

Protein composition and enzymatic activity of venom from the scorpion *Rhopalurus junceus*

Havana City, May 12, 2008

Study performed by:

Molecular Biology Laboratory

Microbiology Division

Pedro Kouri Institute for Tropical Medicine (IPK)

Autopista Novia del Mediodía km 6 1/2 La Lisa, C. Habana

Sommario

Avviso	3
Dichiarazione di conformità alle buone pratiche di laboratorio	4
Dichiarazione su Accuratezza e integrità dei risultati e protezione dei dati scientifici	5
Background	6
Obiettivi	6
Metodologia sperimentale	7
Modifiche al piano di studi	8
Dati campione	8
Risultati	9
Conclusioni	13
Riferimenti	14
Lista delle firme	15

Avviso:

Il laboratorio di biologia molecolare dell'Istituto Pedro Kouri per la medicina tropicale (IPK) ha realizzato lo studio dal titolo Scoperta proteica e attività enzimatica del veleno dallo scorpione *Rhopalurus junceus*. Un campione di ritenzione di dimensioni adeguate del composto in esame, conservato presso il dipartimento di controllo qualità dei laboratori farmaceutici biologici (LABIOFAM), è disponibile per l'ispezione da parte delle autorità sanitarie competenti.

Firmando qui di seguito garantiamo l'identificazione e la classificazione di tutti i materiali, documenti e registri impiegati durante la conduzione di tale studio per un periodo di 1 anno, a partire dalla data di preparazione di questo rapporto, per tutti gli scopi in esame da parte di tali autorità.

Alexis Díaz García, MSc.
Direttore del Dipartimento di Studi

Odelaysis Suárez, BSc.
Laboratorio di Biologia Molecolare
IPK

Dichiarazione di conformità con Good Laboratory Practices

Lo studio intitolato **Composizione proteica ed attività enzimatica del veleno dallo Scorpione *Rhopalurus junceus***, che si è svolto presso il Laboratorio di Biologia Molecolare dell'Istituto di Medicina Tropicale Pedro Kourí (IPK) da giugno 2003 a settembre 2005, è stato eseguito in conformità con le linee guida istituzionali per il Bene. Pratiche di laboratorio stabilite per detto laboratorio, comprendenti i seguenti aspetti:

- Preparazione dei protocolli di studio
- Preparazione di supporti e soluzioni
- Applicazione e valutazione dei composti Raccolta di dati originali
- Elaborazione statistica
- Redazione del rapporto contenente i risultati

Durante l'esecuzione dello studio non sono state rilevate anomalie o alterazioni che potrebbero compromettere l'integrità dei risultati.

Alexis Díaz García, MSc.
Direttore del Dipartimento di Studi,

Odelaysis Suárez
Laboratorio di Biologia Molecolare
IPK

Dichiarazione sulla precisione e integrità dei risultati e sulla protezione dei dati scientifici

Le persone elencate e firmate di seguito

STATO DI HEREBY:

1. Che i risultati dello studio La composizione proteica e l'attività enzimatica del veleno dallo scorpione *Rhopalurus junceus*, il cui rapporto è allegato al presente documento, corrispondano esattamente e completamente all'oggetto dello studio in conformità con le risorse umane e materiali impiegate e le procedure e le tecniche seguite, come previsto nel protocollo e dichiarate nel rapporto di cui sopra.

2. Che i membri del gruppo di ricerca siano stati adeguatamente informati e pienamente consapevoli delle condizioni e dei requisiti dell'istituto promotrice (LABIOFAM) in merito alla protezione e alla diffusione delle informazioni scientifiche e tecniche generate dal presente studio.

In fede di ciò, su richiesta del dipartimento di ricerca e sviluppo di LABIOFAM, firmiamo la presente certificazione nei 12 giorni del mese di maggio 2008 e annettiamo la presente certificazione al rapporto di studio come parte integrante di detto studio.

- Alexis Díaz García, MSc. Ricercatore
- Yanelis Riquenes Garlobo Tecnico

Emesso il: maggio / 12/2008

Odelaysis Suárez, BSc.
Capo, laboratorio di biologia molecolare
IPK

1. Contesto

L'uso di prodotti naturali nella medicina tradizionale e alternativa costituisce attualmente una pratica abbastanza estesa nella maggior parte dei paesi. Tale è il caso dei veleni di scorpione, il cui potenziale farmacologico è stato inizialmente accennato dalla scoperta della capacità immunomodulatoria del veleno da *Centruroides margaritatus*.

Ci sono 32 specie e sottospecie di scorpioni a Cuba, 28 delle quali sono endemiche del paese. *Rhopalurus junceus* è una delle specie più comuni tra i secondi ed è stata impiegata nella medicina tradizionale cubana dalle applicazioni nel ventre per trattare la ritenzione urinaria e per il trattamento di alcune malattie. Il veleno dello scorpione è principalmente una miscela di proteine con alcuni componenti tossici e altre sostanze che causano dolore dopo avvelenamento. Dato che non ci sono dati disponibili sulla composizione del veleno da *R. junceus*, è stato condotto uno studio per determinare la sua composizione proteica mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide (SDS-PAGE) e cromatografia liquida FPLC.

2.Obiettivi generali

Generali

- Determinare la composizione proteica del veleno dallo scorpione *R. junceus*

Specifico

- Caratterizzare la sua composizione proteica mediante SDS-PAGE
- Caratterizzare la sua composizione proteica mediante cromatografia liquida FPLC per testare la presenza di enzimi

3.Metodologia sperimentale

Lo studio ha utilizzato campioni di veleno ottenuti da 6 diverse province (Guantánamo, Granma, Matanzas, Isla de la Juventud, Pinar del Río e Las Tunas).

La concentrazione di proteine è stata misurata con il metodo Lowry come modificato da Herrera et al. usando l'albumina per la curva standard.

3.1 SDS-PAGE

I campioni di veleno sono stati analizzati mediante SDS-PAGE discontinua verticale in condizioni riducenti e non denaturanti⁵, usando gel separatori e impilatori rispettivamente del 16 e del 4%. Il peso molecolare è stato stimato rispetto agli standard di peso molecolare eseguiti in parallelo con i campioni. Le corse sono state eseguite a 120 V; 400 mA per 2 ore.

3.2 Cromatografia per filtrazione su gel

Il veleno è stato sciolto in acetato di ammonio 0,1 M (NH₄Ac) e centrifugato a 10.000 rpm per 15 minuti. Il supernatante è stato caricato su una colonna di filtrazione a gel SuperDex 75 HR 10/30 equilibrata con NH₄Ac 0,1 M ed eluita nello stesso solvente ad un flusso di 0,5 mL / min. La densità ottica (OD) a 280 nm è stata monitorata continuamente per 72 min.

La colonna di filtrazione su gel è stata calibrata con un kit di standard proteici: ribonucleasi A (13,7 kDa), chimotripsinogeno (25 kDa), ovoalbumina (43 kDa), albumina (67 kDa) e dextran blu 2000. I pesi molecolari relativi delle diverse proteine le frazioni sono state interpolate da questa curva standard.

Questi test sono stati eseguiti sui campioni di ciascuna provincia e su un pool di tutte le province campionati.

3.3 Attività enzimatica

Gli studi sull'attività enzimatica sono stati eseguiti con una miscela preparata riunendo tutti i campioni di ciascuna provincia.

3.3.1 zimogrammi di SDS-PAGE

I gel SDS-PAGE da utilizzare per l'ottenimento degli zimogrammi sono stati preparati secondo Laemmli5 e polimerizzati ad una concentrazione finale dello 0,2% con caseina, gelatina e acido ialuronico. I campioni di veleno sono stati preparati in condizioni non riducenti, caricando 25 µl di proteine per pozzetto. Il peso molecolare è stato stimato per interpolazione rispetto agli standard di peso molecolare. La corsa è stata eseguita a 120 V; 400 mA per 2 ore. I gel sono stati lavati con Triton-X-100 per 30 minuti. per eliminare SDS e quindi incubato per una notte a 37 ° C in tampone Tris-Cl pH 7.6 da 50 mM contenente CaCl₂ 10 mM, NaCl 0,15 M. La banda di degradazione è stata visualizzata colorando con Coomassie Blue G-250.

3.3.2 Attività proteolitica

La conferma della presenza di enzimi per attività di gelatinasi e ialuronidasi nel veleno dallo scorpione *R. junceus* è stata determinata con il metodo di *Murata et al.*

3.3.3 Saggi di attività fosfolipasi

La presenza della fosfolipasi A nel veleno dello scorpione *R. junceus* è stata saggiata utilizzando il metodo descritto da Habermann e Hardt.

4. Cambiamenti nel piano degli studi

Non ci sono state modifiche al piano degli studi.

5. Dati campione

Istituzione: Dipartimento Ricerca e Sviluppo, Lotto LABIOFAM: Sperimentale (ottenuto in 6 province in tutto il paese) Data di presentazione: marzo 2006 / agosto 2007

6. Risultati

I risultati di SDS-PAGE hanno evidenziato la presenza di bande proteiche a 66 kDa, 45 kDa e 29 kDa. La banda che correva sotto 14 kDa aveva l'aspetto di una grande macchia, suggerendo che il contenuto proteico del veleno si formava principalmente di specie a basso peso molecolare.

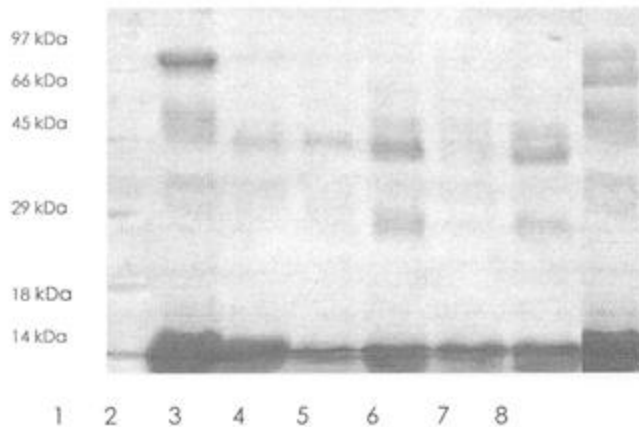


Figura 1: analisi mediante SDS-PAGE di campioni di veleno di scorpioni provenienti da diverse regioni del paese. I gel di impilamento e separazione erano 4 e 16%, rispettivamente. Corsia 1: marcatori di peso molecolare. Corsie 2-8: campioni di veleno di *R. junceus*. 2: Guantánamo; 3: Matanzas; 4: Isla de la Juventud; 5: Pinar del Río; 6: Tunas; 7: Granma; 8: Pool di tutti i campioni.

La tabella 1 contiene i risultati della stima del peso molecolare mediante SDS-PAGE e filtrazione su gel. Entrambe le tecniche hanno prodotto risultati simili per tutte le province analizzate e per il pool di tutte le province, e hanno permesso di dimostrare la coincidenza dei contenuti di proteine da 60 a 14 kDa. La cromatografia mediante filtrazione su gel ha evidenziato frazioni proteiche da 67 a 3 kDa. Nel caso del metodo SDS-PAGE, le specie di proteine da 3 a 8 kDa sono comigrate con la banda da 14 kDa.

RMW (kDa)	SDS-PAGE	Gel filtration
60	x	x
38	x	x
29	x	x
14	x	x
8	-	x
4	-	x
3	-	x

Tabella 1. Tabella comparativa per i pesi molecolari relativi misurati mediante SDS-PAGE e filtrazione su gel

RMW- Pesi molecolari relativi

X- presenza di specie proteiche a quel peso molecolare in quel dosaggio

La Figura 2 mostra il risultato ottenuto dopo aver caricato il veleno in un gel contenente caseina. Da tutta la gamma di proteine della corsia 1 emerge solo una chiara banda di degradazione al livello di 45 kDa, evidenziando la presenza di un'attività proteolitica su questa zona. Il controllo positivo

caricato sulla corsia 3 ha un segnale di degradazione della caseina con la stessa mobilità relativa della tripsina.

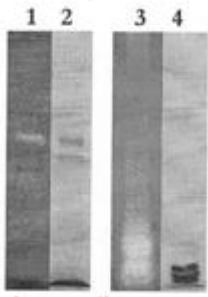


Figura 2. Attività caseinolitica in SDS-PAGE zimogrammi di veleno dallo scorpione *R. juncus*. 1) Zymogram of the venom 2) SDS-PAGE convenzionale del veleno 3) Zymogram of trypsin 4) SDS-PAGE convenzionale di tripsina.

L'attività caseinolitica del veleno è stata confrontata con quella della tripsina, utilizzata come controllo positivo nello studio. Nessuna attività era rilevabile per il veleno a un intervallo di concentrazioni che andava da 1 $\mu\text{g} / \text{ml}$ a 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (Figura 3) e solo un'attività molto bassa era rilevabile a 100 e 250 $\mu\text{g} / \text{ml}$ rispetto al controllo. A concentrazioni più elevate (500, 750 e 1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$) si è verificata una debole attività proteolitica, che è diventata dose-dipendente a partire da 250 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

Nonostante l'aumento dell'attività proteolitica, non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra le concentrazioni di veleno saggiate e il controllo senza veleno ($P > 0,05$). Gli altri saggi per attività enzimatiche correlate alla presenza di attività gelatinasi e ialuronidasi mediante zimogrammi e degradazione misurata dall'assorbanza erano negativi.

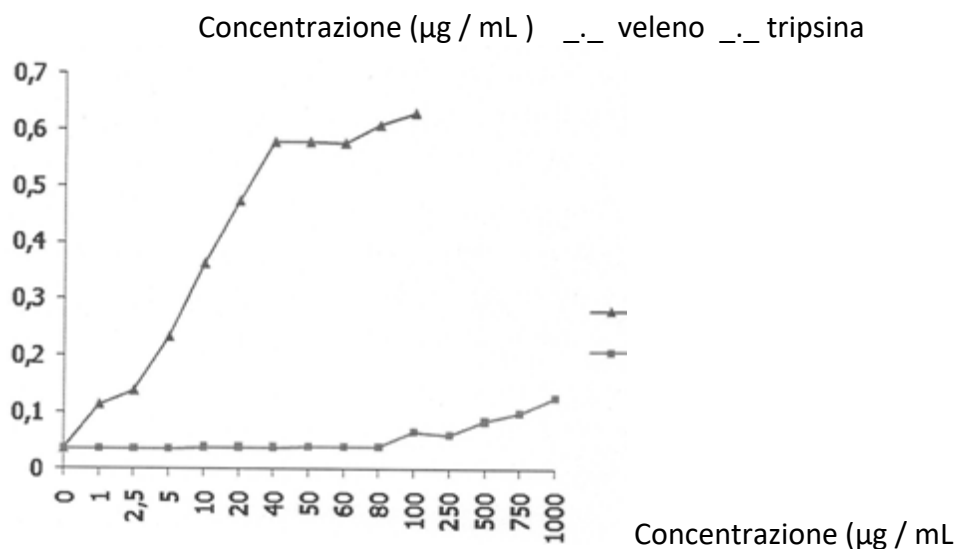
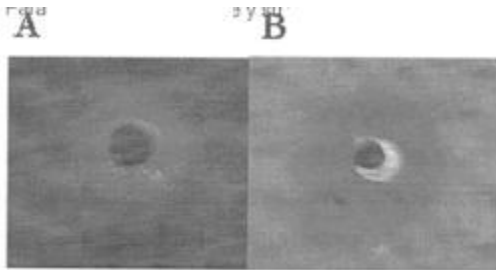


Figura 3. Attività proteolitica del veleno e tripsina utilizzando la caseina come substrato

Un alone nuvoloso è stato osservato attorno al sito di carico del veleno. Questa osservazione non corrisponde alla presenza di fosfolipasi A. Questa torbidità è stata osservata progressivamente da concentrazioni di 5 mg / ml alla concentrazione più alta impiegata nello studio (10 mg / ml) (Figura 4), che potrebbe essere correlata alla presenza di un'attività proteolitica aspecifica del veleno con il substrato.



7. Conclusioni

1. La caratterizzazione biochimica eseguita qui ha dimostrato che la composizione proteica del veleno dallo scorpione *R. junceus* è simile tra i campioni di diverse province e corrisponde al modello ottenuto con un pool di tutti i campioni.
2. La maggior parte del contenuto di proteine è rappresentata da specie con peso molecolare inferiore a 14 kDa.
3. La caratterizzazione dell'attività enzimatica determina la presenza di proteasi
4. Non c'è attività gelatinasi, ialuronidasi o fosfolipasi A.

8. References

1. Bednarek MA, Bugianesi RM, Leonard RJ, Felix JP. Chemical synthesis and structure-function studies of margatoxin, a potent inhibitor of voltage-dependent potassium channel in human T lymphocytes *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Jan 28; 198(2):619-25
2. Armas LF. Fauna de la República de Cuba. Los ricinuleidos, esquizómidos y escorpiones. (Arachnida: Ricinulei, Schizomidae, Scorpiones). Academia de Ciencias, IES, 1991:58
3. Armas, A. Escorpiones del Archipiélago Cubano. Nueva Especie de *Rhopalurus* (Scorpionida:Buthidae). *Poeyana*: 1974.
4. Herrera Y., Heras N, Cardoso D. Adaptación a microplacas y validación de la técnica de Lowry. *VacciMonitor* 1999; 3:7-11

5. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-5
6. Murata, J., Satake, M.; Suzuki, T. 1963. Studies on snake venom. XII. Distribution of proteinase activities among Japanese and Formosan snake venoms. *J. Biochem.* 53, 431- 43
7. Habermann, E.; Hardt, K.L. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipase. *Anal Biochem.* 1972; 50:163-173