subtipos também são amplamente expressos em diversos órgãos, tais como, coração e rim, em tecidos periféricos do sistema vascular e em células do sistema imune (Rudy, 2010).

Subfamília Shab (K_V2)

Os dois subtipos já caracterizados são os $K_V2.1$ e $K_V2.2$. Estes são encontrados no córtex cerebral, hipocampo e cerebelo. Acredita-se que estão presentes em todas as células e interneurônios do tecido cerebral e estão localizados principalmente e, em grande quantidade, na região do soma e na região dendrítica próxima ao corpo celular neuronal. Também já foi descrita a presença destes subtipos em células β do tecido pancreático (Dai et al, 2009; Hwang et al, 1993; Murakoshi & Trimmer, 1999).

Subfamília Shaw (K_V3)

Cada subtipo de K_V3 exibe um padrão peculiar de expressão entre as populações de células do sistema nervoso. Os subtipos $K_V3.1$ – $K_V3.3$ são expressos no sistema nervoso central e geralmente são encontrados em neurônios (tanto no soma, quanto no axônio) com terminações sinápticas GABAérgicas e, em interneurônios. Por sua vez, o subtipo $K_V3.4$ não é tão usualmente encontrado no cérebro, porém há uma grande expressão destes na musculatura esquelética (Lenz et al, 1994; Perney et al, 1992; Veh et al, 1995).

Subfamília Shal (K_V4)

Dentre os três subtipos já caracterizados nesta subfamília, somente os $K_V4.2$ e $K_V4.3$ são altamente expressos no sistema nervoso central e coração. Por sua vez, o $K_V4.1$ é encontrado em baixos níveis de expressão no sistema nervoso central (hipocampo e córtex cerebelar) e, fora do sistema nervoso, é encontrado em diferentes órgãos: coração, fígado e rim (Serodio & Rudy, 1998).

Subfamília ether-à-go-go (erg ou K_V11)

Atualmente três subtipos já foram descritos para esta subfamília ($K_V11.1$ – $K_V11.3$). O subtipo $K_V11.1$ (*Erg1*) foi primeiramente isolado do coração de humanos e, por isso, também é conhecido como *hERG* (“*human ether-à-go-go*”), porém também já foi identificado em interneurônios do sistema nervoso central. Os outros dois subtipos ($K_V11.2$ e $K_V11.3$) não são encontrados no coração, mas já foi comprovada sua presença no hipocampo. Interessantemente, no sistema nervoso central, estes canais também tendem a formar heterotetrâmeros (Vacher et al, 2008).

1.2.2. Cinética de ativação e inativação e seletividade iônica

Aproximadamente 30% da energia proveniente do metabolismo celular são gastos com a manutenção do gradiente eletroquímico dos íons Na^+ e K^+ através da membrana. Esta energia é convertida em movimento do canal, possibilitando sua abertura ou fechamento e, conseqüentemente, aumentando ou diminuindo a permeabilidade dos íons através da membrana (Ackerman & Clapham, 1997).

Os canais voltagem – dependentes de K^+ possuem mais de um mecanismo responsável por sua abertura e fechamento. O movimento de abertura do canal é denominado de *ativação* e ocorre em resposta à despolarização da membrana. Posteriormente à sua *ativação*, quando o potencial de membrana volta a valores negativos, o canal se fecha, em um processo denominado de *desativação*. Em determinadas situações fisiológicas

em que o potencial de membrana é mantido em valores positivos, o canal também irá se fechar, porém através de um processo conhecido como *inativação*, mediado tanto pela porção Amino-terminal do canal (denominado de “*N-type*”) quanto pela porção Carboxi-terminal (“*C-type*”).

Sensor de voltagem

Como já discutido anteriormente, os segmentos S1 a S4 dos canais voltagem – dependentes estão envolvidos com as alterações de conformação estrutural que ocorrem em resposta à despolarização da membrana (Jiang et al, 2003a). Com o intuito de se compreender este fenômeno, os primeiros trabalhos realizados, utilizando-se a técnica de “*voltage – clamp*” definiram que diferentes valores de voltagem de membrana causavam diferentes alterações na conformação do canal, resultando em diferentes valores de corrente, denominada de “*gating current*” (Armstrong & Bezanilla, 1973; Schneider & Chandler, 1973).

Medidas eletrofisiológicas realizadas em canais com mutações sítio – dirigidas nos segmentos S2 (substituição de aminoácidos negativos por neutros) e S4 (substituição de aminoácidos positivos por neutros) resultaram em uma redução na “*gating current*”. Tal condição permite afirmar que ambos os segmentos são extremamente importantes, pois estão diretamente envolvidos com a detecção das diferenças de voltagem da membrana e, conseqüentemente, no “*gating*” (abertura e fechamento) do canal (Papazian et al, 1995; Seoh et al, 1996; Tiwari-Woodruff et al, 1997). Outros experimentos provaram que os aminoácidos positivos do segmento S4 são capazes de se deslocar ao longo da membrana plasmática e até ficarem expostos ao meio extracelular, quando a membrana sofre diferentes pulsos de voltagem despolarizante (Larsson et al, 1996; Mannuzzu et al, 1996; Yang & Horn, 1995).

Tais evidências, juntamente com análises estruturais dos canais voltagem – dependentes de K⁺ (Doyle et al, 1998; Jiang et al, 2003b; Long et al, 2005b), permitiram propor diferentes mecanismos de movimento do *domínio sensor de voltagem*. Primeiramente, Jiang e colaboradores (2003), a partir da determinação da estrutura do canal (K_vAP) da arqueobactéria termofílica

Aeropyrum pernix, concluíram que o segmento S4 se encontrava na interface entre o citoplasma e a membrana plasmática e era capaz de se deslocar mais de 15 Å ao longo da membrana plasmática, durante sua despolarização. Os autores ainda propuseram que os resíduos positivos do segmento S4 estavam expostos aos lipídios de membrana, permitindo ao sensor de voltagem “sentir e responder” às forças eletrostáticas e hidrofóbicas que estariam envolvidas com o “gating” do canal (Jiang et al, 2003a; Jiang et al, 2003b).

No entanto, possíveis interferências decorrentes dos métodos utilizados, levaram Long e colaboradores (2005) a proporem um novo modelo baseando-se na estrutura do K_v1.2 que havia sido determinada (Long et al, 2005b). Neste modelo, diferentemente do que havia sido proposto para o K_vAP, o segmento S4 está disposto paralelamente à membrana e os seus aminoácidos positivos estão completamente, ou pelo menos parcialmente, isolados da membrana plasmática, para que suas cargas estejam protegidas do ambiente lipídico (Elinder et al, 2001; Laine et al, 2004). Para que este modelo seja validado, o segmento S4 deve estar de um lado interagindo com os segmentos S5 e S6 e do outro lado com os segmentos S1 e S3. Dessa forma, o segmento S4 fica confinado a uma fenda que permite que seus aminoácidos carregados se movam através da membrana sem expô-los ao ambiente lipídico (Long et al, 2005b). Essa interação do segmento S4 com os segmentos S5 e S6 e o acoplamento entre os segmentos S4 e S5 são importantes para a comprovação de que os movimentos do *domínio sensor de voltagem* e do *domínio do poro* do canal ocorrem separadamente, porém estão acoplados (Long et al, 2005b).

Agora, se pensarmos como este sensor de voltagem reage ao campo elétrico transmembranar numa situação em que a membrana se encontra despolarizada, ou seja, com o interior celular carregado positivamente. Os aminoácidos do segmento S4 (que também são carregados positivamente) irão sofrer repulsão e se deslocarão para o meio extracelular, causando a abertura do poro (“gating”) em consequência ao deslocamento dos segmentos S5 e S6, os quais estão acoplados ao S4. Por outro lado, quando ocorrer a repolarização da membrana, os resíduos de aminoácidos positivos do S4 se deslocarão e ficarão mais próximos do meio intracelular. Durante este

deslocamento, denominado de *desativação* do canal, a região de acoplamento entre os segmentos S4 e S5 comprimem suas hélices internas e o poro do canal se fecha (Figura 4) (Laine et al, 2003; Long et al, 2005b).

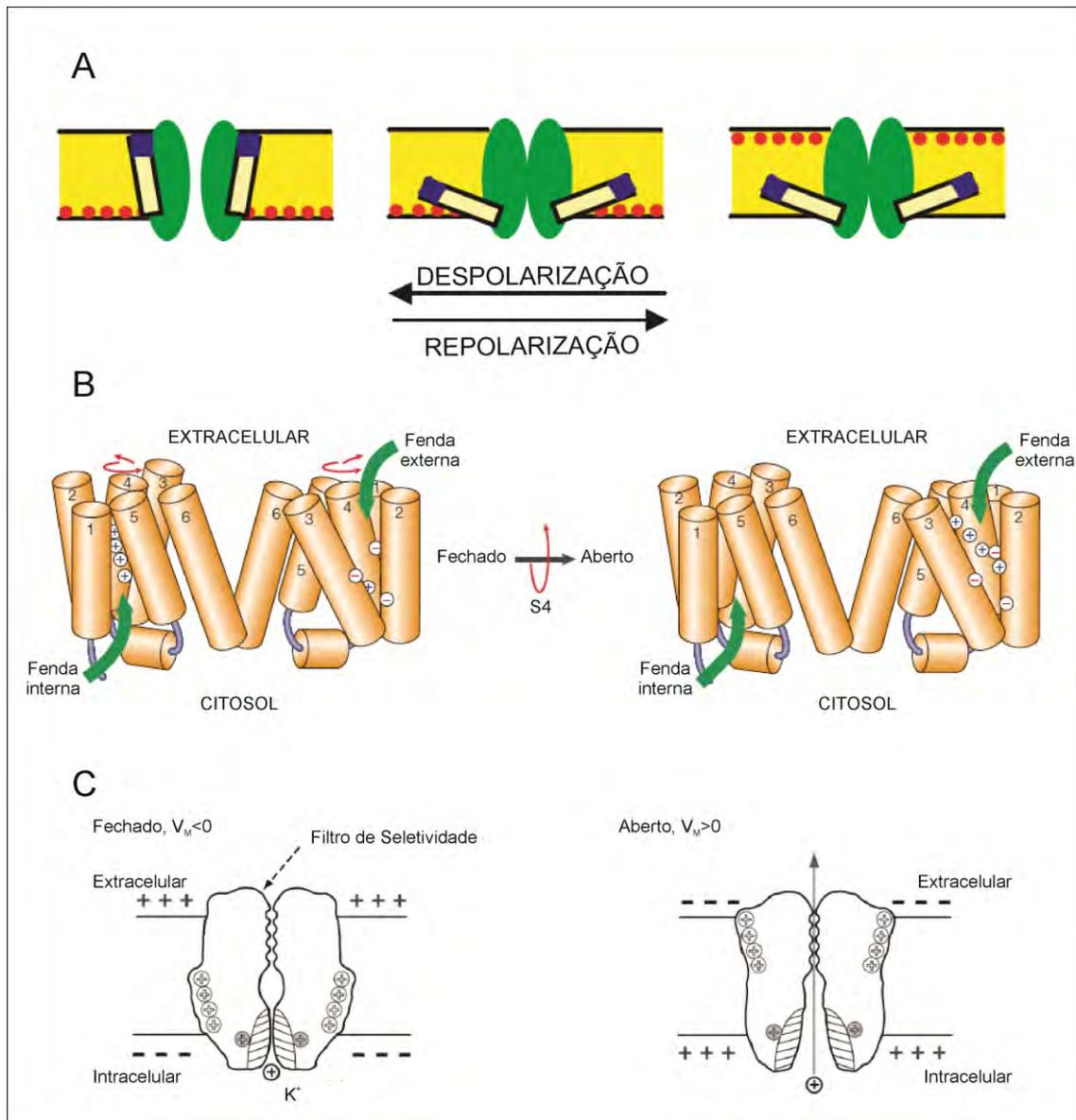


Figura 4 – Localização do sensor de voltagem. **A** – Modelo ilustrativo da localização e deslocamento do segmento S4 do canal K_VAP . O segmento S4 se encontra na interface entre o citoplasma e a membrana plasmática e é capaz de se deslocar mais de 15 Å ao longo da membrana plasmática, durante sua despolarização (Jiang et al, 2003b). **B** – Modelo ilustrativo proposto para a localização do segmento S4 do $K_V1.2$, o qual está disposto paralelamente à membrana plasmática (Long et al, 2005b). **C** – Modelo atualmente aceito para

o deslocamento do segmento S4 durante a despolarização da membrana plasmática. Quando a voltagem da membrana for menor negativa ($V_M < 0$), o canal se encontra no estado fechado e as “*gating charges*” encontram-se próximas ao meio intracelular. Quando ocorre a despolarização da membrana, o segmento S4 desloca-se em direção ao meio extracelular. Figura modificada de (Chanda et al, 2005; Choe, 2002; Dryga et al, 2012).

Ativação

O processo de *ativação* do canal é dependente de voltagem e pode ser dividido em duas partes: (1) a alteração da conformação do *sensor de voltagem* e (2) o movimento dos segmentos S5 e S6 do canal (“*gating*”). Inicialmente, a despolarização da membrana causa uma alteração da conformação do sensor de voltagem, resultando no movimento de cargas (*gating charges*) ao longo do campo elétrico da membrana plasmática. Conseqüentemente a esta redistribuição de cargas ao longo do campo elétrico, tem-se o movimento dos segmentos S5 e S6, causando a abertura do poro. É possível, portanto, afirmar que estes dois mecanismos ocorrem separadamente, porém são energética e mecanicamente acoplados (Yellen, 1998).

A alteração da conformação estrutural do sensor de voltagem está relacionada à *ativação* do canal, uma vez que o segmento S4 do sensor de voltagem está acoplado aos segmentos S5 e S6. Este acoplamento se dá através de uma sequência padrão formada por três aminoácidos: Pro – X – Pro, sendo que X pode ser qualquer aminoácido. A comprovação deste acoplamento se deu através de mutações nestes aminoácidos, as quais causaram drásticas mudanças na cinética de *ativação* do canal (Liu et al, 1997; Schoppa & Sigworth, 1998).

Outros experimentos também envolvendo mutagênese sítio – dirigida dos aminoácidos dos segmentos S5 e S6 permitiram inferir que a região do “*gating*” de *ativação* do canal, responsável pelo processo de abertura e fechamento do poro, é formada por aminoácidos específicos presentes na alça de ligação entre os segmentos S4 e S5 e, principalmente por alguns aminoácidos presentes no segmento S6, ao final de sua porção hidrofóbica,

próxima ao meio intracelular. Ensaios eletrofisiológicos utilizando-se o TEA, o 4-Aminopiridina (4-AP) e o íon Cd^{2+} corroboraram os resultados previamente obtidos, uma vez que estes compostos se mostraram apenas capazes de bloquear a passagem dos íons K^+ após a *ativação* do canal (canal no estado aberto), ou seja, os seus sítios de ligação encontram-se inacessíveis quando o canal está no estado fechado (Figura 5) (Holmgren et al, 1996; Liu et al, 1997).

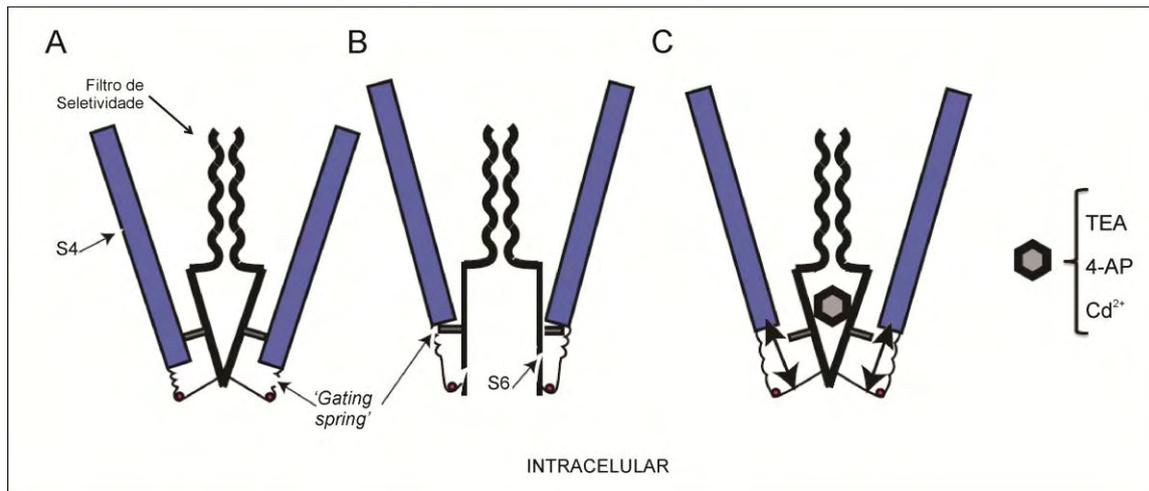


Figura 5 – Mecanismo de ativação do K_V . **A** – Representação esquemática do canal no estado fechado. Segmento S4 encontra-se próximo ao meio intracelular e os segmentos S6 estão próximos uns aos outros. **B** – Representação do canal no estado aberto. O segmento S4 desloca-se para o meio extracelular e o segmento S5 e S6 sofrem alterações de conformação estrutural que permitem a passagem dos íons K^+ . **C** – Comprovação do mecanismo de *ativação* do K_V . O sítio de ligação do TEA, 4-AP e o íon Cd^{2+} somente esta acessível quando o canal se encontra no estado aberto. Figura modificada de (Armstrong, 2003).

Inativação

O processo de *inativação* é a tendência dos canais se fecharem em resposta a uma prolongada despolarização da membrana. O mecanismo envolvido neste processo está acoplado à *ativação* do canal, uma vez que é através da *ativação* mediada pelo *domínio sensor de voltagem*, que se tem o controle indireto da *inativação* do canal (Yellen, 1998).

O processo de *inativação* mediada pela porção Amino-terminal do canal é denominado de “*N-type*” ou “*Ball-and-chain*”, pois é caracterizado por um bloqueio intracelular da região do poro do canal, por intermédio de uma porção da cadeia polipeptídica da região N-terminal do canal (Choi et al, 1991). Esta porção é formada pelos 20 primeiros aminoácidos de cada uma das subunidades do canal, sendo que os onze primeiros são hidrofóbicos ou não carregados, seguidos por oito aminoácidos hidrofílicos ou carregados positivamente (Hoshi et al, 1990).

As primeiras evidências da existência desse mecanismo surgiram: (1) através de experimentos com a utilização de células tratadas com protease no meio intracelular, o que tornava os canais incapazes de inativarem, enquanto sua *ativação* era mantida inalterada (Armstrong & Bezanilla, 1977; Armstrong et al, 1973; Hoshi et al, 1990) e, (2) utilizando-se derivados do TEA cujo bloqueio da corrente do canal era dependente de seu estado de conformação estrutural (Liu et al, 1997).

Posteriormente, a comprovação desse mecanismo se deu através (1) da deleção genética dos primeiros 20 aminoácidos da porção N-terminal do canal, os quais ocasionaram a perda do mecanismo de *inativação* e, da adição intracelular de um peptídeo solúvel com a mesma sequência, capaz de restaurar a *inativação* dos canais com a deleção genética (Zagotta et al, 1990) e (2) da competição pelo sítio de ligação entre a região N-terminal do canal responsável pela sua *inativação* e bloqueadores intracelulares ou pelo aumento na concentração de íons K^+ no meio extracelular (Choi et al, 1991; Demo & Yellen, 1992).

O processo de *inativação* mediada pela região Carboxi-terminal do canal é denominado de “*C-type*”. Este foi primeiramente caracterizado em mutantes de canais da subfamília *Shaker* sem o processo de *inativação* “*N-type*”, mas que ainda assim eram capazes de inativar o canal, porém em uma escala temporal muito maior (segundos ao invés de milissegundos) (Hoshi et al, 1991). A *inativação* “*C-type*”, assim como a “*N-type*”, está energeticamente acoplada ao processo de *ativação* do canal (Yellen, 1998). Porém, o processo “*C-type*”

ocorre no meio extracelular, como comprovado pela competição pelo sítio de ligação com o TEA, quando presente no meio extracelular (Lopez-Barneo et al, 1993).

Esse processo está relacionado a mudanças de conformações estruturais do *Filtro de seletividade*, uma vez que este se torna incapaz de conduzir a passagem dos íons K^+ , pois sofre uma constrição da região extracelular. Mutações dos aminoácidos do *Filtro de seletividade* ou próximos a ele causaram uma aceleração na cinética de *inativação* do canal e, uma diminuição na corrente total de íons K^+ que passa através do poro, comprovando-se a participação do *Filtro de seletividade* nesse mecanismo de *inativação* (Pardo et al, 1992; Perozo et al, 1993).

Yellen e colaboradores (2002), ao analisarem a conformação estrutural no estado aberto do canal de K^+ ativado por Ca^{2+} (MthK), isolado da bactéria *Methanobacterium thermoautotrophicum*, propuseram um terceiro tipo de *inativação* mediada pelo segmento S6. No entanto, este mecanismo de *inativação* é o processo inverso da *ativação* do canal, também mediada pelo segmento S6 e, por isso, a existência deste terceiro mecanismo de *inativação* é questionada pela comunidade científica (**Figura 6**) (Jiang et al, 2002b; Yellen, 2002).

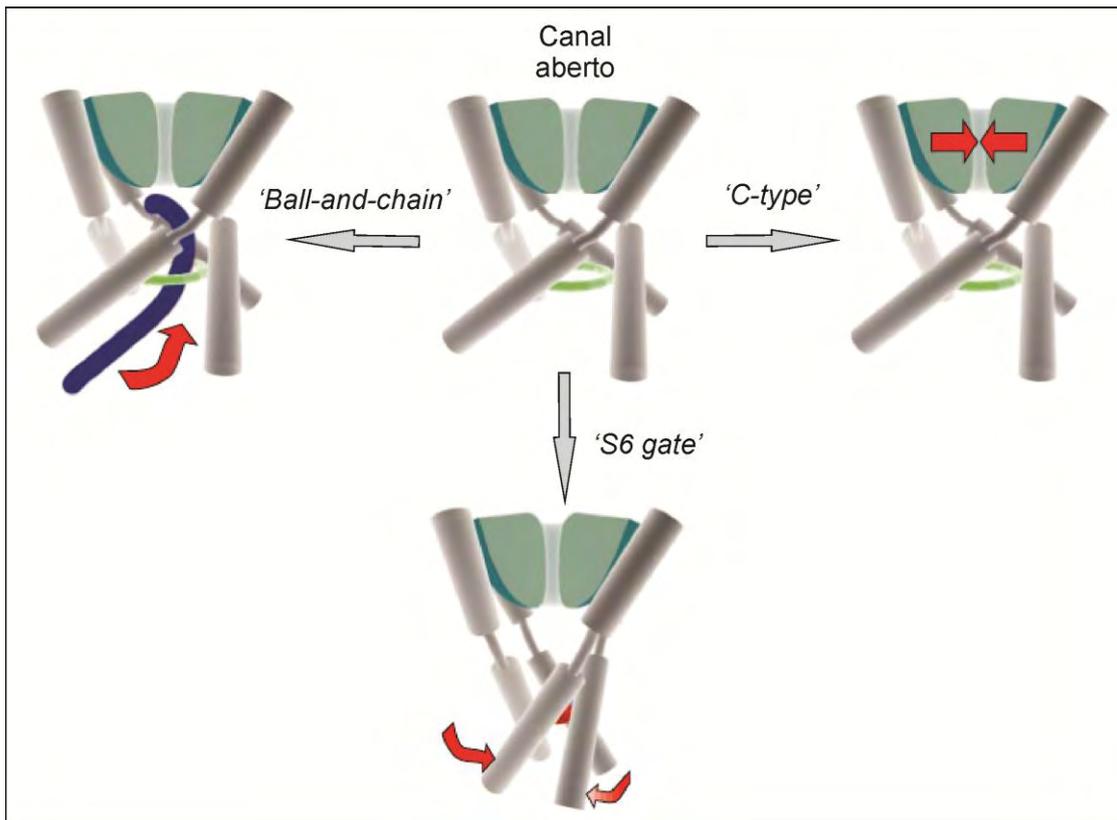


Figura 6 – Mecanismos de *inativação* do K_V . Após a abertura do canal, este pode inativar-se por intermédio de três mecanismos distintos: “*Ball-and-chain*”, “*C-type*” e “*S6 gate*”. Figura modificada de (Yellen, 2002).

Inativação mediada por subunidades auxiliares

Subunidades auxiliares, também denominadas de β -subunidades, podem estar associadas às subunidades principais (α -subunidades) de diferentes subtipos de canais, modulando sua cinética (Isom et al, 1994). Por exemplo, alguns canais da subfamília *Shaker* ($K_V1.1$ e $K_V1.4$) podem se associar a uma β -subunidade ($K_V\beta1$) citoplasmática que estará envolvida com o aumento da velocidade da cinética de *inativação* (Rettig et al, 1994). Outro exemplo é a modulação da cinética de *inativação* de subtipos de canais da subfamília de K_V4 pela $K_V\beta2$ (Nakahira et al, 1996). No entanto, nem todas as β -subunidades auxiliares estão estritamente relacionadas à cinética do canal, como é o caso da subunidade $K_V\beta2$, a qual também está envolvida com a facilitação da formação do tetrâmero e o aumento e/ou inibição da expressão

do canal de determinados subtipos de K_V (Xu & Li, 1998). Mais recentemente, uma proteína chaperona (KChAP) também foi caracterizada como moduladora da função e expressão dos subtipos de canais $K_V1.3$, $K_V2.1$ e $K_V4.3$ (Kuryshv et al, 2000).

Seletividade iônica

A seletividade dos canais aos diferentes íons é consequência de diferentes fatores físico-químicos, energéticos e elétricos. Os canais voltagem – dependentes de K^+ são extremamente seletivos aos íons K^+ , porém permitem também a passagem dos íons com raios atômicos semelhantes ao do K^+ , tais como o Rubídio e o Césio, cuja permeabilidade assemelha-se à do íon K^+ (permeabilidades: $K^+ \cong Rb^+ > Cs^+$). No entanto, a permeabilidade a íons com raios atômicos menores (por exemplo: Na^+ e Li^+) é praticamente nula e, por isso, muitos estudos vêm sendo realizados para se elucidar o mecanismo envolvido na seletividade iônica (Doyle et al, 1998).

O poro do canal voltagem – dependentes de K^+ é a região de conexão entre as duas hélices (denominadas de “*inner hélix*” e “*outer helix*”) dos segmentos transmembranares S5 e S6. É formado por aproximadamente 30 aminoácidos e, consiste da “*região do Turret*”, da “*Hélice do poro*” e, do “*Filtro de Seletividade*”, onde se encontra uma sequência de três aminoácidos Gly – Tyr – Gly (denominada de “*signature sequence*”), a qual é encontrada em todos os canais de K^+ , desde os que possuem somente dois segmentos transmembrana, até os canais voltagem – dependentes (Choe, 2002).

Tanto no meio extracelular, quanto no meio intracelular, a região de entrada dos íons é carregada negativamente, para que se tenha uma atração elétrica aos cátions (consequentemente uma alta concentração de cátions) e, uma repulsão dos ânions. Ao longo da cavidade interna do poro, a qual é preenchida com água, tem-se uma predominância de aminoácidos hidrofóbicos, os quais são importantes, pois atuam como uma superfície inerte, incapaz de interagir com os íons K^+ e influenciar na sua difusão ao longo do canal. Por sua vez, a água que está presente na cavidade interna do poro é

importante para a estabilização do campo eletrostático do íon K^+ , facilitando sua difusão ao longo da membrana plasmática. (Doyle et al, 1998; MacKinnon, 1991b).

O *Filtro de Seletividade* é extremamente importante para a seletividade iônica, uma vez que os átomos de oxigênio do grupo carbonila dos aminoácidos, presentes em cada uma das quatro subunidades do canal, interagem com os íons K^+ para desidratá-lo. Esta desidratação é importante, pois quando em solução, os íons K^+ estão solvatados, ou seja, cercados por uma “gaiola” de átomos polares de oxigênio das moléculas de água, que fisicamente impediriam a passagem dos íons pela abertura do poro (~2.5 Å de diâmetro). Dessa forma, para que a passagem seja possível, o íon deve ser desidratado e, para que o campo eletrostático do cátion seja mantido estável, os átomos de oxigênio da água são substituídos pelos átomos de oxigênio do grupo carbonila, dos aminoácidos do *Filtro de Seletividade* (Biggin et al, 2000; Choe, 2002).

Ao longo do *Filtro de Seletividade*, têm-se cinco repetições de grupos carbonilas (dos aminoácidos Thr–Val–Gly–Tyr–Gly) que interagem com os íons K^+ , formando seis sítios de ligação. Quatro destes sítios se localizam internamente e, dois deles nas extremidades (um no meio extracelular e outro no meio intracelular) do *Filtro de Seletividade*. Os quatro sítios de interação internos estão localizados entre os grupos carbonila de dois aminoácidos consecutivos, conferindo ao íon K^+ oito pontos de interação. No meio extracelular, o íon K^+ interage com quatro átomos de oxigênio da água e com quatro grupos carbonila das Glicinas (Gly) de cada uma das subunidades (uma vez que o momento dipolo do grupo carbonila é mais forte que o das moléculas de água). Já no meio intracelular, o potássio torna a interagir completamente com a água (Choe, 2002). Por sua vez, os íons K^+ que se encontram alinhados ao longo do *Filtro de Seletividade* exercem uma força de repulsão entre si, forçando o deslocamento unidirecional, no sentido do seu gradiente eletroquímico (Biggin et al, 2000; Choe et al, 1999; Hille & Schwarz, 1978).

Para se compreender o motivo da baixa permeabilidade do íon Na^+ , se comparado ao íon K^+ (íons K^+ são pelo menos 10.000 vezes mais permeáveis

que os íons Na^+), deve-se levar em consideração a energia envolvida na ligação entre o canal e o íon. Medidas experimentais *in silico* demonstraram que a barreira energética necessária para a condutividade do íon Na^+ é maior que a do K^+ , uma vez que seu raio atômico é menor (raios atômicos: Na^+ (0.95 Å) e K^+ (1.33 Å)). Essa explicação, apesar de paradoxal, está diretamente relacionada à dinâmica molecular do *Filtro de Seletividade*, ou seja, esta região do canal não é capaz de se contrair suficientemente para que o íon Na^+ interaja com os quatro grupos carbonila presentes no poro (sendo capaz de interagir com somente dois), consequentemente aumentando sua energia eletrostática e diminuindo sua permeabilidade ao longo do canal. Contrariamente, o raio do íon K^+ permite que este se encaixe perfeitamente aos grupos carbonila do poro do canal e, então seja conduzido rapidamente através do canal (Figura 7) (Armstrong, 2003; Berneche & Roux, 2001; Dryga et al, 2012; Morais-Cabral et al, 2001; Zhou et al, 2001).

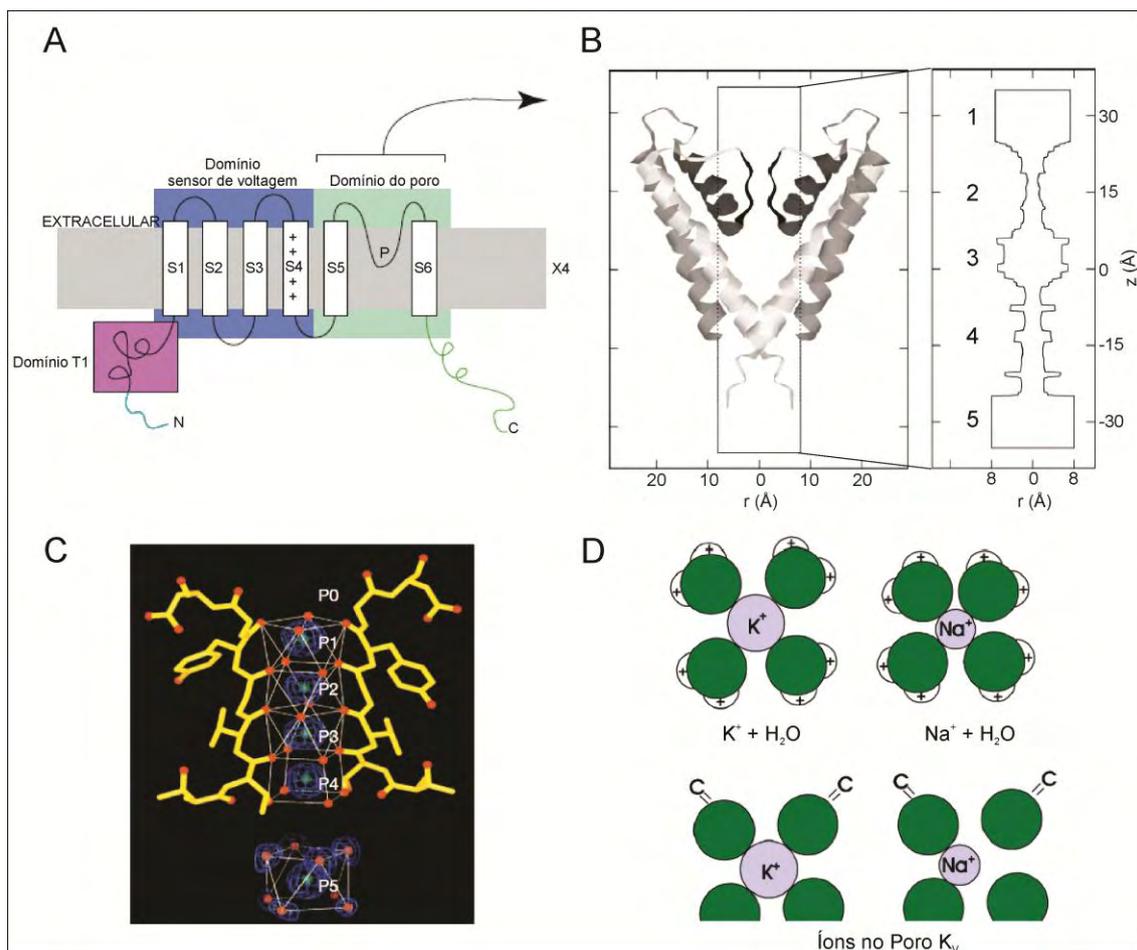


Figura 7 – Propriedades físico-químicas envolvidas na seletividade iônica. **A** – Estrutura de uma subunidade de um canal voltagem – dependente de K^+ , apresentando o “domínio sensor de voltagem” e o “domínio do poro”. **B** – Topologia do “domínio do poro” do canal, onde 1 indica a região extracelular; 2, *Filtro de Seletividade*; 3, câmara interna contendo água e aminoácidos hidrofóbicos; 4, poro hidrofóbico para desidratação dos íons K^+ ; 5, região do canal exposta ao meio intracelular. **C** – Representação do *Filtro de Seletividade* com os seis sítios de ligação para o íon K^+ . **D** – Ilustração da solvatação dos íons Na^+ e K^+ e quando estão em contato com os grupos carbonila dos aminoácidos do *Filtro de Seletividade*. Figura modificada de (Allen et al, 2000; Armstrong, 2003; Choe, 2002; Yellen, 2002)

1.2.3. Farmacologia e Importância médica (“Canalopatias”)

Em paralelo ao notável progresso da compreensão da diversidade molecular, estrutural e funcional dos canais voltagem – dependentes de K^+ , um número cada vez mais crescente de descobertas têm ligado mutações genéticas e/ou disfunções destes canais a várias doenças. A caracterização mais aprofundada dos mecanismos moleculares envolvidos nessas doenças contribuiu para sua etiologia e permitiram o desenvolvimento de estratégias para o tratamento (Shieh et al, 2000).

Vários subtipos de canais de K^+ de diferentes subfamílias, com diferentes cinéticas de *ativação/inativação* e *desativação*, regulam a frequência cardíaca, definindo o potencial de repouso da membrana, a amplitude e duração do potencial de ação e seus períodos refratários (Barry & Nerbonne, 1996; Roden & Kupersmidt, 1999; Snyders, 1999). A insuficiência cardíaca pode ocorrer por consequência de inúmeras etiologias, tais como o enfarte do miocárdio, hipertensão e miocardite (Wilson, 1997). Porém, a insuficiência cardíaca é sempre caracterizada pelo prolongamento do potencial de ação, decorrente de uma alteração da cinética de *ativação* e *inativação* dos subtipos de $K_v1.4$ e $K_v4.2$ (Dixon et al, 1996; Kong et al, 1998).

A Síndrome do QT longo é um tipo de taquiarritmia ventricular congênita, caracterizada por uma repolarização ventricular prolongada ou tardia, gerando um alongamento temporal entre o início da onda Q e o término da onda T, ao longo do ciclo elétrico cardíaco. Esta síndrome está relacionada a um risco elevado de fibrilação ventricular, podendo evoluir para uma síncope e morte súbita (Ackerman & Clapham, 1997; Sanguinetti & Spector, 1997; Vincent et al, 1999). Mutações que ocorrem na região Amino-terminal do subtipo de canal *hERG* causam um retardo na sua *inativação* e, conseqüentemente, um prolongamento no intervalo QT. Pacientes com estas mutações são caracterizados como tendo a Síndrome do QT longo do tipo 2, a qual pode ter diferentes graus de implicações clínicas, dependendo da diversidade das mutações (Chen et al, 1999; Smith et al, 1996; Spector et al, 1996).

Outra doença envolvendo o coração é a Fibrilação Atrial, a qual pode ser assintomática ou causar palpitação, fadiga, cansaço decorrente de esforços físicos, falta de ar, desmaios, tontura e dor no peito. O subtipo de $K_V1.5$ é expresso numa variedade de tecidos em humanos, porém sua presença exclusiva na musculatura dos átrios do coração, tornou-o foco de grande interesse da indústria farmacêutica. Este canal é responsável pela repolarização do potencial de ação atrial, através de uma condutância específica de íons K^+ , denominada de “*ultra rapid delayed rectifier*” (IKur) e, em pacientes com Fibrilação Atrial, este tipo específico de corrente apresenta uma disfunção (Fedida et al, 1993; Wang et al, 1993).

Dentre as doenças neuronais, pode-se destacar a Ataxia Episódica, uma doença autossômica, na qual os indivíduos afetados têm episódios breves de falta de coordenação dos movimentos (ataxia), desencadeada por estresse físico e/ou emocional. Mutações encontradas em pacientes com Ataxia Episódica são responsáveis pela (1) redução da expressão do subtipo de $K_V1.1$ no sistema nervoso central e periférico e (2) alteração da função do $K_V1.1$, causando uma *ativação* do canal em valores mais positivos de membrana (entre 10 a 40 mV), aumento da cinética de *desativação*, ou ainda alteração da taxa de *inativação* do tipo “*C-type*” (Adelman et al, 1995; Boland et al, 1999; Bretschneider et al, 1999).

O subtipo de $K_v1.1$, bem como o subtipo de $K_v1.6$, também teve sua disfunção relacionada a doenças neuromusculares. Essa disfunção causa uma hiperexcitabilidade das fibras musculares, as quais, por conseguinte, causam miopatias miotônicas e paralisias periódicas, doenças estas que se caracterizam por rigidez muscular, fraqueza e dores intermitentes ou constantes. Outro exemplo é a Síndrome de Isaac, uma neuromiotonia adquirida, que também está relacionada aos canais da subfamília *Shaker*. Nesta síndrome, os anticorpos produzidos pelo próprio organismo bloqueiam a corrente dos $K_v1.1$ e $K_v1.6$, causando a hiperexcitabilidade dos nervos motores periféricos (Hart et al, 1997; Nagado et al, 1999; Shillito et al, 1995).

O subtipo de $K_v1.3$ é expresso predominantemente em linfócitos humanos e tem sido amplamente explorado como alvos farmacológico para a terapia imunossupressora. Bloqueadores seletivos desses canais despolarizam a membrana plasmática, atenuando o fluxo de Ca^{2+} para o meio intracelular. Inibindo, conseqüentemente, a ativação das células T quando *in vitro* e, em condições *in vivo*, causam a imunossupressão do paciente. Portanto, este subtipo de canal é muito importante para tratamento de doenças autoimunes, tais como a esclerose múltipla, psoríase e hepatite autoimune (Cahalan & Chandy, 1997).

Por fim, entre muitos outros exemplos que podem ser citados do envolvimento de canais voltagem – dependentes de K^+ em doenças, vale ressaltar a doença de Alzheimer. Esta doença é a causa mais comum da diminuição progressiva da função cognitiva, perda de memória e deterioração física em idosos. É caracterizada pela presença de emaranhados neurofibrilares intracelulares e placas neuríticas extracelulares, causados pelo depósito de um peptídeo (39 a 43 amino ácido) β -amilóide, resultante da degradação proteolítica da proteína precursora β -amilóide (β -APP) (Shieh et al, 2000).

Na doença de Alzheimer, verifica-se uma significativa morte celular neuronal no córtex temporal e parietal, hipocampo, amígdala e prosencéfalo basal do sistema colinérgico. Vários mecanismos têm sido associados a essa doença neurodegenerativa, como, por exemplo, alterações no metabolismo da

β -APP, na transmissão colinérgica, na homeostase do Ca^{2+} , no metabolismo oxidativo e nos sistemas de transdução de sinal mediados pela proteína cinase C (Hensley et al, 1994; Ito et al, 1994; Mattson et al, 1993; Yankner, 1996).

Estudos *in vitro* com células colinérgicas (SN56), demonstraram que a presença do peptídeo β -amilóide na cultura celular aumentava em 44 a 66% a corrente de íons K^+ dos canais da subfamília *Shaker* e, diminuía a viabilidade celular. Também se demonstrou que a despolarização prolongada da membrana ou o bloqueio da corrente mediada pela aplicação de TEA, causavam um aumento da duração do potencial de ação e, elevava os níveis de Ca^{2+} intracelular, prevenindo em mais de 68% a toxicidade mediada pelo peptídeo β -amilóide. Tais achados permitiram inferir que os canais da subfamília *Shaker* desempenham um importante papel na regulação da toxicidade mediada pela β -amilóide (Colom et al, 1998)

1.3. Canais voltagem – dependentes de K^+ são alvos biológicos de neurotoxinas animais

Ao longo da evolução, várias espécies de animais desenvolveram um arsenal de compostos tóxicos para a captura de presas, defesa contra predadores e disputas territoriais. Esses animais desenvolveram um aparelho especializado responsável pela produção da peçonha e sua inoculação no organismo de outro animal. A maioria das peçonhas são misturas complexas de compostos biologicamente ativos, muitas vezes com ações sinérgicas, mas que também podem atuar isoladamente, sendo capazes de alterar a homeostasia do outro animal (Chippaux & Goyffon, 2006).

Animais peçonhentos fornecem um “reservatório” praticamente inexplorado de milhões de peptídeos neurotóxicos, com sequências de aminoácidos e estruturas tridimensionais altamente diversas, que são extremamente seletivos, sendo capazes de bloquear ou ativar canais voltagem – dependentes de K^+ de importância clínica e terapêutica e, por isso, passaram

a ser importantes ferramentas farmacológicas para o estudo da estrutura e função desses canais (Lewis & Garcia, 2003).

As anêmonas do mar, assim como outros animais peçonhentos, produzem neurotoxinas que atuam em canais voltagem – dependentes de K^+ e, inclusive, já tiveram sua importância farmacológica comprovada (Chandy et al, 1998). No entanto, suas peçonhas vêm sendo pouco exploradas, se comparada a de outros animais peçonhentos e, por isso, decidimos fazer das neurotoxinas de anêmonas do mar uma ferramenta para a análise fisiológica dos canais voltagem – dependentes de K^+ .

1.4. Anêmonas do mar – Aspectos ecológicos, fisiológicos e evolutivos

O Filo Cnidaria é constituído por animais aquáticos bênticos e pelágicos, divididos nas classes Anthozoa, Hydrozoa, Scyphozoa e Cubozoa. Apesar dos diferentes formatos e habitats, o corpo de todos os cnidários possui simetria radial e o desenvolvimento embrionário é formado por duas camadas celulares: a ectoderme que recobre a parte externa do corpo e a endoderme que envolve o seu interior, e entre estas camadas celulares há a mesoglêia. Não possuem uma especialização celular em diferentes órgãos e o sistema nervoso é difuso ao longo do corpo. Estes animais divergiram da linhagem dos animais com simetria bilateral (Bilateria) logo no início do estágio evolutivo, há cerca de 600 milhões de anos (Ball et al, 2004).

Anêmonas do mar pertencem à classe Anthozoa e são agrupadas dentro da ordem Actiniaria, com pelo menos 45 famílias já descritas. São predadores ancestrais que vivem no ambiente marinho, desde o costão rochoso até regiões oceânicas profundas, espalhadas pelo mundo todo e podem ou não estar em simbiose com peixes, crustáceos, zooxantelas e dinoflagelados (Dunn, 1981). Possuem o corpo formado por um pé adesivo, com uma coluna levando a um disco oral com tentáculos que circundam a abertura central da boca. Nos tentáculos e em outras partes do corpo são encontradas cnidócitos,

células compostas por uma cnida, organela subcelular também conhecida como cnidocisto, a qual se especializa estrutural e funcionalmente em:

1- Espirocistos, os quais são constituídos de mucoproteínas ou glicoproteínas que ajudam na captura da presa, pois aderem ao seu corpo;

2- Pticocistos, também são compostos por mucoproteínas, porém são utilizados na fixação do animal ao substrato;

3- Nematocistos, utilizados para captura de presas, defesa contra predadores e disputas territoriais (Brusca & Brusca, 2003).

Nos nematocistos é encontrado um túbulo enrolado que é geralmente farpado para facilitar a penetração e a fixação na presa ou predador. O seu disparo é possível devido ao aumento da pressão osmótica causada por um gradiente de prótons que atravessa a membrana que envolve o nematocisto. Quando a anêmona sofre um estímulo químico ou mecânico, ocorre a eversão do túbulo que é expelido através do opérculo na região apical celular (Anderson & Bouchard, 2009). Dessa forma, a peçonha contida nos nematocistos penetra na presa, causando sua imobilização, ou ainda, podendo ser útil na defesa contra predadores e para disputas territoriais (Thorington & Hessinger, 1998).

1.5. Composição do veneno das anêmonas do mar

Em geral, as peçonhas das anêmonas do mar são complexas misturas contendo proteínas e peptídeos com diferentes propriedades, além de compostos não protéicos, derivados do metabolismo secundário. Estes compostos divergem de uma espécie para outra, quanto a sua estrutura e seu potencial alvo de ação. Alguns são encontrados em várias peçonhas, enquanto outros são espécie-específicos (Frazao et al, 2012). Os componentes já descritos nas peçonhas das anêmonas são:

1- Fosfolipases A_2 , capazes de romper fosfolipídios de membranas de células nervosas e musculares, causando danos aos nervos e inflamações musculares (Talvinen & Nevalainen, 2002);

2- Citolisinas que atuam em membranas celulares, causando alterações na osmorregulação e conseqüentemente a lise celular (Anderluh & Macek, 2002);

3- Neurotoxinas que interferem na transmissão do impulso nervoso, afetando canais voltagem-dependente de sódio e potássio e canais iônicos sensíveis à acidez (Castaneda & Harvey, 2009; Diochot et al, 2004; Honma & Shiomi, 2006);

4- Compostos não protéicos (purinas e aminas biogênicas) que se acredita estarem envolvidos na dor durante o envenenamento (Welsh, 1964; Zaharenko et al, 2012).

1.5.1. Neurotoxinas – Importância, seletividade e mecanismos de ação

Neurotoxinas interferem com a transmissão do impulso nervoso, modificando a função de algum tipo particular de canal na membrana do nervo ou músculo. São ferramentas muito importantes para o estudo dos diferentes tipos de canais presentes em membranas excitáveis e, por conseguinte, para investigar os mecanismos envolvidos durante a transmissão de impulsos nervosos. Algumas delas são muito seletivas e por isso têm permitido rápidos progressos na identificação e caracterização de novos receptores de membrana (Rees & Bilwes, 1993).

Os peptídeos neurotóxicos de anêmonas do mar possuem massas moleculares que variam entre 2,5 e 6 KDa e têm como principal alvo os canais iônicos. Até o momento, o que mais se tem descrito na literatura são neurotoxinas que atuam sobre canais voltagem-dependente de sódio (Na_v) e potássio (K_v) e um pouco sobre canais iônicos sensíveis à acidez (ASIC`s). Em geral, os estudos de neurotoxinas de anêmonas têm sido realizados com o intuito de elucidar:

1- Aspectos evolutivos das sinapses, diferenciação tecidual e desenvolvimento (Dunn et al, 2006; Holland, 2004; Miller et al, 2005);

2- Comunicação e a simbiose química (Mebs, 1994);

3- Importância médica, tendo em vista que algumas espécies são nocivas aos seres humanos durante o envenenamento (Sanchez-Rodriguez et al, 2001);

4- Importância farmacológica e fisiológica exercida pelos efeitos biológicos dos diferentes compostos neuroativos encontrados na peçonha (Oliveira et al, 2006; Pennington et al, 1995a);

5- Potencial terapêutico desses compostos (Beeton et al, 2002; Chandy et al, 1998; Kalman et al, 1999).

1.5.2. Toxinas que atuam em canais voltagem – dependentes de K^+

Atualmente são conhecidos pelo menos 23 diferentes peptídeos, sendo 10 purificados de seis espécies da família Actiniidae, 7 purificados de anêmonas da família Stichodactylidae, 3 da família Thalassianthidae e um da família Hormathiidae. Essas toxinas são classificadas em quatro diferentes grupos de acordo com sua estrutura primária e atividade biológica (Castaneda & Harvey, 2009; Honma & Shiomi, 2006).

Toxinas do tipo 1

Doze peptídeos que possuem entre 34 e 37 aminoácidos representam este grupo: Aek (da anêmona do mar *Actinia equina*) (Minagawa et al, 1998), AETX-K (*Anemonia erythraea*) (Hasegawa et al, 2006), AsKs (*A. sulcata*) (Schweitz et al, 1995), Bgk (*Bunodosoma granulifera*) (Cotton et al, 1997), HmK (*Radianthus magnifica*) (Gendeh et al, 1997), ShK (*Stichodactyla helianthus*) (Pennington et al, 1995a), κ 1.3-SHTX-Sha1a (*S. haddonii*), κ 1.3-SHTX-Sg1a (*S. gigantean*), κ 1.3-SHTX-Sm1a (*S. mertensii*), κ 1.3-TLTX-Ca1a (*Cryptodendrum adhaesivum*), κ 1.3-TLTX-Hh1a (*Heterodactyla hemprichi*), e κ 1.3-TLTX-Ta1a (*Thalassianthus aster*) (Yamaguchi et al, 2010). Estes peptídeos possuem seis resíduos de Cisteína que formam um padrão de pontes dissulfeto C1–C6, C2–C4 e C3–C5 e apresenta uma sequência primária com moderada similaridade estrutural (entre 39 e 100%).

Recentemente, propôs-se a subdivisão em subtipos 1a e 1b. O subtipo 1a é caracterizado pela presença de quatro resíduos de aminoácidos entre a segunda e a terceira Cisteína, sendo composto por nove toxinas isoladas de anêmonas do mar das famílias Actiniidae, Stichodactylidae e Thalassianthidae. O subtipo 1b é formado por três peptídeos que possuem oito aminoácidos entre a segunda e a terceira Cisteína, os quais foram isolados de anêmona do mar exclusivamente da família Actiniidae (Yamaguchi et al, 2010).

Dentre estas toxinas, somente a ShK e a BgK tiveram suas estruturas determinadas, através de experimentos de Ressonância Magnética Nuclear. Em ambos os casos há uma predominância de uma estrutura secundária em α hélices. ShK possui um motivo estrutural denominado de '*helical capping motif*' (ou $3_{10}\alpha$), pois possui três α hélices, sendo que uma delas é formada por apenas três aminoácidos e as outras duas estão dispostas paralelamente (Lanigan et al, 2001; Tudor et al, 1996) . Por sua vez, a BgK é denominada de '*helical cross-like motif*', uma vez que possui três α hélices e uma delas encontra-se perpendicular às outras duas (Dauplais et al, 1997). Dessa forma, apesar da baixa similaridade entre as estruturas primárias das toxinas do tipo 1, estas são caracterizadas como tendo um motivo estrutural ' *α -type*'.

Estas toxinas atuam inibindo a corrente do K_v através da obstrução física do poro do canal, ou seja, através de um conjunto de aminoácidos que interagem com a região do poro do K_v , causando a obstrução da passagem dos íons K^+ . São por isso, denominadas de bloqueadoras do poro, pois não interferem diretamente na cinética de *ativação* do canal (Diochot & Lazdunski, 2009). 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, porém não são responsáveis pela sua seletividade. No caso da ShK e da BgK, a "*díade funcional*" é formada pelos aminoácidos

Lys22 e Tyr 23 e, Lys25 e Tyr26, respectivamente (Baell et al, 2002; Dauplais et al, 1997; Sabatier et al, 2004a; Sabatier et al, 2008; Sabatier et al, 2005).

A toxina ShK foi primeiramente caracterizada como bloqueadora do K_V1.3 (Pennington et al, 1995a; Pennington et al, 1995b), porém também é capaz de bloquear a corrente dos subtipos de K_V1.1–4 e K_V1.6 (Castaneda & Harvey, 2009) e, mais recentemente, foi demonstrado o bloqueio da corrente do K_V3.2 (Yan et al, 2005). Devido à alta potência com que inibe a corrente do K_V1.3, diversos trabalhos focaram na caracterização de seu farmacofóro, uma vez que este subtipo de K_V está envolvido com diversas patologias humanas, como já detalhado anteriormente (Chandy et al, 2004; Monaghan et al, 2007). Experimentos de mutagênese sítio-dirigida, em que se substituíram os aminoácidos da ShK por uma alanina, provaram que os resíduos Ile7, Arg11, Hys19, Ser20, Lys22, Tyr23, Arg24 e Phe27 estão envolvidos na interação com os aminoácidos Asp376 e Ser379 da *região do Turret* do K_V1.3 e, Tyr400, Gly401, Asp402, Hys404 e Val406 do *Filtro de Seletividade* (Baell et al, 2002; Beeton et al, 2011; Harvey et al, 2005; Rashid & Kuyucak, 2012).

A BgK teve inicialmente sua atividade caracterizada em canais das subfamílias *Shaker* (K_V1) e *Shaw* (K_V3), sendo seletiva para os subtipos de K_V1.1–3 (Cotton et al, 1997). Posteriormente, também se comprovou sua seletividade para o subtipo de K_V1.6 (Racape et al, 2002) e para canais de potássio ativados por Ca²⁺ (Rauer et al, 1999). Estudos de mutagênese sítio-dirigida realizados com a BgK demonstraram que a substituição da Lys25 causou a maior perda de afinidade da toxina e, quando se substituíram os aminoácidos Phe6, His13, Ser23 e Tyr26, também se observou uma perda significativa da potência da toxina (ente 6 e 46 vezes) (Dauplais et al, 1997).

Através de ensaios eletrofisiológicos *in silico*, Guilquin e colaboradores propuseram uma superfície de interação entre a BgK e o K_V1.1: os três resíduos mais importantes são a Ser23, a Lys25 e a Tyr26 que interagiriam com a Tyr375, a Tyr379 e a Asp377 do K_V1.1, respectivamente. A Lys25 se liga através de interações eletrostáticas entre sua cadeia lateral e o grupo hidroxila da Tyr375. A Ser23 forma uma ligação de hidrogênio com a Tyr379 e a Tyr26 se liga através de interações hidrofóbicas com a Asp377. As interações entre a

Arg3 e a Lys7 com o Glu353 de uma das subunidades do canal e da His13 com o Glu353 de outra subunidade, formariam um segundo ponto de ancoramento ao canal (Gilquin et al, 2005; Gilquin et al, 2002).

As outras toxinas desse tipo tiveram sua atividade comprovada através de ensaios de inibição competitiva da ligação da ^{125}I - α -dendrotoxina ou ^{125}I -dendrotoxina-I, em membranas de sinaptossomas de rato e, portanto, sua seletividade não foi determinada. Porém, pode se afirmar que possivelmente atuam em $K_V1.1$, $K_V1.2$ e/ou $K_V1.6$, pois são os alvos biológicos descritos para estas dendrotoxinas (Gendeh et al, 1997; Hasegawa et al, 2006; Minagawa et al, 1998; Yamaguchi et al, 2010). Vale ressaltar que a toxina AsKs também teve sua atividade comprovada em $K_V1.2$, utilizando-se como sistema de expressão ovócitos de *Xenopus laevis* (Schweitz et al, 1995).

Toxinas do tipo 2

Os peptídeos geralmente conhecidos como Kalicludinas ou AsKCs (AsKC1, AsKC2 e AsKC3) da anêmona *Anemonia sulcata* e o peptídeo APEKTx1, da anêmona *Anthopleura elegantissima*, representam este segundo grupo. Possuem entre 58 e 63 aminoácidos e atuam em canais da subfamília *Shaker*. A APEKTx1 teve sua seletividade caracterizada através da expressão de subtipos de canais voltagem dependentes das subfamílias *Shaker*, *Shaw*, *Shab*, *Shal* e *EAG* em ovócitos de *Xenopus laevis*, sendo uma bloqueadora específica de $K_V1.1$ (Peigneur et al, 2011; Schweitz et al, 1995). Por sua vez, as AsKCs tiveram sua atividade comprovada através de ensaios de inibição competitiva indireta da ligação da I-dendrotoxina marcada com ^{125}I em $K_V1.2$.

Estas toxinas também atuam como inibidores de protease, apresentando similaridade estrutural com inibidores da tripsina pancreática bovina (BPTI). Entretanto, comparando-se os resíduos da BPTI, que estão envolvidos na ligação com a tripsina (Lys15, Ala16, Arg17 e Iso19), com os das toxinas do tipo 2, observa-se que estas apresentam uma substituição Iso19Pro, responsável por uma significativa perda em sua atividade inibitória da tripsina (Peigneur et al, 2011; Schweitz et al, 1995).

Toxinas do tipo 3

Este terceiro tipo tem um motivo estrutural semelhante à família das β -defensinas, que inclui peptídeos de várias classes de organismos, envolvidos com atividades antimicrobianas, analgésicas, mionecrótica e neurotóxicas (Torres & Kuchel, 2004; Yount et al, 2009). As toxinas BDS-I e BDS-II, extraídas da anêmona do mar *A. sulcata* (Diochot et al, 1998) e a APETx1 da *A. elegantíssima* (Diochot et al, 2003) são as representantes deste tipo. A sigla BDS é uma abreviação de '*Blood Depressing Substances*', uma vez que a toxina BDS-I foi primeiramente caracterizada como tendo atividades anti-hipertensiva e antiviral (Beress et al, 1985). A estrutura da BDS-I foi determinada em 1989 e é formada por quatro fitas β , sendo que três fitas β se encontram dispostas antiparalelas e uma está localizada na região N-terminal (Driscoll et al, 1989; Formankay et al, 1989).

BDS-I e BDS-II possuem 43 aminoácidos com 95,3% de identidade, sendo que seis são resíduos de Cisteína que formam um padrão: C1–C5, C2–C4, C3–C6. Em concentrações nanomolares são capazes de bloquear a corrente dos íons K^+ dos subtipos de $K_V3.1$, $K_V3.2$ e $K_V3.4$ (Diochot et al, 1998; Yeung et al, 2005). No entanto, em altas concentrações também causam um bloqueio da corrente, em torno de 2 a 20%, dos subtipos de $K_V1.1-5$, $K_V2.1-2$ e $K_V4.1$ e $K_V4.3$ (Diochot & Lazdunski, 2009). O bloqueio da corrente dos canais da subfamília *Shaw* (K_V3) ocorre através da modulação da cinética de *ativação*, ou seja, a toxina se liga ao sensor de voltagem do canal, mantendo-o no seu estado de repouso. Causando um deslocamento, para valores mais positivos, da voltagem necessária para a *ativação* do canal, o que conseqüentemente acarretaria um retardo em sua cinética de *ativação*. A mutagênese sítio dirigida dos resíduos do sensor de voltagem do $K_V3.2$ (Glu329, Val330, Gly331, Gly334 e Leu347) causaram perda significativa do bloqueio da corrente (Wang et al, 2007; Yeung et al, 2005). A toxina BDS-I também se mostrou capaz de modular a cinética de *inativação* de canais voltagem-dependentes de Na^+ (Na_V), assim como ocorre com as toxinas de anêmonas do mar: ATX-II, Anthopleurin B, AFT-II e Bc-III que atuam no sítio 3 do Na_V (Catterall et al, 2007). A BDS-I atua retardando a *inativação* dos subtipos de $Na_V1.3$ e $Na_V1.7$, quando em baixas

concentrações e, em altas concentrações, também é capaz de atuar em $Na_v1.1$ e $Na_v1.6$ (Liu et al, 2012).

APETx1 possui 43 aminoácidos e o mesmo padrão de Cisteínas das BDS-I e BDS-II, no entanto, sua identidade estrutural é de apenas 40 %. Esta toxina é capaz de bloquear a corrente de $K_v4.1$ somente quando em altas concentrações e, por isso, foi classificada como sendo seletiva para canais cardíacos e neuronais de humanos dos subtipos *hERG1* e *hERG3*. Assim como as BDS-I e II, a APETx1 modula a cinética de ativação e inativação destes canais através da ligação com aminoácidos do segmento S3 do canal. O aminoácido negativo Ácido Glutâmico, na posição 518 (Glu518) do canal é crucial para a interação com o aminoácido positivo Lys18 presente na toxina. Além disso, o aminoácido glicina (Gly514) é responsável por interações hidrofóbicas com os aminoácidos Leu34, Phe33 e Tyr32 da APETx1 (Diochot & Lazdunski, 2009; Diochot et al, 2003; Zhang et al, 2007). Sua estrutura tridimensional também é formada por quatro fitas β , sendo uma na região N-terminal e as outras três estão dispostas de maneira antiparalelas (Chagot et al, 2005a). Recentemente, demonstrou-se que a APETx1 (1 μ M) também é capaz de bloquear a corrente de canais voltagem – dependentes de Na^+ de mamíferos, sem alterar sua cinética de inativação (Peigneur et al, 2012).

Toxinas do tipo 4

A toxina SHTX-I, da anêmona *Stichodactyla haddoni*, foi caracterizada através de ensaios de inibição competitiva da ligação da ^{125}I - α -dendrotoxina, em membranas de sinaptossomas de rato. Apesar de não se ter informações a respeito da atividade da SHTX-II, sugere-se que este peptídeo também bloqueie a corrente de K_v , devido à sua alta identidade com a SHTX-I. Estas toxinas possuem quatro Cisteínas com um pareamento C1-C3 e C2-C4 (Honma et al, 2008).

1. Conclusões

- ✓ A metodologia empregada para obtenção da peçonha das anêmonas *A. bermudensis* e *B. caissarum* e o isolamento e purificação das frações (FrIII) contendo os peptídeos neurotóxicos mostraram-se muito eficazes, permitindo a caracterização de quatro neurotoxinas que atuam em canais voltagem – dependentes de K^+ .
- ✓ As neurotoxinas AbeTx1, BcsTx1, BcsTx2 e BcsTx4 são seletivas para os subtipos de K_V da subfamília *Shaker*. Seus mecanismos de ação são específicos para os diferentes subtipos, podendo bloquear a corrente dos íons K^+ através da modulação da cinética de *ativação* ou então pela simples obstrução física da passagem dos íons K^+ através do poro.
- ✓ A expressão dos peptídeos BcsTx1 e BcsTx2, pela anêmona do mar *B. caissarum*, está relacionada com a predação e/ou defesa contra predadores.
- ✓ As toxinas BcsTx1 e BcsTx2 são os novos membros do tipo 1 (subtipo 1b) de neurotoxinas de anêmonas do mar que atuam em K_V . Análises sugerem uma divergência evolutiva, uma vez que peptídeos com este motivo estrutural estão presentes em animais de diferentes Filos.
- ✓ A sequência de aminoácidos e o padrão de pontes dissulfeto da AbeTx1 e BcsTx4 nos permitem inferir que estes possuem um motivo estrutural semelhante ao das “*kappa-toxinas*” e, por isso, são os primeiros membros de um novo tipo (tipo 5) de neurotoxinas de anêmonas do mar que atuam em K_V .
- ✓ A utilização de neurotoxinas de anêmonas do mar como ferramentas para o estudo da estrutura e função dos canais voltagem – dependentes de K^+ se mostrou muito eficaz.

2. Resumo

ORTS, D.J.B. **Neurotoxinas de anêmonas do mar como ferramentas para o estudo da fisiologia de canais voltagem – dependentes de potássio**. 2013. 92 folhas. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Fisiologia, São Paulo, 2013.

A peçonha das anêmonas do mar é uma fonte de compostos bioativos, incluindo toxinas peptídicas que são ferramentas para o estudo da estrutura e função dos canais voltagem dependentes de K^+ (K_V). Neste trabalho, quatro neurotoxinas foram purificadas da peçonha das anêmonas do mar *Actinia bermudensis* e *Bunodosoma caissarum*. AbeTx1 e BcsTx4 possuem um motivo estrutural semelhante à das “*kappa-toxinas*” e análises funcionais e estruturais permitiram concluir que são os primeiros membros de um novo (tipo 5) de neurotoxinas de anêmonas do mar que atuam em canais K_V . Por sua vez, a similaridade estrutural das toxinas BcsTx 1 e BcsTx2 nos permitiu inferir que estas são membros do já descrito tipo 1 (subtipo 1b) de neurotoxinas de anêmona que também atuam em canais K_V . A caracterização funcional foi realizada utilizando-se diferentes subtipos de canais K_V , expressos em ovócitos de *Xenopus laevis* e as medidas eletrofisiológicas foram feitas empregando-se a técnica de “*voltage-clamp*” com dois microelétrodos. AbeTx1, BcsTx1 e BcsTx2 (3 μ M) apresentaram uma seletividade de atividade para os subtipos de $K_V1.1$ – $K_V1.3$, $K_V1.6$ e *Shaker* IR, ao passo que a BcsTx4 (3 μ M) é somente capaz de bloquear a corrente dos subtipos de $K_V1.1$, $K_V1.2$ e $K_V1.6$. Os mecanismos de ação envolvidos na seletividade da atividade e na potência com que estas se ligam aos seus alvos biológicos foram discutidos com base nos resultados obtidos e análises fisiológicas permitiram propor que estas toxinas atuam como “armas” para defesa contra predadores e/ou para captura de presas.

Palavras chave: anêmonas do mar, *A. bermudensis*, *B. caissarum*, peçonha, neurotoxinas, canais voltagem - dependentes de K^+ , *Xenopus laevis*, voltage-clamp technique.

3. Abstract

ORTS, D.J.B. **Sea anemones neurotoxins as tools to study the physiology of voltage-gated potassium channels.** 2013. 183 pages. Thesis (Master). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Fisiologia, São Paulo, 2013.

The sea anemones venom is a rich source of bioactive compounds, including peptide toxins which are tools for studying the structure and function of voltage-dependent channels K^+ (K_V). In this work, four neurotoxins were purified from the venom of the sea anemones *Actinia bermudensis* and *Bunodosoma caissarum*. AbeTx1 and BcsTx4 have a structural motif similar to that of *kappa-toxins* and functional and structural analysis showed that they are the first members of a new type (type 5) of sea anemone neurotoxins acting on K_V channels. Moreover, the structural analysis of BcsTx1 and BcsTx2 toxins allowed us to conclude that they are members of the previously described type 1 (subtype 1b) of sea anemone neurotoxins. Functional characterization was performed by means of a wide electrophysiological screening on different K_V channels using oocytes of *Xenopus laevis* and electrophysiological measurements were performed employing the voltage-clamp technique. AbeTx1, BcsTx1 and BcsTx2 (3 M) showed a selective activity for $K_V1.1$ - $K_V1.3$, $K_V1.6$ and *Shaker* IR, while BcsTx4 (3 μ M) only blocks $K_V1.1$, $K_V1.2$ and $K_V1.6$. The mechanisms involved in potency and selectivity were discussed based on the results obtained and physiological analyses have provided new insights on the role of these toxins in the physiology of the sea anemones.

Keywords: sea anemones, *A. bermudensis*, *B. caissarum*, venom, neurotoxins, voltage-gated potassium channels, *Xenopus laevis*, voltage-clamp technique.

4. Referências

Abdel-Rahman MA (2008) Intraspecific diversity of scorpions' venom and its implication on the pathophysiological effects. *Journal Venomous Animals Toxins Including Tropical Diseases Thesis* **14**: 191-192

Abdel-Rahman MA, Abdel-Nabi IM, El-Naggar MS, Abbas OA, Strong PN (2011) Intraspecific variation in the venom of the vermivorous cone snail *Conus vexillum*. *Comparative biochemistry and physiology Toxicology & pharmacology : CBP* **154**: 318-325

Abdel-Rahman MA, Omran MA, Abdel-Nabi IM, Ueda H, McVean A (2009) Intraspecific variation in the Egyptian scorpion *Scorpio maurus palmatus* venom collected from different biotopes. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* **53**: 349-359

Ackerman MJ, Clapham DE (1997) Ion channels--basic science and clinical disease. *The New England journal of medicine* **336**: 1575-1586

Adelman JP, Bond CT, Pessia M, Maylie J (1995) Episodic ataxia results from voltage-dependent potassium channels with altered functions. *Neuron* **15**: 1449-1454

Allen TW, Bliznyuk A, Rendell AP, Kuyucak S, Chung SH (2000) The potassium channel: Structure, selectivity and diffusion. *J Chem Phys* **112**

Altschul SF, Lipman DJ (1990) Protein Database Searches for Multiple Alignments. *P Natl Acad Sci USA* **87**: 5509-5513

Amaral F, MM H, FL dS, AE M, SM P, L L (2000) Cnidarians of Saint Peter and St. Paul Archipelago, Northeast Brazil. *Proceedings 9th International Coral Reef Symposium, Bali, Indonesia* **10**: 1-5

Anderluh G, Barlic A, Podlesek Z, Macek P, Pungercar J, Gubensek F, Zecchini ML, Serra MD, Menestrina G (1999) Cysteine-scanning mutagenesis of an eukaryotic pore-forming toxin from sea anemone: topology in lipid membranes. *European journal of biochemistry / FEBS* **263**: 128-136

Anderluh G, Macek P (2002) Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* **40**: 111-124

Anderluh G, Sepcic K, Turk T, Macek P (2011) Cytolytic Proteins from Cnidarians - an Overview. *Acta Chimica Slovenica* **58**: 724-729

Anderson PA, Bouchard C (2009) The regulation of cnidocyte discharge. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* **54**: 1046-1053

Anderson PA, Greenberg RM (2001) Phylogeny of ion channels: clues to structure and function. *Comparative biochemistry and physiology Part B, Biochemistry & molecular biology* **129**: 17-28

Andrade DV, Abe AS (1999) Relationship of venom ontogeny and diet in *Bothrops*. *Herpetologica* **55**: 200-204

Armstrong CM (1971) Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons. *The Journal of general physiology* **58**: 413-437

- Armstrong CM (2003) Voltage-gated K channels. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2003**: re10
- Armstrong CM, Bezanilla F (1973) Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature* **242**: 459-461
- Armstrong CM, Bezanilla F (1977) Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *The Journal of general physiology* **70**: 567-590
- Armstrong CM, Bezanilla F, Rojas E (1973) Destruction of sodium conductance inactivation in squid axons perfused with pronase. *The Journal of general physiology* **62**: 375-391
- Armstrong CM, Binstock L (1965) Anomalous Rectification in the Squid Giant Axon Injected with Tetraethylammonium Chloride. *The Journal of general physiology* **48**: 859-872
- Armstrong CM, Hille B (1998) Voltage-gated ion channels and electrical excitability. *Neuron* **20**: 371-380
- Baell JB, Harvey AJ, Norton RS (2002) Design and synthesis of type-III mimetics of ShK toxin. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **16**: 245-262
- Bak RPM, Borsboom JLA (1984) Allelopathic Interaction between a Reef Coelenterate and Benthic Algae. *Oecologia* **63**: 194-198
- Bakus GJ, Targett NM, Schulte B (1986) Chemical Ecology of Marine Organisms - an Overview. *Journal of Chemical Ecology* **12**: 951-987
- Ball EE, Hayward DC, Saint R, Miller DJ (2004) A simple plan--cnidarians and the origins of developmental mechanisms. *Nature reviews Genetics* **5**: 567-577
- Banks BE, Brown C, Burgess GM, Burnstock G, Claret M, Cocks TM, Jenkinson DH (1979) Apamin blocks certain neurotransmitter-induced increases in potassium permeability. *Nature* **282**: 415-417
- Barry DM, Nerbonne JM (1996) Myocardial potassium channels: electrophysiological and molecular diversity. *Annual review of physiology* **58**: 363-394
- Batista CVF, Gomez-Lagunas F, de la Vega RCR, Hajdu P, Panyi G, Gaspar R, Possani LD (2002) Two novel toxins from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* that block Kv1.3 and Shaker BK+-channels with distinctly different affinities. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* **1601**: 123-131
- Baumann A, Krah-Jentgens I, Muller R, Muller-Holtkamp F, Seidel R, Kecskemethy N, Casal J, Ferrus A, Pongs O (1987) Molecular organization of the maternal effect region of the Shaker complex of *Drosophila*: characterization of an I(A) channel transcript with homology to vertebrate Na channel. *The EMBO journal* **6**: 3419-3429
- Beeton C, Pennington MW, Norton RS (2011) Analogs of the sea anemone potassium channel blocker ShK for the treatment of autoimmune diseases. *Inflammation & allergy drug targets* **10**: 313-321

- Beeton C, Wulff H, Pennington M, Clot-Faybesse O, Barbaria J, Cahalan M, Chandy KG, Beraud E (2002) Kv1.3 channels in chronically activated autoreactive T cells: Novel therapeutic target for multiple sclerosis. *Biophysical Journal* **82**: 195a-195a
- Belém M (1988) Anatomy and biology of *Bunodosoma caissarum* Corrêa, 1964 (Cnidaria, Anthozoa, Actiniidae). I – Systematic position and morphological and microanatomical revision. *Anais Academia Brasileira Ciência* **61**: 342-353
- Beress L, Beress R (1975) Purification of three polypeptides with neuro- and cardiotoxic activity from the sea anemone *Anemonia sulcata*. *Toxicon* **13**: 359-367
- Beress L, Doppelfeld I-S, Etschenberg E, Graf E, Henschen A, Zwick J (1985) *Federal Republic of Germany Patent DE 3324689 A1*
- Berneche S, Roux B (2001) Energetics of ion conduction through the K⁺ channel. *Nature* **414**: 73-77
- Bezanilla F (2000) The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiological reviews* **80**: 555-592
- Bezanilla F (2008) Ion channels: from conductance to structure. *Neuron* **60**: 456-468
- Bezanilla F, Armstrong CM (1972) Negative conductance caused by entry of sodium and cesium ions into the potassium channels of squid axons. *The Journal of general physiology* **60**: 588-608
- Biggin PC, Roosild T, Choe S (2000) Potassium channel structure: domain by domain. *Current opinion in structural biology* **10**: 456-461
- Binford GJ (2001) An analysis of geographic and intersexual chemical variation in venoms of the spider *Tegenaria agrestis* (Agelenidae). *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* **39**: 955-968
- Blatz AL, Magleby KL (1986) Single apamin-blocked Ca-activated K⁺ channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle. *Nature* **323**: 718-720
- Blaxter M (1998) *Caenorhabditis elegans* is a nematode. *Science* **282**: 2041-2046
- Boland LM, Price DL, Jackson KA (1999) Episodic ataxia/myokymia mutations functionally expressed in the Shaker potassium channel. *Neuroscience* **91**: 1557-1564
- Brand JM, Blum MS, Barlin MR (1973) Fire ant venoms: intraspecific and interspecific variation among castes and individuals. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* **11**: 325-331
- Bretschneider F, Wrisch A, Lehmann-Horn F, Grissmer S (1999) Expression in mammalian cells and electrophysiological characterization of two mutant Kv1.1 channels causing episodic ataxia type 1 (EA-1). *The European journal of neuroscience* **11**: 2403-2412
- Brusca RC, Brusca GJ (2003) Chapter 2. In: *Invertebrates, 2 Edition edn Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc, Publishers*

- Butler A, Wei AG, Baker K, Salkoff L (1989) A family of putative potassium channel genes in *Drosophila*. *Science* **243**: 943-947
- Cahalan MD, Chandy KG (1997) Ion channels in the immune system as targets for immunosuppression. *Current opinion in biotechnology* **8**: 749-756
- Camargos TS, Restano-Cassulini R, Possani LD, Peigneur S, Tytgat J, Schwartz CA, Alves EM, de Freitas SM, Schwartz EF (2011) The new kappa-KTx 2.5 from the scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Peptides* **32**: 1509-1517
- Castaneda O, Harvey AL (2009) Discovery and characterization of cnidarian peptide toxins that affect neuronal potassium ion channels. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* **54**: 1119-1124
- Castaneda O, Sotolongo V, Amor AM, Stocklin R, Anderson AJ, Harvey AL, Engstrom A, Wernstedt C, Karlsson E (1995) Characterization of a potassium channel toxin from the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* **33**: 603-613
- Catterall WA (1988) Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science* **242**: 50-61
- Catterall WA, Cestele S, Yarov-Yarovoy V, Yu FH, Konoki K, Scheuer T (2007) Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon* **49**: 124-141
- Catterall WA, Yu FH, Yarov-Yarovoy V, Gutman GA (2005) Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacological Reviews* **57**: 387-395
- Chagot B, Diochot S, Pimentel C, Lazdunski M, Darbon H (2005a) Solution structure of APETx1 from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*: A new fold for an HERG toxin. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **59**: 380-386
- Chagot B, Pimentel C, Dai L, Pil J, Tytgat J, Nakajima T, Corzo G, Darbon H, Ferrat G (2005b) An unusual fold for potassium channel blockers: NMR structure of three toxins from the scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *The Biochemical journal* **388**: 263-271
- Chanda B, Asamoah OK, Blunck R, Roux B, Bezanilla F (2005) Gating charge displacement in voltage-gated ion channels involves limited transmembrane movement. *Nature* **436**: 852-856
- Chandy KG, Kalman K, Pennington MW, Lanigan MD, Nguyen A, Rauer H, Mahnir V, Paschetto K, Kem WR, Grissmer S, Gutman GA, Christian EP, Cahalan MD, Norton RS (1998) ShK-Dap(22), a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 32697-32707
- Chandy KG, Wulff H, Beeton C, Pennington M, Gutman GA, Cahalan MD (2004) K⁺ channels as targets for specific immunomodulation. *Trends in pharmacological sciences* **25**: 280-289
- Chen J, Zou A, Splawski I, Keating MT, Sanguinetti MC (1999) Long QT syndrome-associated mutations in the Per-Arnt-Sim (PAS) domain of HERG potassium channels accelerate channel deactivation. *The Journal of biological chemistry* **274**: 10113-10118

- Cheng J, Randall AZ, Sweredoski MJ, Baldi P (2005) SCRATCH: a protein structure and structural feature prediction server. *Nucleic acids research* **33**: W72-76
- Chippaux JP, Goyffon M (2006) [Venomous and poisonous animals--I. Overview]. *Medecine tropicale : revue du Corps de sante colonial* **66**: 215-220
- Choe S (2002) Potassium channel structures. *Nature reviews Neuroscience* **3**: 115-121
- Choe S, Kreusch A, Pfaffinger PJ (1999) Towards the three-dimensional structure of voltage-gated potassium channels. *Trends in biochemical sciences* **24**: 345-349
- Choi KL, Aldrich RW, Yellen G (1991) Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K⁺ channels. *P Natl Acad Sci USA* **88**: 5092-5095
- Christie MJ, North RA, Osborne PB, Douglass J, Adelman JP (1990) Heteropolymeric potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes from cloned subunits. *Neuron* **4**: 405-411
- Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B (1999) Molecular diversity of K⁺ channels. *Molecular and Functional Diversity of Ion Channels and Receptors* **868**: 233-285
- Coll JC, Labarre S, Sammarco PW, Williams WT, Bakus GJ (1982) Chemical Defenses in Soft Corals (Coelenterata, Octocorallia) of the Great Barrier-Reef - a Study of Comparative Toxicities. *Marine Ecology-Progress Series* **8**: 271-278
- Collins JF, Coulson AF (1990) Significance of protein sequence similarities. *Methods in enzymology* **183**: 474-487
- Colom LV, Diaz ME, Beers DR, Neely A, Xie WJ, Appel SH (1998) Role of potassium channels in amyloid-induced cell death. *Journal of neurochemistry* **70**: 1925-1934
- Corrêa DD (1964) Corallimorpharia e Actiniaria do Atlântico Oeste Tropical. PhD Thesis, Departamento de Zoologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.
- Cotton J, Crest M, Bouet F, Alessandri N, Gola M, Forest E, Karlsson E, Castaneda O, Harvey AL, Vita C, Menez A (1997) A potassium-channel toxin from the sea anemone *Bunodosoma granulifera*, an inhibitor for Kv1 channels. Revision of the amino acid sequence, disulfide-bridge assignment, chemical synthesis, and biological activity. *European journal of biochemistry / FEBS* **244**: 192-202
- Dai XQ, Kolic J, Marchi P, Sipione S, Macdonald PE (2009) SUMOylation regulates Kv2.1 and modulates pancreatic beta-cell excitability. *Journal of cell science* **122**: 775-779
- Daltry JC, Wuster W, Thorpe RS (1996) Diet and snake venom evolution. *Nature* **379**: 537-540
- Darling JA, Reitzel AM, Finnerty JR (2004) Regional population structure of a widely introduced estuarine invertebrate: *Nematostella vectensis* Stephenson in New England. *Molecular ecology* **13**: 2969-2981
- Daub J, Loukas A, Pritchard DI, Blaxter M (2000) A survey of genes expressed in adults of the human hookworm, *Necator americanus*. *Parasitology* **120 (Pt 2)**: 171-184

Dauplais M, Lecoq A, Song JX, Cotton J, Jamin N, Gilquin B, Roumestand C, Vita C, deMedeiros CLC, Rowan EG, Harvey AL, Menez A (1997) On the convergent evolution of animal toxins - Conservation of a diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structures. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 4302-4309

de Oliveira JS, Zaharenko AJ, de Freitas JC, Konno K, de Andrade SA, Portaro FC, Richardson M, Sant'anna OA, Tambourgi DV (2006) Caissarolysin I (Bcs I), a new hemolytic toxin from the Brazilian sea anemone *Bunodosoma caissarum*: purification and biological characterization. *Biochimica et biophysica acta* **1760**: 453-461

Demo SD, Yellen G (1992) Ion effects on gating of the Ca(2+)-activated K⁺ channel correlate with occupancy of the pore. *Biophysical Journal* **61**: 639-648

Deslippe RJ, Guo YJ (2000) Venom alkaloids of fire ants in relation to worker size and age. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* **38**: 223-232

Diochot S, Baron A, Rash LD, Deval E, Escoubas P, Scarzello S, Salinas M, Lazdunski M (2004) A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. *The EMBO journal* **23**: 1516-1525

Diochot S, Lazdunski M (2009) Sea anemone toxins affecting potassium channels. *Marine Toxins as Research Tools* **46**: 99-122

Diochot S, Loret E, Bruhn T, Beress L, Lazdunski M (2003) APETx1, a new toxin from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*, blocks voltage-gated human ether-a-go-go-related gene potassium channels. *Molecular Pharmacology* **64**: 59-69

Diochot S, Schweitz H, Beress L, Lazdunski M (1998) Sea anemone peptides with a specific blocking activity against the fast inactivating potassium channel Kv3.4. *The Journal of biological chemistry* **273**: 6744-6749

Dixon JE, Shi W, Wang HS, McDonald C, Yu H, Wymore RS, Cohen IS, McKinnon D (1996) Role of the Kv4.3 K⁺ channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. *Circulation research* **79**: 659-668

Dolly JO, Halliwell JV, Black JD, Williams RS, Pelchen-Matthews A, Breeze AL, Mehraban F, Othman IB, Black AR (1984) Botulinum neurotoxin and dendrotoxin as probes for studies on transmitter release. *Journal de physiologie* **79**: 280-303

Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**: 69-77

Driscoll PC, Gronenborn AM, Beress L, Clore GM (1989) Determination of the 3-Dimensional Solution Structure of the Antihypertensive and Antiviral Protein Bds-I from the Sea-Anemone *Anemonia-Sulcata* - a Study Using Nuclear Magnetic-Resonance and Hybrid Distance Geometry-Dynamical Simulated Annealing. *Biochemistry* **28**: 2188-2198

Dryga A, Chakrabarty S, Vicatos S, Warshel A (2012) Realistic simulation of the activation of voltage-gated ion channels. *P Natl Acad Sci USA* **109**: 3335-3340

- Duda TF, Jr., Chang D, Lewis BD, Lee T (2009) Geographic variation in venom allelic composition and diets of the widespread predatory marine gastropod *Conus ebraeus*. *PloS one* **4**: e6245
- Dunn DF (1981) The colwfish sea anemone. In: Mackie, GO (Ed) *Coelenterata Ecology and Behavior Plenum Press, New York*: 78-85
- Dunn SR, Phillips WS, Spatafora JW, Green DR, Weis VM (2006) Highly conserved caspase and Bcl-2 homologues from the sea anemone *Aiptasia pallida*: lower metazoans as models for the study of apoptosis evolution. *Journal of molecular evolution* **63**: 95-107
- Dutertre S, Biass D, Stocklin R, Favreau P (2010) Dramatic intraspecimen variations within the injected venom of *Conus consors*: an unsuspected contribution to venom diversity. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* **55**: 1453-1462
- Edman P (1950) Method for Determination of the Amino Acid Sequence in Peptides. *Acta Chemica Scandinavica* **4**: 283-293
- Eisenman G, Dani JA (1987) An introduction to molecular architecture and permeability of ion channels. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry* **16**: 205-226
- Elinder F, Mannikko R, Larsson HP (2001) S4 charges move close to residues in the pore domain during activation in a K channel. *The Journal of general physiology* **118**: 1-10
- Escoubas P, Diochot S, Celerier ML, Nakajima T, Lazdunski M (2002) Novel tarantula toxins for subtypes of voltage-dependent potassium channels in the Kv2 and Kv4 subfamilies. *Mol Pharmacol* **62**: 48-57
- Fedida D, Wible B, Wang Z, Fermini B, Faust F, Nattel S, Brown AM (1993) Identity of a novel delayed rectifier current from human heart with a cloned K⁺ channel current. *Circulation research* **73**: 210-216
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- Fenical W (1987) Marine Soft Corals of the Genus *Pseudopterogorgia* - a Resource for Novel Anti-Inflammatory Diterpenoids. *Journal of Natural Products* **50**: 1001-1008
- Ferreira Junior RS, Sciani JM, Marques-Porto R, Junior AL, Orsi Rde O, Barraviera B, Pimenta DC (2010) Africanized honey bee (*Apis mellifera*) venom profiling: Seasonal variation of melittin and phospholipase A(2) levels. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* **56**: 355-362
- Formankay JD, Clore GM, Driscoll PC, Wingfield P, Richards FM, Gronenborn AM (1989) A Proton Nuclear Magnetic-Resonance Assignment and Secondary Structure Determination of Recombinant Human Thioredoxin. *Biochemistry* **28**: 7088-7097
- Frazao B, Vasconcelos V, Antunes A (2012) Sea anemone (cnidaria, anthozoa, actiniaria) toxins: an overview. *Marine drugs* **10**: 1812-1851
- Fry BG, Roelants K, Champagne DE, Scheib H, Tyndall JD, King GF, Nevalainen TJ, Norman JA, Lewis RJ, Norton RS, Renjifo C, de la Vega RC (2009) The toxicogenomic multiverse: convergent

recruitment of proteins into animal venoms. *Annual review of genomics and human genetics* **10**: 483-511

Garcia-Calvo M, Leonard RJ, Novick J, Stevens SP, Schmalhofer W, Kaczorowski GJ, Garcia ML (1993) Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. *The Journal of biological chemistry* **268**: 18866-18874

Garcia ML, Gao Y, McManus OB, Kaczorowski GJ (2001) Potassium channels: from scorpion venoms to high-resolution structure. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* **39**: 739-748

Garcia ML, Garcia-Calvo M, Hidalgo P, Lee A, MacKinnon R (1994) Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent K⁺ channels from *Leiurus quinquestriatus* var. *hebraeus* venom. *Biochemistry* **33**: 6834-6839

Gems D, Ferguson CJ, Robertson BD, Nieves R, Page AP, Blaxter ML, Maizels RM (1995) An abundant, trans-spliced mRNA from *Toxocara canis* infective larvae encodes a 26-kDa protein with homology to phosphatidylethanolamine-binding proteins. *The Journal of biological chemistry* **270**: 18517-18522

Gems D, Maizels RM (1996) An abundantly expressed mucin-like protein from *Toxocara canis* infective larvae: the precursor of the larval surface coat glycoproteins. *P Natl Acad Sci USA* **93**: 1665-1670

Gendeh GS, Young LC, de Medeiros CL, Jeyaseelan K, Harvey AL, Chung MC (1997) A new potassium channel toxin from the sea anemone *Heteractis magnifica*: isolation, cDNA cloning, and functional expression. *Biochemistry* **36**: 11461-11471

Gibbs HL, Sanz L, Calvete JJ (2009) Snake population venomomics: proteomics-based analyses of individual variation reveals significant gene regulation effects on venom protein expression in *Sistrurus rattlesnakes*. *Journal of molecular evolution* **68**: 113-125

Gilquin B, Braud S, Eriksson MA, Roux B, Bailey TD, Priest BT, Garcia ML, Menez A, Gasparini S (2005) A variable residue in the pore of Kv1 channels is critical for the high affinity of blockers from sea anemones and scorpions. *The Journal of biological chemistry* **280**: 27093-27102

Gilquin B, Racape J, Wrisch A, Visan V, Lecoq A, Grissmer S, Menez A, Gasparini S (2002) Structure of the BgK-Kv1.1 complex based on distance restraints identified by double mutant cycles. Molecular basis for convergent evolution of Kv1 channel blockers. *The Journal of biological chemistry* **277**: 37406-37413

Gopalakrishnakone P, Srinivasan KN, Sivaraja V, Huys I, Sasaki T, Cheng B, Kumar TKS, Sato K, Tytgat J, Yu C, San BCC, Ranganathan S, Bowie HJ, Kini RM (2002) kappa-hefutoxin1, a novel toxin from the scorpion *Heterometrus fulvipes* with unique structure and function - Importance of the functional diad in potassium channel selectivity. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 30040-30047

Gunthorpe L, Cameron AM (1990) Widespread but Variable Toxicity in Scleractinian Corals. *Toxicon* **28**: 1199-1219

Gutman GA, Chandy KG, Adelman JP, Aiyar J, Bayliss DA, Clapham DE, Covarriubias M, Desir GV, Furuichi K, Ganetzky B, Garcia ML, Grissmer S, Jan LY, Karschin A, Kim D, Kuperschmidt S, Kurachi Y, Lazdunski M, Lesage F, Lester HA, McKinnon D, Nichols CG, O'Kelly I, Robbins J, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti M, Seino S, Stuehmer W, Tamkun MM, Vandenberg CA, Wei A, Wulff H, Wymore RS (2003) International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacological Reviews* **55**: 583-586

Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, Mckinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stuhmer W, Wang XL (2005) International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological Reviews* **57**: 473-508

Hart IK, Waters C, Vincent A, Newland C, Beeson D, Pongs O, Morris C, Newsom-Davis J (1997) Autoantibodies detected to expressed K⁺ channels are implicated in neuromyotonia. *Annals of neurology* **41**: 238-246

Harvey AJ, Gable RW, Baell JB (2005) A three-residue, continuous binding epitope peptidomimetic of ShK toxin as a Kv1.3 inhibitor. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **15**: 3193-3196

Hasegawa Y, Honma T, Nagai H, Ishida M, Nagashima Y, Shiomi K (2006) Isolation and cDNA cloning of a potassium channel peptide toxin from the sea anemone *Anemonia erythraea*. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* **48**: 536-542

Heginbotham L, Abramson T, MacKinnon R (1992) A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K⁺ channels. *Science* **258**: 1152-1155

Heginbotham L, Lu Z, Abramson T, MacKinnon R (1994) Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophysical Journal* **66**: 1061-1067

Heginbotham L, MacKinnon R (1992) The aromatic binding site for tetraethylammonium ion on potassium channels. *Neuron* **8**: 483-491

Hensley K, Carney JM, Mattson MP, Aksenova M, Harris M, Wu JF, Floyd RA, Butterfield DA (1994) A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *P Natl Acad Sci USA* **91**: 3270-3274

Herrington J, Zhou YP, Bugianesi RM, Dulski PM, Feng Y, Warren VA, Smith MM, Kohler MG, Garsky VM, Sanchez M, Wagner M, Raphaelli K, Banerjee P, Ahaghotu C, Wunderler D, Priest BT, Mehl JT, Garcia ML, McManus OB, Kaczorowski GJ, Slaughter RS (2006) Blockers of the delayed-rectifier potassium current in pancreatic beta-cells enhance glucose-dependent insulin secretion. *Diabetes* **55**: 1034-1042

Herzig V, John Ward R, Ferreira dos Santos W (2002) Intersexual variations in the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891). *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* **40**: 1399-1406

Hill RW, Wyse GA, Anderson M (2012a) Chapter 2 - Molecules and Cells in Animal Physiology In: *Animal Physiology* (Third Edition).

Hill RW, Wyse GA, Anderson M (2012b) Chapter 4 - Transport of Solutes and Water In: *Animal Physiology* (Third Edition).

Hill RW, Wyse GA, Anderson M (2012c) Chapter 11 - Neurons. In: Animal Physiology (Third Edition).

Hille B (1975) Ionic selectivity, saturation, and block in sodium channels. A four-barrier model. *The Journal of general physiology* **66**: 535-560

Hille B (2001) Chapter 3: The superfamily of voltage-gated channels. In: Ion channel of excitable membranes. *Sinauer associates, Inc Sunderland, MA*

Hille B, Schwarz W (1978) Potassium Channels as Multi-Ion Single-File Pores. *Journal of General Physiology* **72**: 409-442

Hodgkin AL, Huxley AF (1952a) Movement of sodium and potassium ions during nervous activity. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **17**: 43-52

Hodgkin AL, Huxley AF (1952b) Propagation of electrical signals along giant nerve fibers. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **140**: 177-183

Hodgkin AL, Huxley AF (1952c) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of physiology* **117**: 500-544

Hodgkin AL, Huxley AF, Katz B (1949) Ionic Currents Underlying Activity in the Giant Axon of the Squid. *Archives Des Sciences Physiologiques* **3**: 129-150

Holland P (2004) Developmental biology. The ups and downs of a sea anemone. *Science* **304**: 1255-1256

Holmgren M, Jurman ME, Yellen G (1996) Structure and function of the S4-S5 loop of the Shaker K⁺ channel examined through cysteine mutagenesis and chemical modification. *Journal of General Physiology* **108**: 195-206

Honma T, Kawahata S, Ishida M, Nagai H, Nagashima Y, Shiomi K (2008) Novel peptide toxins from the sea anemone *Stichodactyla haddoni*. *Peptides* **29**: 536-544

Honma T, Minagawa S, Nagai H, Ishida M, Nagashima Y, Shiomi K (2005) Novel peptide toxins from acrorhagi, aggressive organs of the sea anemone *Actinia equina*. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* **46**: 768-774

Honma T, Shiomi K (2006) Peptide toxins in sea anemones: structural and functional aspects. *Marine biotechnology* **8**: 1-10

Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW (1990) Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* **250**: 533-538

Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW (1991) Two types of inactivation in Shaker K⁺ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron* **7**: 547-556

Hwang PM, Fotuhi M, Brecht DS, Cunningham AM, Snyder SH (1993) Contrasting immunohistochemical localizations in rat brain of two novel K⁺ channels of the Shab subfamily. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **13**: 1569-1576

- Isom LL, Dejongh KS, Catterall WA (1994) Auxiliary Subunits of Voltage-Gated Ion Channels. *Neuron* **12**: 1183-1194
- Ito E, Oka K, Etcheberrigaray R, Nelson TJ, McPhie DL, Tofel-Grehl B, Gibson GE, Alkon DL (1994) Internal Ca²⁺ mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer disease. *P Natl Acad Sci USA* **91**: 534-538
- Jakubowski JA, Kelley WP, Sweedler JV, Gilly WF, Schulz JR (2005) Intraspecific variation of venom injected by fish-hunting *Conus* snails. *The Journal of experimental biology* **208**: 2873-2883
- Jenkinson DH (2006) Potassium channels--multiplicity and challenges. *British journal of pharmacology* **147 Suppl 1**: S63-71
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R (2002a) Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* **417**: 515-522
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R (2002b) The open pore conformation of potassium channels. *Nature* **417**: 523-526
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R (2003a) X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* **423**: 33-41
- Jiang Y, Ruta V, Chen J, Lee A, MacKinnon R (2003b) The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* **423**: 42-48
- Kaas Q, Westermann JC, Halai R, Wang CK, Craik DJ (2008) ConoServer, a database for conopeptide sequences and structures. *Bioinformatics* **24**: 445-446
- Kalapothakis E, Chavez-Olortegui C (1997) Venom variability among several *Tityus serrulatus* specimens. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* **35**: 1523-1529
- Kalman K, Pennington MW, Lanigan MD, Gutman GA, Cahalan MD, Norton RS, Chandy KG (1999) ShK-Dap(22): Targeted design of a Kv1.3-specific blocker. *Biophysical Journal* **76**: A410-A410
- Kalman K, Pennington MW, Lanigan MD, Nguyen A, Rauer H, Mahnir V, Paschetto K, Kem WR, Grissmer S, Gutman GA, Christian EP, Cahalan MD, Norton RS, Chandy KG (1998) ShK-Dap22, a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide. *The Journal of biological chemistry* **273**: 32697-32707
- Kamb A, Iverson LE, Tanouye MA (1987) Molecular characterization of Shaker, a *Drosophila* gene that encodes a potassium channel. *Cell* **50**: 405-413
- Kayano T, Noda M, Flockerzi V, Takahashi H, Numa S (1988) Primary structure of rat brain sodium channel III deduced from the cDNA sequence. *FEBS letters* **228**: 187-194
- Kong W, Po S, Yamagishi T, Ashen MD, Stetten G, Tomaselli GF (1998) Isolation and characterization of the human gene encoding Ito: further diversity by alternative mRNA splicing. *The American journal of physiology* **275**: H1963-1970

Kristan KC, Viero G, Dalla Serra M, Macek P, Anderluh G (2009) Molecular mechanism of pore formation by actinoporins. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* **54**: 1125-1134

Kuryshv YA, Gudz TI, Brown AM, Wible BA (2000) KChAP as a chaperone for specific K(+) channels. *American journal of physiology Cell physiology* **278**: C931-941

Lagos P, Duran R, Cervenansky C, Freitas JC, Silveira R (2001) Identification of hemolytic and neuroactive fractions in the venom of the sea anemone *Bunodosoma cangicum*. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]* **34**: 895-902

Lai HC, Jan LY (2006) The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels. *Nat Rev Neurosci* **7**: 548-562

Laine M, Lin MC, Bannister JP, Silverman WR, Mock AF, Roux B, Papazian DM (2003) Atomic proximity between S4 segment and pore domain in Shaker potassium channels. *Neuron* **39**: 467-481

Laine M, Papazian DM, Roux B (2004) Critical assessment of a proposed model of Shaker. *FEBS letters* **564**: 257-263

Lanigan MD, Tudor JE, Pennington MW, Norton RS (2001) A helical capping motif in ShK toxin and its role in helix stabilization. *Biopolymers* **58**: 422-436

Lanio ME, Morera V, Alvarez C, Tejuca M, Gomez T, Pazos F, Besada V, Martinez D, Huerta V, Padron G, de los Angeles Chavez M (2001) Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* **39**: 187-194

Larsson HP, Baker OS, Dhillon DS, Isacoff EY (1996) Transmembrane movement of the shaker K+ channel S4. *Neuron* **16**: 387-397

Laskowski RA, Macarthur MW, Moss DS, Thornton JM (1993) Procheck - a Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. *Journal of Applied Crystallography* **26**: 283-291

Lassen S, Helmholz H, Ruhnau C, Prange A (2010) Characterisation of neurotoxic polypeptides from *Cyanea capillata* medusae (Scyphozoa). *Hydrobiologia* **645**: 213-221

Ledwell JL, Aldrich RW (1999) Mutations in the S4 region isolate the final voltage-dependent cooperative step in potassium channel activation. *The Journal of general physiology* **113**: 389-414

Lee CW, Kim S, Roh SH, Endoh H, Kodera Y, Maeda T, Kohno T, Wang JM, Swartz KJ, Kim JI (2004) Solution structure and functional characterization of SGTx1, a modifier of Kv2.1 channel gating. *Biochemistry* **43**: 890-897

Lenz S, Perney TM, Qin Y, Robbins E, Chesselet MF (1994) GABA-ergic interneurons of the striatum express the Shaw-like potassium channel Kv3.1. *Synapse* **18**: 55-66

- Lewis RJ, Garcia ML (2003) Therapeutic potential of venom peptides. *Nature reviews Drug discovery* **2**: 790-802
- Li-Smerin Y, Swartz KJ (2000) Localization and molecular determinants of the Hanatoxin receptors on the voltage-sensing domains of a K(+) channel. *The Journal of general physiology* **115**: 673-684
- Liu P, Jo S, Bean BP (2012) Modulation of neuronal sodium channels by the sea anemone peptide BDS-I. *Journal of Neurophysiology* **107**: 3155-3167
- Liu Y, Holmgren M, Jurman ME, Yellen G (1997) Gated access to the pore of a voltage-dependent K⁺ channel. *Neuron* **19**: 175-184
- Long SB, Campbell EB, Mackinnon R (2005a) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* **309**: 897-903
- Long SB, Campbell EB, Mackinnon R (2005b) Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* **309**: 903-908
- Long SB, Tao X, Campbell EB, MacKinnon R (2007) Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* **450**: 376-382
- Lopez-Barneo J, Hoshi T, Heinemann SH, Aldrich RW (1993) Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of Shaker potassium channels. *Receptors & channels* **1**: 61-71
- Lopez GA, Jan YN, Jan LY (1994) Evidence that the S6 segment of the Shaker voltage-gated K⁺ channel comprises part of the pore. *Nature* **367**: 179-182
- Ma Y, Zhao Y, Zhao R, Zhang W, He Y, Wu Y, Cao Z, Guo L, Li W (2010) Molecular diversity of toxic components from the scorpion *Heterometrus petersii* venom revealed by proteomic and transcriptome analysis. *Proteomics* **10**: 2471-2485
- MacKessy SP, Williams K, Ashon KG (2003) Ontogenetic variation in venom composition and diet of *Crotalus oreganus concolor*: A case of venom paedomorphosis? *Copeia*: 769-782
- MacKinnon R (1991a) Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* **350**: 232-235
- MacKinnon R (1991b) New insights into the structure and function of potassium channels. *Current Opinion in Neurobiology* **1**: 14-19
- MacKinnon R, Miller C (1989) Mutant potassium channels with altered binding of charybdotoxin, a pore-blocking peptide inhibitor. *Science* **245**: 1382-1385
- Malpezzi ELA, Defreitas JC, Muramoto K, Kamiya H (1993) Characterization of Peptides in Sea-Anemone Venom Collected by a Novel Procedure. *Toxicon* **31**: 853-864
- Malpezzi ELA, Freitas JC (1991) Hemolytic-Activity of the Nematocyst Venom from the Sea-Anemone *Bunodosoma-Caissarum*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **24**: 1245-1249

- Mannuzzu LM, Moronne MM, Isacoff EY (1996) Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating. *Science* **271**: 213-216
- Martins RD, Alves RS, Martins AM, Barbosa PS, Evangelista JS, Evangelista JJ, Ximenes RM, Toyama MH, Toyama DO, Souza AJ, Orts DJ, Marangoni S, de Menezes DB, Fonteles MC, Monteiro HS (2009) Purification and characterization of the biological effects of phospholipase A(2) from sea anemone *Bunodosoma caissarum*. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* **54**: 413-420
- Marvin L, De E, Cosette P, Gagnon J, Molle G, Lange C (1999) Isolation, amino acid sequence and functional assays of SGTx1. The first toxin purified from the venom of the spider *Scodra griseipes*. *European journal of biochemistry / FEBS* **265**: 572-579
- Mattson MP, Barger SW, Cheng B, Lieberburg I, Smith-Swintosky VL, Rydel RE (1993) beta-Amyloid precursor protein metabolites and loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* **16**: 409-414
- Mebis D (1994) Anemonefish symbiosis: vulnerability and resistance of fish to the toxin of the sea anemone. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* **32**: 1059-1068
- Milescu M, Vobecky J, Roh SH, Kim SH, Jung HJ, Kim JI, Swartz KJ (2007) Tarantula toxins interact with voltage sensors within lipid membranes. *The Journal of general physiology* **130**: 497-511
- Miller C, Moczydlowski E, Latorre R, Phillips M (1985) Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca²⁺-activated K⁺ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature* **313**: 316-318
- Miller DJ, Ball EE, Technau U (2005) Cnidarians and ancestral genetic complexity in the animal kingdom. *Trends in genetics : TIG* **21**: 536-539
- Minagawa S, Ishida M, Nagashima Y, Shiomi K (1998) Primary structure of a potassium channel toxin from the sea anemone *Actinia equina*. *FEBS letters* **427**: 149-151
- Moller C, Rahmankhah S, Lauer-Fields J, Bubis J, Fields GB, Mari F (2005) A novel conotoxin framework with a helix-loop-helix (Cs alpha/alpha) fold. *Biochemistry* **44**: 15986-15996
- Monaghan KP, Beeton C, Wulff H, Calabresi P, Chandy GK (2007) Kv1.3 channels: Therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. *Neurology* **68**: A339-A340
- Monteiro FA, Russo CA, Solé-Cava AM (1998) Genetic evidence for the asexual origin of small individuals found in the coelenteron of the sea anemone *Actinia bermudensis* McMurrich. *Bull Mar Sci* **63**: 257-264
- Morais-Cabral JH, Zhou Y, MacKinnon R (2001) Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature* **414**: 37-42
- Moran Y, Gordon D, Gurevitz M (2009) Sea anemone toxins affecting voltage-gated sodium channels - molecular and evolutionary features. *Toxicon* **54**: 1089-1101
- Moran Y, Gurevitz M (2006) When positive selection of neurotoxin genes is missing - The riddle of the sea anemone *Nematostella vectensis*. *FEBS Journal* **273**: 3886-3892

Moran Y, Weinberger H, Sullivan JC, Reitzel AM, Finnerty JR, Gurevitz M (2008) Concerted evolution of sea anemone neurotoxin genes is revealed through analysis of the *Nematostella vectensis* genome. *Molecular Biology and Evolution* **25**: 737-747

Mouhat S, Jouirou B, Mosbah A, De Waard M, Sabatier JM (2004a) Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochem J* **378**: 717-726

Mouhat S, Mosbah A, Visan V, Wulff H, Delepierre M, Darbon H, Grissmer S, De Waard M, Sabatier JM (2004b) The 'functional' dyad of scorpion toxin Pi1 is not itself a prerequisite for toxin binding to the voltage-gated Kv1.2 potassium channels. *Biochem J* **377**: 25-36

Mullins L (1959) The penetration of some cations into muscle. *The Journal of general physiology* **42**: 817-829

Murakoshi H, Trimmer JS (1999) Identification of the Kv2.1 K⁺ channel as a major component of the delayed rectifier K⁺ current in rat hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **19**: 1728-1735

Nagado T, Arimura K, Sonoda Y, Kurono A, Horikiri Y, Kameyama A, Kameyama M, Pongs O, Osame M (1999) Potassium current suppression in patients with peripheral nerve hyperexcitability. *Brain : a journal of neurology* **122 (Pt 11)**: 2057-2066

Nakahira K, Shi G, Rhodes KJ, Trimmer JS (1996) Selective interaction of voltage-gated K⁺ channel beta-subunits with alpha-subunits. *The Journal of biological chemistry* **271**: 7084-7089

Narahashi T, Moore JW, Scott WR (1964) Tetrodotoxin Blockage of Sodium Conductance Increase in Lobster Giant Axons. *The Journal of general physiology* **47**: 965-974

Nei M, Rooney AP (2005) Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annual review of genetics* **39**: 121-152

Nevalainen TJ, Peuravuori HJ, Quinn RJ, Llewellyn LE, Benzie JA, Fenner PJ, Winkel KD (2004) Phospholipase A2 in cnidaria. *Comparative biochemistry and physiology Part B, Biochemistry & molecular biology* **139**: 731-735

Newton KA, Clench MR, Deshmukh R, Jeyaseelan K, Strong PN (2007) Mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of the Indian red scorpion, *Mesobuthus tamulus*: biotope-specific variation in the expression of venom peptides. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* **21**: 3467-3476

Nirathanan S, Pil J, Abdel-Mottaleb Y, Sugahara Y, Gopalakrishnakone P, Joseph JS, Sato K, Tytgat J (2005) Assignment of voltage-gated potassium channel blocking activity to kappa-KTx1.3, a non-toxic homologue of kappa-hefutoxin-1, from *Heterometrus spinifer* venom. *Biochemical pharmacology* **69**: 669-678

Noda M, Shimizu S, Tanabe T, Takai T, Kayano T, Ikeda T, Takahashi H, Nakayama H, Kanaoka Y, Minamino N, et al. (1984) Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* **312**: 121-127

Noskov SY, Berneche S, Roux B (2004) Control of ion selectivity in potassium channels by electrostatic and dynamic properties of carbonyl ligands. *Nature* **431**: 830-834

Nunez V, Cid P, Sanz L, De La Torre P, Angulo Y, Lomonte B, Gutierrez JM, Calvete JJ (2009) Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Peru and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. *Journal of proteomics* **73**: 57-78

Oliveira JS, Redaelli E, Zaharenko AJ, Cassulini RR, Konno K, Pimenta DC, Freitas JC, Clare JJ, Wanke E (2004) Binding specificity of sea anemone toxins to Na-v 1.1-1.6 sodium channels. Unexpected contributions from differences in the IV/S3-S4 outer loop (vol 279, pg 33323, 2004). *Journal of Biological Chemistry* **279**: 44229-44229

Oliveira JS, Zaharenko AJ, Ferreira WA, Jr., Konno K, Shida CS, Richardson M, Lucio AD, Beirao PS, de Freitas JC (2006) BclV, a new paralyzing peptide obtained from the venom of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. A comparison with the Na⁺ channel toxin BclIII. *Biochimica et biophysica acta* **1764**: 1592-1600

Papazian DM, Schwarz TL, Tempel BL, Jan YN, Jan LY (1987) Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* **237**: 749-753

Papazian DM, Shao XM, Seoh SA, Mock AF, Huang Y, Wainstock DH (1995) Electrostatic interactions of S4 voltage sensor in Shaker K⁺ channel. *Neuron* **14**: 1293-1301

Papazian DM, Timpe LC, Jan YN, Jan LY (1991) Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature* **349**: 305-310

Pardo LA, Heinemann SH, Terlau H, Ludewig U, Lorra C, Pongs O, Stuhmer W (1992) Extracellular K⁺ specifically modulates a rat brain K⁺ channel. *P Natl Acad Sci USA* **89**: 2466-2470

Payandeh J, Scheuer T, Zheng N, Catterall WA (2011) The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* **475**: 353-358

Peigneur S, Beress L, Moller C, Mari F, Forssmann WG, Tytgat J (2012) A natural point mutation changes both target selectivity and mechanism of action of sea anemone toxins. *Faseb J* **26**: 5141-5151

Peigneur S, Billen B, Derua R, Waelkens E, Debaveye S, Beress L, Tytgat J (2011) A bifunctional sea anemone peptide with Kunitz type protease and potassium channel inhibiting properties. *Biochemical pharmacology* **82**: 81-90

Pennington M, ME B, I Z, I K, J DC, DS K, R H, V M, WA V, W G, WR K (1995a) Chemical synthesis and characterization of ShK toxin: a potent K_v channel inhibitor from a sea anemone. *International Journal Peptide Protein Research* **46**: 354-358

Pennington MW, Kem WR, Mahnir VM, Byrnes ME, Zaydenberg I, Khaytin I, Krafte DS, Hill R (1995b) Identification of essential residues in the potassium channel inhibitor ShK toxin: analysis of monosubstituted analogs. In: *Kaumaya, PTP, Hodges, RS (Eds), Peptides: Chemistry, Structure and Biology Escom, Leiden, Netherlands*: 14-16

- Perney TM, Marshall J, Martin KA, Hockfield S, Kaczmarek LK (1992) Expression of the mRNAs for the Kv3.1 potassium channel gene in the adult and developing rat brain. *Journal of Neurophysiology* **68**: 756-766
- Perozo E, MacKinnon R, Bezanilla F, Stefani E (1993) Gating currents from a nonconducting mutant reveal open-closed conformations in Shaker K⁺ channels. *Neuron* **11**: 353-358
- Pimenta AM, De Marco Almeida F, de Lima ME, Martin-Eauclaire MF, Bougis PE (2003) Individual variability in *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae) venom elicited by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* **17**: 413-418
- Pongs O, Kecskemethy N, Muller R, Krah-Jentgens I, Baumann A, Kiltz HH, Canal I, Llamazares S, Ferrus A (1988) Shaker encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of *Drosophila*. *The EMBO journal* **7**: 1087-1096
- Racape J, Lecoq A, Romi-Lebrun R, Liu J, Kohler M, Garcia ML, Menez A, Gasparini S (2002) Characterization of a novel radiolabeled peptide selective for a subpopulation of voltage-gated potassium channels in mammalian brain. *The Journal of biological chemistry* **277**: 3886-3893
- Ragsdale DS, Mcphee JC, Scheuer T, Catterall WA (1994) Molecular Determinants of State-Dependent Block of Na⁺ Channels by Local-Anesthetics. *Science* **265**: 1724-1728
- Ramachandran GN, Ramakrishnan C, Sasisekharan V (1963) Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *Journal of Molecular Biology* **7**: 95-99
- Rashid MH, Kuyucak S (2012) Affinity and Selectivity of ShK Toxin for the Kv1 Potassium Channels from Free Energy Simulations. *The journal of physical chemistry B*
- Rauer H, Pennington M, Cahalan M, Candi KG (1999) Structural conservation of the pores of calcium-activated and voltage-gated potassium channels determined by a sea anemone toxin. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 21885–21892
- Rees B, Bilwes A (1993) Three-dimensional structures of neurotoxins and cardiotoxins. *Chemical research in toxicology* **6**: 385-406
- Reitzel AM, Darling JA, Sullivan JC, Finnerty JR (2008) Global population genetic structure of the starlet anemone *Nematostella vectensis*: multiple introductions and implications for conservation policy. *Biological Invasions* **10**: 1197-1213
- Rettig J, Heinemann SH, Wunder F, Lorra C, Parcej DN, Dolly JO, Pongs O (1994) Inactivation properties of voltage-gated K⁺ channels altered by presence of beta-subunit. *Nature* **369**: 289-294
- Roden DM, Kupersmidt S (1999) From genes to channels: normal mechanisms. *Cardiovascular research* **42**: 318-326
- Rodriguez de la Vega RC, Possani LD (2004) Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* **43**: 865-875

- Rogowski RS, Collins JH, O'Neill TJ, Gustafson TA, Werkman TR, Rogawski MA, Tenenholz TC, Weber DJ, Blaustein MP (1996) Three new toxins from the scorpion *Pandinus imperator* selectively block certain voltage-gated K⁺ channels. *Molecular Pharmacology* **50**: 1167-1177
- Rudy B (2010) Voltage-gated K⁺ channels. In: Ion channel - form structure to function (2nd edition).
- Sabatier JM, Jouirou B, Mouhat S, Andreotti N, De Waard M (2004a) Toxin determinants required for interaction with voltage-gated K⁺ channels. *Toxicon* **43**: 909-914
- Sabatier JM, Mouhat S, Andreotti N, Jouirou B (2008) Animal toxins acting on voltage-gated potassium channels. *Current Pharmaceutical Design* **14**: 2503-2518
- Sabatier JM, Mouhat S, De Waard M (2005) Contribution of the functional dyad of animal toxins acting on voltage-gated Kv1-type channels. *Journal of Peptide Science* **11**: 65-68
- Sabatier JM, Mouhat S, Mosbah A, Visan V, Wulff H, Delepierre M, Darbon H, Grissmer S, De Waard M (2004b) The 'functional' dyad of scorpion toxin Pi1 is not itself a prerequisite for toxin binding to the voltage-gated Kv1.2 potassium channels. *Biochemical Journal* **377**: 25-36
- Sabourault C, Ganot P, Deleury E, Allemand D, Furla P (2009) Comprehensive EST analysis of the symbiotic sea anemone, *Anemonia viridis*. *BMC genomics* **10**: 333
- Saitou N, Nei M (1987) The Neighbor-Joining Method - a New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406-425
- Sali A, Blundell TL (1993) Comparative Protein Modeling by Satisfaction of Spatial Restraints. *Journal of Molecular Biology* **234**: 779-815
- Sanchez-Rodriguez J, Zugasti-Cruz A, Burnett JW (2001) Cutaneous stings from *Bartholomea annulata*. *Contact dermatitis* **44**: 314-315
- Sanguinetti MC, Spector PS (1997) Potassium channelopathies. *Neuropharmacology* **36**: 755-762
- Schneider MF, Chandler WK (1973) Voltage dependent charge movement of skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling. *Nature* **242**: 244-246
- Schoppa NE, Sigworth FJ (1998) Activation of Shaker potassium channels. III. An activation gating model for wild-type and V2 mutant channels. *The Journal of general physiology* **111**: 313-342
- Schweitz H, Bruhn T, Guillemare E, Moinier D, Lancelin JM, Beress L, Lazdunski M (1995) Kaliclidines and kaliseptine. Two different classes of sea anemone toxins for voltage sensitive K⁺ channels. *The Journal of biological chemistry* **270**: 25121-25126
- Seoh SA, Sigg D, Papazian DM, Bezanilla F (1996) Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel. *Neuron* **16**: 1159-1167
- Serodio P, Rudy B (1998) Differential expression of Kv4 K⁺ channel subunits mediating subthreshold transient K⁺ (A-type) currents in rat brain. *Journal of Neurophysiology* **79**: 1081-1091

Sheppard CRC (1979) Interspecific Aggression between Reef Corals with Reference to Their Distribution. *Marine Ecology-Progress Series* **1**: 237-247

Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M (2000) Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacological Reviews* **52**: 557-594

Shieh CC, Kirsch GE (1994) Mutational analysis of ion conduction and drug binding sites in the inner mouth of voltage-gated K⁺ channels. *Biophysical Journal* **67**: 2316-2325

Shillito P, Molenaar PC, Vincent A, Leys K, Zheng W, van den Berg RJ, Plomp JJ, van Kempen GT, Chauplannaz G, Wintzen AR, et al. (1995) Acquired neuromyotonia: evidence for autoantibodies directed against K⁺ channels of peripheral nerves. *Annals of neurology* **38**: 714-722

Smith-Maxwell CJ, Ledwell JL, Aldrich RW (1998) Role of the S4 in cooperativity of voltage-dependent potassium channel activation. *The Journal of general physiology* **111**: 399-420

Smith PL, Baukrowitz T, Yellen G (1996) The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* **379**: 833-836

Snyders DJ (1999) Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovascular research* **42**: 377-390

Spector PS, Curran ME, Zou A, Keating MT, Sanguinetti MC (1996) Fast inactivation causes rectification of the IKr channel. *The Journal of general physiology* **107**: 611-619

Stuhmer W, Conti F, Suzuki H, Wang XD, Noda M, Yahagi N, Kubo H, Numa S (1989) Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* **339**: 597-603

Swartz KJ (2007) Tarantula toxins interacting with voltage sensors in potassium channels. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* **49**: 213-230

Swartz KJ, MacKinnon R (1995) An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarantula. *Neuron* **15**: 941-949

Swartz KJ, MacKinnon R (1997a) Hanatoxin modifies the gating of a voltage-dependent K⁺ channel through multiple binding sites. *Neuron* **18**: 665-673

Swartz KJ, MacKinnon R (1997b) Mapping the receptor site for hanatoxin, a gating modifier of voltage-dependent K⁺ channels. *Neuron* **18**: 675-682

Takahashi H, Kim JI, Min HJ, Sato K, Swartz KJ, Shimada I (2000) Solution structure of hanatoxin1, a gating modifier of voltage-dependent K(+) channels: common surface features of gating modifier toxins. *Journal of Molecular Biology* **297**: 771-780

Talvinen KA, Nevalainen TJ (2002) Cloning of a novel phospholipase A2 from the cnidarian *Adamsia carciniopados*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **132**: 571-578

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1596-1599

- Tanabe T, Takeshima H, Mikami A, Flockerzi V, Takahashi H, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Hirose T, Numa S (1987) Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* **328**: 313-318
- Tasaki I, Hagiwar AS (1957) Demonstration of two stable potential states in the squid giant axon under tetraethylammonium chloride. *The Journal of general physiology* **40**: 859-885
- Thorington GU, Hessinger DA (1998) Efferent mechanisms of discharging Cnidae: II. A nematocyst release response in the sea anemone tentacle. *Biological Bulletin* **195**: 145-155
- Tibballs J (2006) Australian venomous jellyfish, envenomation syndromes, toxins and therapy. *Toxicon* **48**: 830-859
- Tiwari-Woodruff SK, Schulteis CT, Mock AF, Papazian DM (1997) Electrostatic interactions between transmembrane segments mediate folding of Shaker K⁺ channel subunits. *Biophysical Journal* **72**: 1489-1500
- Torres A, Kuchel P (2004) The b-defensin-fold family of polypeptides. *Toxicon* **44**: 581-588
- Tudor JE, Pallaghy PK, Pennington MW, Norton RS (1996) Solution structure of ShK toxin, a novel potassium channel inhibitor from a sea anemone. *Nature structural biology* **3**: 317-320
- Vacher H, Mohapatra DP, Trimmer JS (2008) Localization and targeting of voltage-dependent ion channels in mammalian central neurons. *Physiological reviews* **88**: 1407-1447
- Vandendriessche T, Kopljar I, Jenkins DP, Diego-Garcia E, Abdel-Mottaleb Y, Vermassen E, Clynen E, Schoofs L, Wulff H, Snyders D, Tytgat J (2012) Purification, molecular cloning and functional characterization of HelaTx1 (*Heterometrus laoticus*): the first member of a new kappa-KTX subfamily. *Biochemical pharmacology* **83**: 1307-1317
- Veh RW, Lichtinghagen R, Sewing S, Wunder F, Grumbach IM, Pongs O (1995) Immunohistochemical localization of five members of the Kv1 channel subunits: contrasting subcellular locations and neuron-specific co-localizations in rat brain. *The European journal of neuroscience* **7**: 2189-2205
- Vincent GM, Timothy K, Fox J, Zhang L (1999) The inherited long QT syndrome: from ion channel to bedside. *Cardiology in review* **7**: 44-55
- Wang Z, Fermini B, Nattel S (1993) Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes. Evidence for a novel delayed rectifier K⁺ current similar to Kv1.5 cloned channel currents. *Circulation research* **73**: 1061-1076
- Wang ZR, Robertson B, Fedida D (2007) Gating currents from a Kv3 subfamily potassium channel: charge movement and modification by BDS-II toxin. *Journal of Physiology-London* **584**: 755-767
- Welsh JH (1964) Composition + Mode of Action of Some Invertebrate Venoms. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **4**: 293-&
- Wilson PW (1997) An epidemiologic perspective of systemic hypertension, ischemic heart disease, and heart failure. *The American journal of cardiology* **80**: 3J-8J

Wulff H, Castle NA, Pardo LA (2009) Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery* **8**: 982-1001

Xu J, Li M (1998) Auxiliary subunits of Shaker-type potassium channels. *Trends in cardiovascular medicine* **8**: 229-234

Yamaguchi Y, Hasegawa Y, Honma T, Nagashima Y, Shiomi K (2010) Screening and cDNA cloning of Kv1 potassium channel toxins in sea anemones. *Marine drugs* **8**: 2893-2905

Yan LZ, Herrington J, Goldberg E, Dulski PM, Bugianesi RM, Slaughter RS, Banerjee P, Brochu RM, Priest BT, Kaczorowski GJ, Rudy B, Garcia ML (2005) Stichodactyla helianthus peptide, a pharmacological tool for studying Kv3.2 channels. *Molecular Pharmacology* **67**: 1513-1521

Yang N, Horn R (1995) Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels. *Neuron* **15**: 213-218

Yankner BA (1996) Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron* **16**: 921-932

Yellen G (1998) The moving parts of voltage-gated ion channels. *Quarterly reviews of biophysics* **31**: 239-295

Yellen G (2002) The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* **419**: 35-42

Yeung SYM, Thompson D, Wang Z, Fedida D, Robertson B (2005) Modulation of Kv3 subfamily potassium currents by the sea anemone toxin BDS: Significance for CNS and biophysical studies. *Journal of Neuroscience* **25**: 8735-8745

Yount NY, Kupferwasser D, Spisni A, Dutz SM, Ramjan ZH, Sharma S, Waring AJ, Yeaman MR (2009) Selective reciprocity in antimicrobial activity versus cytotoxicity of hBD-2 and crodamine. *P Natl Acad Sci USA* **106**: 14972-14977

Yu F, Catterall W (2003) Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome biology* **4**: 207

Yu F, Catterall W (2004) The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2004**: re15

Zagotta WN, Hoshi T, Aldrich RW (1990) Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science* **250**: 568-571

Zaharenko AJ, Ferreira WA, Jr., Oliveira JS, Richardson M, Pimenta DC, Konno K, Portaro FC, de Freitas JC (2008) Proteomics of the neurotoxic fraction from the sea anemone *Bunodosoma cangicum* venom: Novel peptides belonging to new classes of toxins. *Comparative biochemistry and physiology Part D, Genomics & proteomics* **3**: 219-225

Zaharenko AJ, Picolo G, Ferreira WA, Jr., Murakami T, Kazuma K, Hashimoto M, Cury Y, de Freitas JC, Satake M, Konno K (2011) Bunodosine 391: an analgesic acylamino acid from the venom of the sea anemone *Bunodosoma cangicum*. *Journal of Natural Products* **74**: 378-382

Zaharenko AJ, Picolo G, Ferreira WA, Murakami T, Kazuma K, Hashimoto M, Cury Y, de Freitas JC, Konno K (2012) Bunodosines: novel analgesic acylamino acids from the venom of the sea anemone *Bunodosoma cangicum*. *Planta Medica* **78**: 1148-1148

Zamponi M, MJC B, E S, FH A (1998) Distribution and some ecological aspects of Corallimorpharia and Actiniaria from shallow waters of the South American Atlantic Coast. *Physis—A* **55**: 31-34

Zhang M, Liu XS, Diochot S, Lazdunski M, Tseng GN (2007) APETx1 from sea anemone *Anthopleura elegantissima* is a gating modifier peptide toxin of the human Ether-a-go-go-related potassium channel. *Molecular Pharmacology* **72**: 259-268

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