

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y
NATURALES.**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA.



**Estudios estructurales y
caracterización fisicoquímica “in
sílico” de la proteína caltrin II de
ratón**

Tesina para optar al título de Biólogo



**Director: Dr. Carlos E. Coronel
Co-Director: Dr. Ernesto J. Grasso
Alumna: Paula Mihelj**

2018

Tribunal evaluador:

Dra. Nilda Anahí Franchi

Firma: _____

Dra. María Verónica Nolan

Firma: _____

Dr. Eduardo Matías Clop

Firma: _____

Alumna: Paula Mihelj

Firma: _____

Director: Dr. Carlos Enrique Coronel

Firma: _____

Co-director: Dr. Ernesto Javier Grasso

Firma: _____

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Resumen | 3 |
| Introducción | 4 |
| Objetivos | 10 |
| Materiales y métodos | 12 |
| Resultados | 17 |
| Caracterización físico-química | 17 |
| Modelos moleculares | 18 |
| Determinación de estructura secundaria | 26 |
| Dicroísmo circular | 28 |
| Potenciales electrostáticos y campos eléctricos | 28 |
| Perfil de hidropaticidad de Kyte y Doolittle | 30 |
| Área óptima de unión o “ <i>docking</i> ” a membrana | 31 |
| Discusión | 33 |
| Conclusiones | 37 |
| Bibliografía | 39 |

RESUMEN

La finalidad de esta tesina de grado fue la caracterización físico-química y estructural de la proteína caltrin II de ratón a fin de aportar datos que ayuden a dilucidar el mecanismo de unión de la misma al espermatozoide durante la eyaculación. Se conoce que esta proteína se une a la región principal del flagelo de espermatozoides aislados de la porción cauda del epidídimo e inhibe la entrada de Ca^{+2} extracelular dentro de la célula espermática. Dicha inhibición bloquea el movimiento hiperactivado temprano disminuyendo el gasto energético del espermatozoide y aumentando las probabilidades de encontrarse e interactuar con el ovocito en el tracto reproductor de la hembra.

La estructura primaria de caltrin II de ratón fue determinada previamente en nuestro laboratorio y a partir de esta se realizaron cálculos, utilizando diversas herramientas bioinformáticas, para caracterizar las propiedades físico-químicas, como su índice alifático, coeficiente de extinción molar teórico, carga neta, termoestabilidad y la estabilidad en solución acuosa. La estructura tridimensional (3D) de la proteína fue obtenida mediante dos métodos bioinformáticos que se basan en diferentes principios. En uno se compara la estructura de caltrin II con la de una proteína relacionada evolutivamente (homología molecular, SWISS-MODEL) y en la otra se comparan sus formas de plegamiento con una proteína plegada de forma similar (I-TASSER). Ambos modelos fueron refinados utilizando ModRefiner y se les realizó el test de Ramachandran, el cual indicó que el modelo refinado de I-TASSER presentaba una estructura más favorable termodinámicamente, por lo que se utilizó ese modelo para todos los estudios. Se determinó el potencial electrostático y campo eléctrico teórico en condiciones de 0 y 145 mM de fuerza iónica, la escala de hidropaticidad de Kyte y Doolittle y el valor M.O.D.A para conocer la zona más propensa de unión o “*docking*” de caltrin II de ratón a la membrana del espermatozoide. Los resultados obtenidos permiten proponer un modelo de interacción entre caltrin II y una membrana (bicapa) modelo.

INTRODUCCIÓN

La fertilización en mamíferos es el evento por el cual las gametas femeninas y masculinas se unen para dar lugar a un nuevo individuo con una carga genética diferente a la de sus progenitores. Las gametas femeninas se conocen como ovocitos y se hallan contenidos dentro de los ovarios. Se encuentran rodeados por un cúmulo de células llamado *cúmulus oofurus* y por una cubierta glicoproteica llamada zona pelúcida, las cuales deben ser atravesadas por las gametas provenientes del macho (1).

El proceso por el cual se forman las gametas masculinas se denomina espermatogénesis y da lugar a los espermatozoides. Estos se forman dentro de los túbulos seminíferos del testículo y luego son almacenados en el epidídimo hasta el momento de la eyaculación (ver Figura 1). Durante la misma, los espermatozoides epididimarios maduros son bombeados a través de las vías deferentes hacia la uretra, donde se mezclan con las secreciones de las vesículas seminales (~70 % del volumen del fluido seminal), la glándula bulbouretral y la próstata (~20 % del volumen del fluido seminal), las que diluyen dichos espermatozoides, proveyéndoles de substratos metabólicos, iones y factores de estabilización (2; 3).

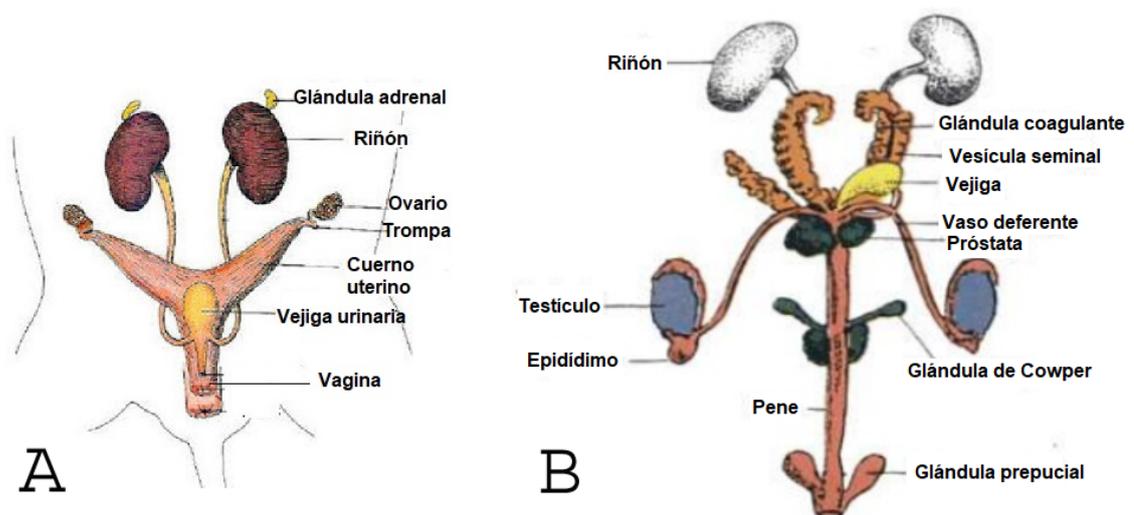


Figura 1. Esquema representativo del aparato reproductor de una rata hembra (A) y macho (B). Obtenido de Stark, D.M y Ostrow, M.E, eds. Assistant Laboratory Technician (AALAS, 1991).

Los espermatozoides luego de ser eyaculados son depositados en el tracto reproductor de la hembra, en algunas especies en la vagina y en otras directamente en el útero para luego ser retenidos en el istmo del oviducto, conformando el reservorio oviductal. En el mismo se unirían al epitelio oviductal (4).

Debido a que los espermatozoides recién eyaculados no son capaces de fertilizar al ovocito deben adquirir dicha capacidad en el tracto reproductor de la hembra, donde dejan atrás el plasma seminal y experimentan una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos en la membrana plasmática, tales como la pérdida de colesterol y aumento de la fluidez, alteraciones en la composición proteica y en la distribución de partículas intramembranas, y aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} (1). Todos estos cambios son denominados colectivamente “capacitación” espermática y, a consecuencia de la misma, ocurren dos procesos asociados a la entrada de Ca^{2+} extracelular: la hiperactivación y la reacción acrosomal (1). La hiperactivación consiste en un cambio de movilidad de los espermatozoides, desde un movimiento lineal progresivo, a uno de trayectoria circular sin progresión y gran actividad en la cola. La hiperactivación ayudaría a los espermatozoides almacenados en el *istmus* del oviducto, en el reservorio oviductal, a desprenderse del epitelio oviductal e iniciar el ascenso hacia la región de la ampolla del oviducto para fertilizar al ovocito. También ayudaría en la penetración del espermatozoide a través de las células del *cumulus* y las mallas de glicoproteínas de la zona pelúcida que rodean al ovocito (4). Durante la reacción acrosomal, la membrana plasmática y la acrosomal externa se fusionan en múltiples zonas permitiendo la liberación de las enzimas del contenido acrosomal (1), las cuales participarían en procesos estrechamente ligados a la fertilización.

La rápida entrada de Ca^{2+} extracelular que precede dichos eventos en los espermatozoides, debe ser estrictamente controlada para que dichos procesos ocurran en el sitio y en el momento correcto a fin de garantizar el éxito de la fertilización. El adelantamiento de los mismos conduce al fracaso de la fecundación. Por lo tanto, deben existir mecanismos que controlen el movimiento de Ca^{2+} a través de la membrana del espermatozoide y, de ese modo, modulen el desarrollo de aquellos procesos, dependientes de este catión, requeridos para

concretar la fertilización. Como mencionamos anteriormente, una vez eyaculados los espermatozoides están suspendidos en el plasma seminal donde están expuestos a proteínas y otras moléculas secretadas por las glándulas anexas del aparato reproductor (vesículas seminales y próstata, fundamentalmente) las cuales pueden afectar las propiedades fisiológicas del semen (2; 3). En resumen, el plasma seminal contiene proteínas con funciones específicas, como coagulación y licuefacción del semen, y otras proteínas con la capacidad de unirse a la superficie del espermatozoide e influenciar sobre procesos específicos asociados a la fertilización (2). Entre dichas proteínas encontramos a caltrin (del inglés “*calcium transport inhibitor*”), una proteína pequeña y básica secretada por las vesículas seminales de varios mamíferos (bovino, rata, ratón y cobayo) y la cual se une a la superficie de espermatozoides eyaculados e inhibe la incorporación de Ca^{2+} extracelular (5). Aunque los mecanismos de esta inhibición no han sido completamente dilucidados, caltrin bovina fue detectada en la región anterior de la cabeza y en la pieza principal de la cola en espermatozoides eyaculados. La misma distribución fue observada cuando se incubaron espermatozoides epididimarios con caltrin purificada (6). La Figura 1 indica las regiones donde se unen las diferentes proteínas caltrin. La distribución específica en la superficie de los espermatozoides eyaculados sugiere la existencia de receptores específicos para estas proteínas, ubicados exclusivamente en las regiones donde el ingreso de Ca^{2+} es requerido. Sin embargo, la presencia de dichos receptores no ha sido descrita hasta el presente.

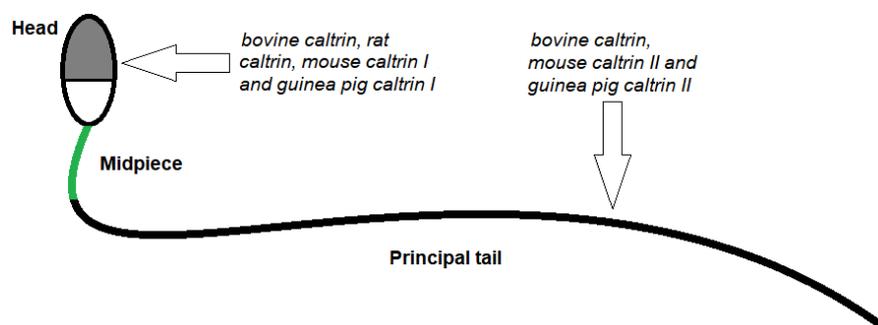


Figura 2. Diagrama general de un espermatozoide indicando ubicación de la cabeza, la pieza media y la porción principal de la cola. Las flechas indican las regiones donde se unen las diferentes proteínas caltrin. La figura fue extraída de Grasso y Coronel 2017 (7).

Es bien conocido que el ingreso de Ca^{2+} tanto en la cabeza como en la cola de los espermatozoides es necesario para que ocurran la reacción acrosomal y la hiperactivación. Como la concentración de Ca^{2+} en los fluidos del tracto reproductor de la hembra es suficientemente alta para promover dichos fenómenos en cualquier momento durante el tránsito de los espermatozoides, el movimiento de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática debe ser estrictamente regulado para prevenir la reacción acrosomal y la hiperactivación lejos del oviducto (7). Dicha regulación es realizada por las proteínas caltrin mediante la inhibición de la incorporación de Ca^{2+} extracelular, previniendo de este modo el desarrollo prematuro de la excitosis acrosomal y la hiperactivación (8). Consecuentemente, las enzimas hidrolíticas acrosomales son retenidas en la organela intacta y los espermatozoides pueden mantener el movimiento lineal progresivo hasta alcanzar el oviducto, donde serán almacenados hasta el momento de la ovulación (9).

Las proteínas caltrin fueron detectadas y secuenciadas en diversas especies de mamíferos y sus propiedades biológicas han sido estudiadas exhaustivamente (5; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15). En la TABLA 1 se muestran algunas características de las proteínas caltrin hasta ahora estudiadas.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de las proteínas caltrin.

| | Mr | pI | ϵ^a | INST. INDEX | GRAVY ^b |
|---------------|------|------|--------------|-------------|--------------------|
| Bovine | 5411 | 8.3 | 6990 | 24.86 | -0.994 |
| Rat | 6217 | 9.3 | 3355 | 36.12 | -0.432 |
| Mouse I | 6126 | 9.5 | 3355 | 51.99 | -0.161 |
| Mouse II | 8476 | 10.6 | 3605 | 51.02 | -0.478 |
| Guinea pig I | 5084 | 9.5 | 4595 | 45.68 | -0.163 |
| Guinea pig II | 6255 | 10.2 | 6460 | 73.57 | -1.036 |

Abreviaciones: GRAVY (del inglés “grand average of hydropathy”) valor promedio de hidropatía;

a. ϵ : Coeficiente de extinción molar (en unidades de $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, medidos a 280 nm en agua).

b. los valores negativos (kcal mol^{-1}) de GRAVY indican que las proteínas caltrin son fundamentalmente hidrofílicas (16). INST. INDEX: una proteína con un valor menor a 40 se predice estable, mientras que otra con un valor mayor a 40 se predice inestable en solución acuosa (17). Tabla extraída de Grasso y Coronel 2017 (7).

c. Mr: Masa relativa. pI: punto isoeléctrico.

Caltrin II de ratón fue purificada a partir del contenido de vesícula seminal de ratón, utilizando anticuerpos anti-caltrin bovina para su identificación (18). La estructura primaria fue obtenida por secuenciamiento por degradación de Edman de los fragmentos generados por la digestión con tripsina, clostripain y endopeptidasa C, obteniendo una secuencia de 75 aminoácidos de los cuales 7 son cisteínas que pueden formar puentes disulfuro en su estado nativo (18). Posteriormente, el grupo de Luo y colaboradores (19) identificó, utilizando el ADN complementario, una proteína del contenido de vesícula seminal de ratón que denominaron SVS VII (del inglés "*Seminal Vesicle Secretion VII*"). El análisis comparativo demostró que se trataba de la misma proteína purificada previamente por Coronel y col. (18) denominada caltrin II de ratón, con ligeras diferencias en un par de aminoácidos de la porción c-terminal. Esta discrepancia se debía a diferencias en el tratamiento de las muestras previamente al secuenciamiento.

Existen discordancias en cuanto a la interacción con la superficie del espermatozoide. Mediante el uso de inmunofluorescencia indirecta Luo y col. (19) informaron que SVS VII ó caltrin II de ratón se une a lo largo de toda la superficie del espermatozoide de un modo totalmente inespecífico. Contrariamente, estudios recientes de nuestro laboratorio (20), muestran que la proteína se une selectivamente a la porción principal de la cola de los espermatozoides (Figura 3).

Además, disienten en el efecto sobre la motilidad del espermatozoide; según Coronel y col. (18) cuando se adiciona caltrin II de ratón al medio se inhibe en gran proporción la entrada de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en las células espermáticas. Además, cuando se somete a la proteína a un proceso de reducción y carboximetilación pierde su efecto inhibitor (18). Mientras que Luo y colaboradores sostienen que SVS VII actúa como un potenciador de la hiperactivación, y que solo en su forma desplegada (por calentamiento) inmoviliza al espermatozoide (19).

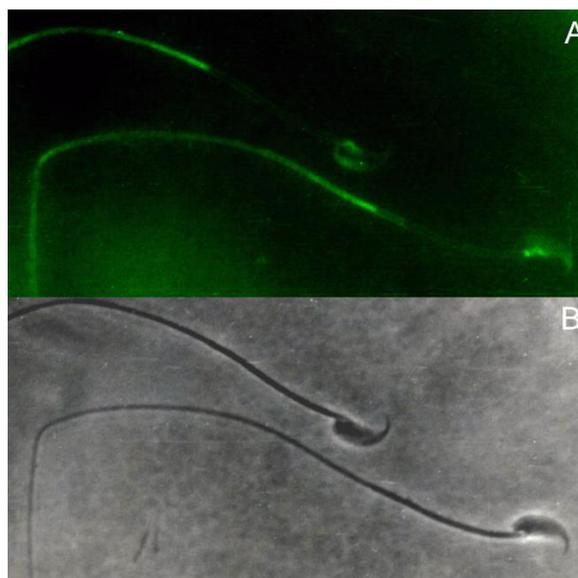


Figura 3. Inmunolocalización de la proteína caltrin II de ratón en la superficie de los espermatozoides. A. Microfotografía de epifluorescencia donde se muestra inmunorreacción en la porción principal de la cola. No se observa inmunomarcación ni en la pieza media ni en el acrosoma. B. Microfotografía de contraste de fase. Magnificación 1000X. Figura extraída de Grasso y Coronel 2017 (7).

Como se mencionó anteriormente, la existencia de receptores para las proteínas caltrin en la superficie de los espermatozoides aún no se conocen. Sin embargo, diversos tipos de interacciones moleculares entre fosfolípidos y las proteínas caltrin han sido reportadas. Por ejemplo, estudios cromatográficos en capa fina demostraron que la proteína SVS VII ó caltrin II de ratón se une específicamente a la fosfatidilserina (PS). Lo mismo se observó en estudios utilizando liposomas de PS (19). Teniendo en cuenta las propiedades físicas de esta proteína, se puede asumir que dicha interacción está favorecida por la carga neta positiva de caltrin II a pH fisiológico ($pI = 10.2$). Ver Tabla 1.

En nuestro laboratorio se están llevando a cabo estudios estructurales exhaustivos de estas proteínas. Recientemente se elaboró un modelo tridimensional para las proteínas caltrin bovina y caltrin I de ratón (21). A partir de esto, se evaluaron algunas propiedades físico-químicas y estructurales de ambas proteínas utilizando herramientas bioinformáticas. Dentro de este marco, el propósito de este trabajo de Tesina de Grado es describir en profundidad tanto las estructuras secundaria y terciaria y algunas propiedades fisicoquímicas de la

proteína caltrin II de ratón. Para ello se utilizaron diversas herramientas bioinformáticas y espectroscopía de dicroísmo circular. El fin de estos estudios es comprender cómo esta proteína interactúa con la membrana del espermatozoide para influenciar sobre los mecanismos de señalización intracelular que ocurren en esta célula durante las distintas etapas del complejo proceso de fertilización.

Para ello nos planteamos los siguientes objetivos:

Objetivo general:

- Contribuir desde perspectivas biológicas, estructurales y físico-químicas, a la comprensión de los mecanismos moleculares y supramoleculares involucrados en la interacción de caltrin II de ratón con la membrana plasmática del espermatozoide.

Objetivos específicos:

1. Caracterización físico-química “*in silico*” de la proteína caltrin II de ratón utilizando diversas herramientas bioinformáticas que permitan calcular parámetros como el coeficiente de extinción, índice alifático, índice de inestabilidad, escala de hidrofobicidad de Kyte y Doolittle.
2. Predicción de modelos moleculares tridimensionales (3D), a partir de la estructura primaria de la proteína caltrin II de ratón, usando el modelado molecular por homología y también el método de “*threading*”.
3. A partir de estos modelos se calcularán diversos parámetros tales como superficie molecular, superficie de Van der Waals, las de accesibilidad al solvente o Lee-Richards y también la cantidad y estabilidad de puentes de hidrógeno presentes en dicha molécula.
4. Predicción del potencial electrostático de superficie y los campos eléctricos de esta proteína bajo diversas condiciones de carga y fuerza iónica.
5. Predicción de la estructura secundaria de la proteína caltrin II de ratón utilizando herramientas bioinformáticas. Dichas predicciones se

examinarán experimentalmente mediante espectroscopía de dicroísmo circular.

6. Predicción de la zona de unión o "*binding*" de la proteína a la membrana del espermatozoide.

MATERIALES Y MÉTODOS

Proteínas: La proteína caltrin II de ratón fue purificada a partir de la secreción de vesículas seminales de ratones machos adultos siguiendo el procedimiento descrito por Coronel y colaboradores (18). La proteína pura se liofilizó y guardó a -20°C hasta su utilización.

Objetivo específico 1: Para la caracterización físico-química de caltrin II de ratón se utilizarán las herramientas del server Expasy-ProtScale (22). Se obtendrán los perfiles de hidropaticidad utilizando dos ventanas de 9 y 21 residuos, respectivamente, lo que permitirá predecir el posible punto de anclaje de la proteína a las membranas. También se determinará la estabilidad en solución acuosa, la termoestabilidad, el coeficiente de extinción molar en condiciones reductoras y no reductoras y el índice alifático de dicha proteína.

Objetivo específico 2: La predicción de los modelos 3D se realizará por modelado molecular por homología utilizando el servidor SWISS-MODEL Workspace (<http://swissmodel.expasy.org/>). La librería de SWISS-MODEL Workspace utiliza tanto BLAST (23) como HHblits (24), como buscadores; para identificar las plantillas y obtener los alineamientos entre la proteína a modelar y su plantilla. El uso combinado de estos dos métodos garantiza un correcto alineamiento, incluso cuando no hay alta identidad de secuencia (homología) entre el modelo y su plantilla. Una vez realizado el alineamiento se realizará un modelo atómico para la proteína (25). En el mismo se generan coordenadas atómicas usando los alineamientos entre el modelo y su plantilla, se reconstruyen las zonas no conservadas entre ambas (mediante la matriz de suplantación BLOSUM62) y se completan las cadenas laterales a partir de una librería de estructuras conocidas (26). Para determinar la veracidad del modelo, se calcularán los valores de QMEAN (*“Qualitative Model Energy Analysis”*), un método de cálculo compuesto que describe los aspectos geométricos más importantes de las proteínas. El método define algunas características geométricas del modelo, como ángulos de torsión y accesibilidad al solvente, y las compara con distribuciones estadísticas obtenidas a partir de estructuras experimentales. El valor de QMEAN obtenido es indicativo de la confiabilidad del modelo (25).

Paralelamente, la estructura 3D de caltrin II de ratón será predeterminada utilizando el server I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). A diferencia de SWISS MODEL, I-TASSER realiza el modelado estructural por la técnica de “*threading*” (“enhebrado”) el cual se basa en la determinación *in silico* de la estructura secundaria de diversos fragmentos obtenidos a partir de la secuencia de la proteína a modelar (27). Posteriormente, el enhebrado se realiza mediante ajustes iterativos de los fragmentos obtenidos, buscando los mínimos energéticos, para la construcción del modelo final. En resumen, el método de “enhebrado” consiste en cuatro pasos: identificación de la plantilla (a partir de la estructura secundaria predicha para los fragmentos obtenidos de la secuencia a modelar), simulación del ensamblaje del modelo (mediante dinámica molecular), selección y refinamiento del modelo y determinación de la función (si la hubiere) basada en la estructura. Para la identificación de la plantilla se utiliza el software LOMETS, el cual contiene ocho programas de reconocimiento de plantillas (PPAS, Env-PPAS, wPPAS, dPPAS, dPPAS2, wdPPAS, MUSTER y wMUSTER) (27). I-TASSER genera diversas conformaciones estructurales que se denominan señuelos. Para seleccionar el modelo final utilizará el software SPICKER que agrupa todos los señuelos de a pares y los compara en base a la similitud de estructura, generando hasta cinco modelos. La credibilidad de cada modelo es medida usando el valor de C-score (un score de confianza, el cual se calcula a partir de la significancia de los alineamientos de la plantilla enhebrada y los parámetros de convergencia de las simulaciones del ensamblaje estructural). Su rango numérico va de -5 a 2, donde un valor mayor indica una alta credibilidad del modelo predicho y vice-versa.

Finalmente, los modelos obtenidos serán ajustados usando el algoritmo ModRefiner. Dicho algoritmo refina el modelo en cuanto a enlaces de hidrógeno, topología de la cadena principal y posicionamiento de cadenas laterales por medio de la minimización de la energía (28).

Objetivo específico 3: Se estimarán diferentes superficies (molecular, Van der Waals, accesible y excluída al solvente) a partir de los modelos 3D usando el software UCSF Chimera© 1.10 (29). Mediante el uso del programa Yasara© se calcularán los radios de giro, los radios nucleares y los radios de Van der Waals de la molécula a partir de los modelos.

Objetivo específico 4: El potencial electrostático de superficie y los campos eléctricos teóricos serán modelados usando la ecuación de Poisson-Boltzmann (30) para dos constantes dieléctricas (solvente = 80; interior de la proteína = 4) a diferentes fuerzas iónicas (145 mM-0 mM NaCl). Para ello utilizaremos el software SPDBViewer. Este software asume que el sistema se encuentra a pH 7 y todos los residuos se encuentran cargados. Se calcularán los potenciales electrostáticos y campos eléctricos con dos modelos de carga: A. tomando los residuos cargados únicamente y, B. tomando las cargas parciales de las cadenas laterales. Un valor de 1,87 mV (KTe) y -1,87 mV (KTe) serán usados para delimitar los potenciales electrostáticos y/o campos eléctricos positivos y negativos, respectivamente.

Objetivo específico 5: Se estudiará la estructura secundaria nativa de caltrin II de ratón tanto *in silico* como experimentalmente. Las predicciones de las estructuras secundarias se realizarán usando los servers ESPript 3.0 (predicción basada en el modelo 3D) y PSIPRED v 3.3 (predicción basada en la secuencia). Simultáneamente se determinará experimentalmente por dicroísmo circular la estructura secundaria de la proteína caltrin II de ratón disuelta en agua ultrapura, usando un espectropolarímetro Jasco J-810 y una cubeta de cuarzo con un paso óptico de 0,2 cm. Cada espectro se obtendrá a partir del promedio de seis escaneos. La concentración de proteína a usar será de aproximadamente 30 μ M. Se sustraerá la contribución del agua en todos los espectros. La velocidad de escaneo será programada a 50 nm/min con un tiempo de respuesta de 2 segundos, una recolección de datos cada 0,2 nm y un ancho de banda de 2 nm (31). Las mediciones se realizarán en la región de 190-260 nm y expresadas como elipticidad molar $[\Theta]$ (deg cm² dmol⁻¹) vs λ (nm) (32). La composición de estructura secundaria se definirá por deconvolución de los espectros obtenidos.

Objetivo específico 6: Se estudiará la zona de “*binding*” o unión a membrana de caltrin II de ratón utilizando el server M.O.D.A (*Membrane Optimal Docking Area*, <http://molsoft.com/~eugene/moda/modamain.cgi?act=dataset>). El algoritmo de M.O.D.A es una versión mejorada del algoritmo PIER que también se utilizaba para la predicción de sitios de interacción proteínas-membrana (33). En un principio M.O.D.A amplía la superficie accesible al disolvente en 5 Å para abarcar la forma general de la proteína y genera una serie de puntos distribuidos

uniformemente sobre la superficie de la proteína a una distancia promedio entre sí de 5 Å. Luego define parches que son un conjunto de átomos de la superficie de la proteína que se encuentran a una distancia determinada con respecto a un punto central. Los parches pueden ser de nivel 1 o parches grandes, ubicados a 14 Å del punto central, o de nivel 2 o parches chicos a 10 Å del punto central. Luego, a cada átomo de la superficie se le asigna un valor de cuan propenso es de unirse a la membrana. En el cálculo interviene el *área superficial accesible al disolvente atómico (SASA)* y un valor específico de cada tipo de átomo. A continuación, los valores obtenidos de cada átomo se promedian sobre los parches de nivel 1; y finalmente las puntuaciones de que tan propenso es el parche se trasladan a los residuos superficiales asignando a cada uno el promedio ponderado de todos los parches del nivel 2 que lo abarcan (34). La tabla 2 resume la metodología utilizada en la presente tesina de grado.

Tabla 2. Herramientas bioinformáticas utilizadas, funciones que presentan y bibliografía asociada.

| Herramienta | Utilidad | Referencia |
|--|--|----------------|
| Expasy-ProtScale Expasy-ProtParam | Caracterización físico-química para conocer como almacenar y resguardar la proteína | 22 |
| ESPrpt 3.0 PSIPRED v 3.3 | Predicción de estructura secundaria | 23, 24 |
| SWISS-MODEL Workspace I-TASSER ModRefiner | Modelado tridimensional basado en la secuencia/ estructura secundaria de la proteína | 27, 28, 29, 30 |
| SPDBViewer | Visualización modelos 3D, cálculos de | 28 |

| | | |
|----------|---|--------|
| | potenciales electrostáticos, entre otras | |
| M.O.D. A | Predicador de zona de la proteína que hace docking con una membrana | 32, 33 |

RESULTADOS

Caracterización físico-química

En la Tabla 3 se muestran algunas propiedades físico-químicas de la proteína caltrin II de ratón. Entre ellas se encuentran tamaño molecular, peso molecular, punto isoeléctrico, el coeficiente de extinción molar en el cual se considera que todas las cisteínas presentes forman cistinas y el coeficiente de extinción molar reducido el cual considera que todas las cisteínas están reducidas. Debido a que esta proteína no posee el aminoácido triptófano en su estructura primaria el resultado obtenido puede tener un error mayor al 10%, esto se debe a que el espectro de emisión de este aminoácido es dominante por encima de los valores de los aminoácidos aromáticos tirosina y fenilalanina. También se presenta el índice de estabilidad, que es un valor indicativo de la estabilidad de una proteína almacenada en solución acuosa; un número mayor a 40 indica inestabilidad (22). De acuerdo al valor calculado (51,02), la proteína en estudio es inestable para ser almacenada en solución acuosa por largos períodos de tiempo. El índice alifático, por su parte, que se determina a partir de las cadenas laterales de aminoácidos alifáticos (valina, leucina, isoleucina y alanina), señala la estabilidad de proteínas globulares a altas temperaturas (35). Caltrin II de ratón presenta un índice alifático bajo (52,5), valor del que se deduce que a altas temperaturas su estructura no es estable.

Tabla 3. Propiedades físico-químicas de caltrin II de ratón.

| Número de aminoácidos | 76 |
|-----------------------------------|-----------|
| Peso molecular | 8547,98 |
| pI | 9 |
| Coeficiente de extinción | 3605 |
| Coeficiente de extinción reducido | 2980 |
| Índice de inestabilidad | 51,02 |
| Estabilidad | Inestable |
| Índice alifático | 52,5 |
| Índice de hidropaticidad (GRAVY) | -0,467 |

El índice de hidropaticidad (GRAVY) brinda información sobre el carácter hidrofóbico o hidrofílico de una proteína en base a la composición de aminoácidos que presenta (16). En este caso, la proteína caltrin II de ratón es de carácter hidrofílico y tiene un comportamiento soluble en agua. Otro valor obtenido utilizando ProtParam tool es la vida media de la proteína, que es el tiempo que demora en desaparecer la mitad de una cantidad dada de proteína luego de su síntesis. En los reticulocitos de mamíferos se estima que la mitad de la proteína desaparece en 5 horas y media, mientras que en *E. coli* demora 2 minutos y en levaduras 3 minutos.

Modelos moleculares

Se utilizaron dos servidores para obtener los modelos moleculares: SWISS-MODEL y I-TASSER (Figura 4). El primero realiza el modelado por homología, es decir comparando la estructura en estudio con la de una proteína similar que esté relacionada evolutivamente. La búsqueda de las proteínas relacionadas se realizó utilizando los buscadores Blast y HHBlits. Para el modelo de caltrin II de ratón, se usó como plantilla la estructura correspondiente a la proteína “*Secreted Ly-6/uPAR-related protein 1*” (PDB: 2muo.1A), obtenida con HHBlits. Esta proteína presenta una identidad de secuencia del 26%, similitud de secuencia de 0,34 y una cobertura (proporción de estructura de la secuencia de interés que puede ser predicha por la plantilla) de 0,96. El valor de QMEAN4 fue de -4,46 y el valor normalizado estuvo dentro de los límites de Z-score menor a 1. I-TASSER realiza el modelado mediante “*threading*” o “enhebrado” el cual es un método que se basa en el reconocimiento del plegamiento de proteínas. En base a la predicción de la estructura secundaria de la proteína a modelar, I-TASSER selecciona una plantilla (proteína en la base de datos o PDB) y ajusta el modelo mediante enhebrado iterativo de la secuencia problema. A partir de esto, se obtienen las coordenadas atómicas para realizar el modelado. Para este modelo 3D la plantilla obtenida fue la correspondiente a la proteína “*Ly-6/neurotoxin-like protein 1*” (PDB: 2l03A), con identidad de secuencia del 26%, cobertura de 0,95, C-score de -0,38 y un valor de TM de $0,66 \pm 0,13$. Para que un modelo sea de extrema exactitud la identidad de secuencia deber ser mayor al 50% (36), así,

los modelos obtenidos tanto por SWISS-MODEL como por I-TASSER presentaron baja exactitud con una identidad de secuencia menor al 30%.

Para mejorar los modelos, ambos fueron refinados utilizando la herramienta informática ModRefiner y los mismos se observan en la Figura 4. Este server se encuentra disponible en línea y funciona a través de un algoritmo; el mismo, a través de un campo de fuerza conocido, genera una minimización de energía en los modelos mejorando la topología global y local de los mismos. Este programa parte del esqueleto de C α , al cual le minimiza la energía y luego agrega las cadenas laterales a las cuales les hace lo mismo. De esta manera se evitan los choques estéricos, aumentan los puentes de hidrógeno con respecto al modelo original al generar un re-arreglo de las cadenas laterales, tanto en el esqueleto de C α como en las cadenas laterales, entre otras mejoras (28).

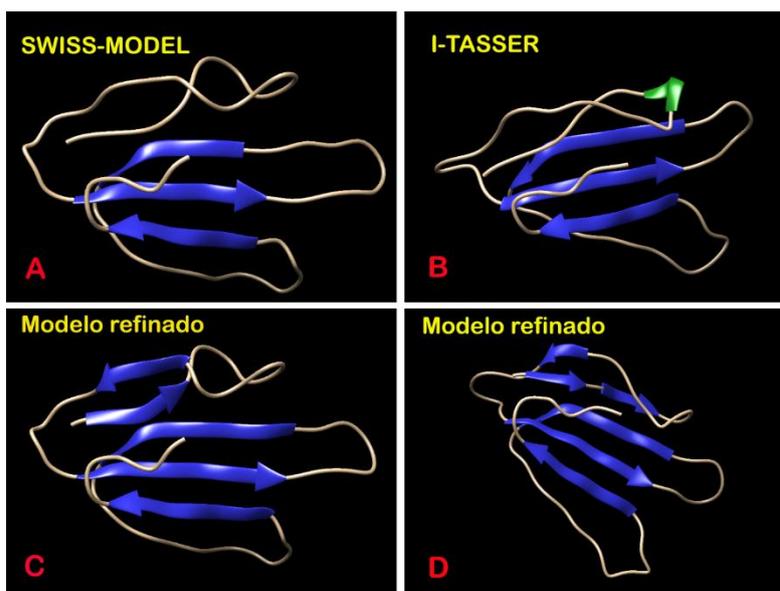


Figura 4. (A-C) Modelos obtenidos por SWISS-MODEL antes y luego de ser minimizado energéticamente por ModRefiner, respectivamente. (B-D) El mismo procedimiento, pero para los modelos obtenidos por I-TASSER.

Otra forma de determinar la confiabilidad del modelo es comprobar que tanto se ajusta el mismo a la plantilla. Esto se obtiene a partir de la desviación cuadrática media (RMSD: “*Root Medium Square Deviation*”) que es la distancia promedio entre los átomos (generalmente los átomos de la cadena principal C α)

de las proteínas superpuestas. Un buen modelo debe tener un RMSD menor a 1Å y una identidad de secuencia mayor al 50% con respecto a sus plantillas. De acuerdo con los datos que se muestran en la Tabla 4, ni I-TASSER ni SWISS-MODEL cumplen con este criterio, pero se observa una mejora en la RMSD luego del refinado (36). En la Figura 5 se puede observar la superposición de cada modelo (antes y después de ser refinado) con respecto a su plantilla, mientras que en la Figura 6 se visualiza la alineación de la secuencia de cada modelo con respecto a su plantilla.

Tabla 4. Valores de desviación cuadrática media (RMSD, siglas en inglés) para los modelos originales y refinados de I-TASSER y SWISS-MODEL con sus respectivas plantillas.

| RMSD | | |
|-------------|-------------|----------|
| I-TASSER | Sin refinar | Refinado |
| | 2.602 | 2.483 |
| SWISS-MODEL | Sin refinar | Refinado |
| | 3.564 | 2.418 |

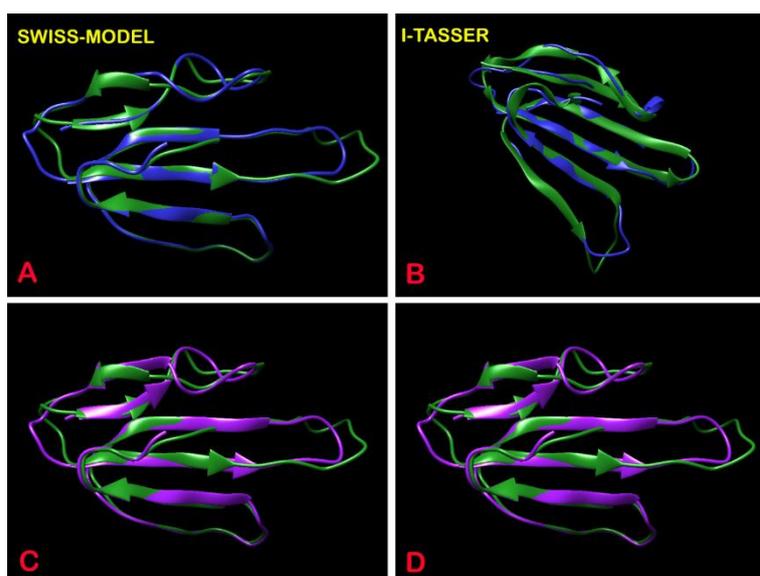


Figura 5. (A-C) Modelos de SWISS-MODEL superpuestos con su plantilla, sin refinar arriba y refinado debajo. (B-D) Modelos de I-TASSER superpuestos con su plantilla, sin refinar arriba y refinado debajo.

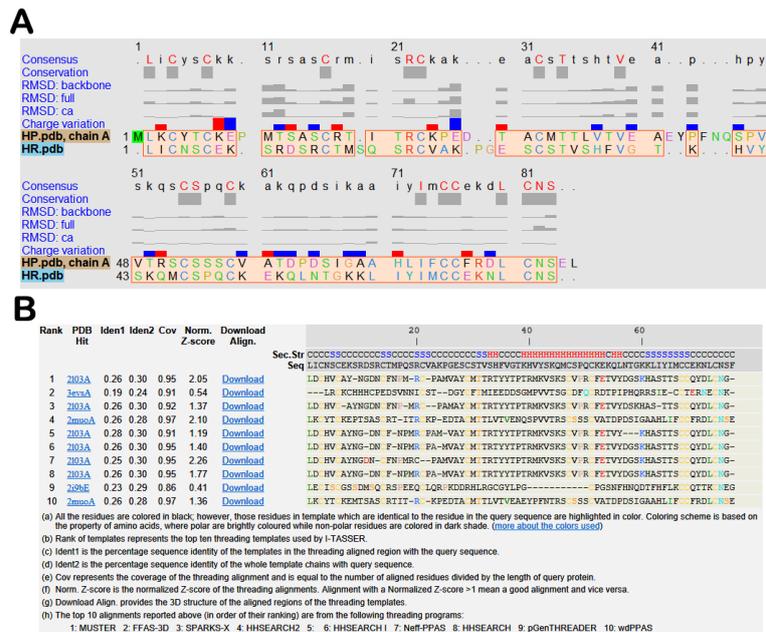


Figura 6. (A) Alineación de caltrin II de ratón con su plantilla (*Secreted Ly-6/uPAR-related protein 1*) utilizando el programa UCSF Chimera© 1.10. **(B)** Alineación de caltrin II de ratón con las mejores 10 plantillas obtenidas usando I-TASSER Suite.

Haciendo uso del servidor ProSA-web, se evaluaron las estructuras obtenidas utilizando los puntajes Z (Z-score), que indican la calidad del modelo y mide la desviación de la energía de la estructura y la compara con la distribución de energía de estructuras nativas de todas las proteínas cargadas en el Protein Data Bank (PDB), cuyas estructuras fueron obtenidas experimentalmente ya sea por rayos X y/o resonancia magnética nuclear (RMN) (37).

En la Figura 7 se observan los valores de Z, que fueron -4,09 y -4,74 para el modelo y la plantilla de SWISS-MODEL, y -5,36 y -4,13 para el modelo y la plantilla de I-TASSER. Estos valores se ubican dentro del rango de los valores normales de Z calculados para todas las proteínas nativas incorporadas en el PDB. De esto se asume que los modelos son fiables con respecto a sus plantillas.

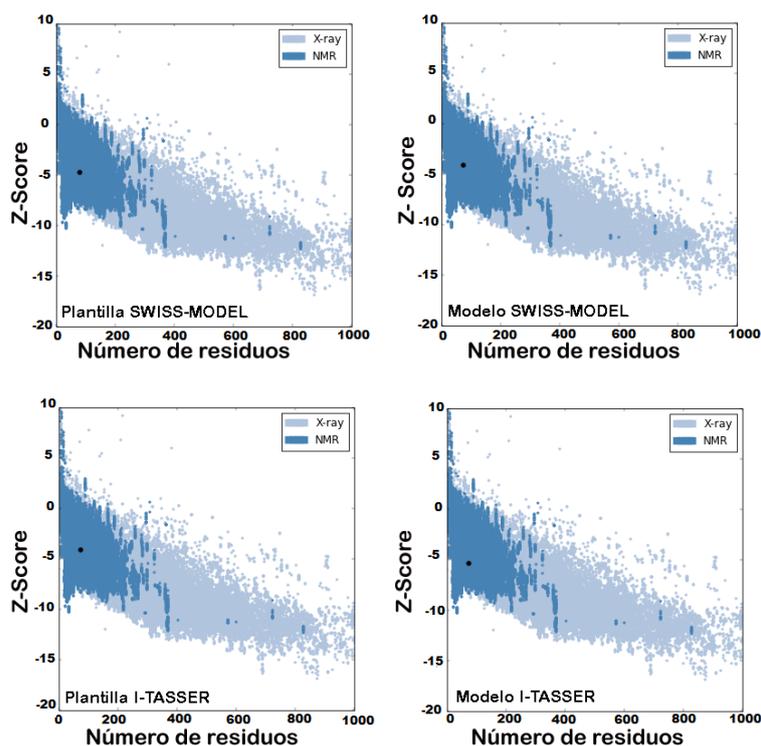


Figura 7. Z-Score se encuentra representado en gráficos donde el valor de Z para cada plantilla y modelo se resalta en un punto negro. La representación indica los valores Z de proteínas almacenados en el Banco de Datos de Proteínas, que fueron caracterizadas por Rayos X (X-ray en azul claro) y Resonancia Magnética Nuclear (NMR en azul oscuro).

Los gráficos de Ramachandran (Figura 8) fueron obtenidos utilizando el servidor RAMPAGE Ramachandran (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>). El test se realizó para cada uno de los modelos obtenidos, SWISS-MODEL y I-TASSER, antes y después de ser refinados. En la Tabla 5 se resumen los valores obtenidos por el servidor. El modelo que pasó este test de confiabilidad es el correspondiente a I-TASSER refinado, donde aproximadamente el 95% de los aminoácidos caen en regiones favorables, es decir que se ajustan perfectamente a la posición en la que se encuentran y a la estructura secundaria que forman (38).

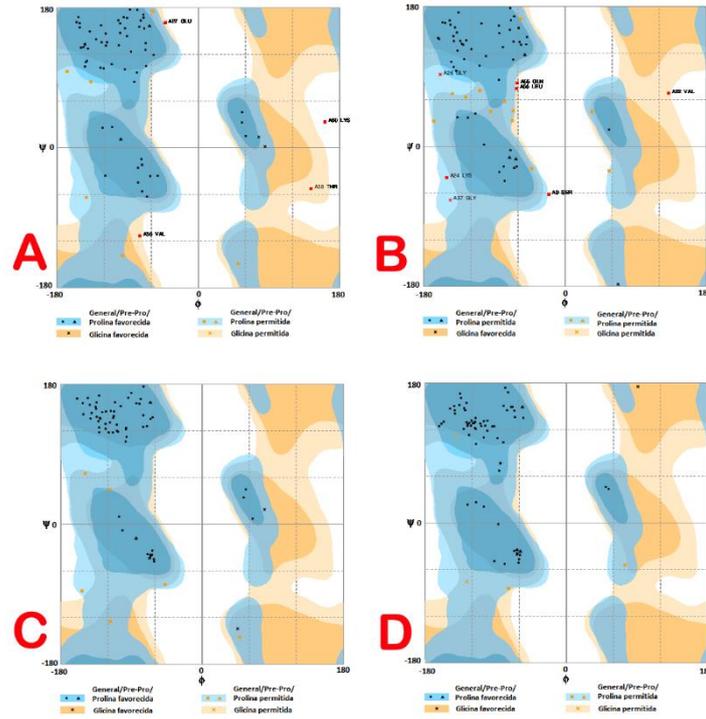


Figura 8. (A-C) Gráfico de Ramachandran para los modelos obtenidos por SWISS-MODEL sin refinar (superior) y luego de ser sometido a ModRefiner (inferior). **(B-D)** Gráfico de Ramachandran para los modelos de I-TASSER sin refinar (superior) y luego de ser sometido a ModRefiner (inferior).

Tabla 5. Valores obtenidos por RAMPAGE Ramachandran en los que se observa el porcentaje de aminoácidos de la secuencia de caltrin II de ratón que se ubican en regiones favorables, permitidas y no permitidas, para cada uno de los modelos.

| Regiones | SWISS-MODEL | SWISS-MODEL refinado | I-TASSER | I-TASSER refinado |
|---------------|-------------|----------------------|------------|-------------------|
| Favorables | 86,3% (63) | 91,8% (67) | 74,3% (55) | 94,6% (72) |
| Permitidas | 8,2% (6) | 8,2% (6) | 16,2% (12) | 5,4% (4) |
| No permitidas | 5,5% (4) | 0% (0) | 9,5% (7) | 0% (0) |

Debido a que el modelo obtenido por I-TASSER refinado mostró el mejor gráfico de Ramachandran, se lo utilizó para el resto de las determinaciones y análisis de este trabajo.

En la Figura 9 se muestran las superficies accesibles al disolvente, las superficies moleculares y las de Van der Waals obtenidas utilizando el programa Jmol©. Caltrin II de ratón presenta un área de superficie de 8989 Å³, mientras que la superficie accesible al disolvente calculada es de 5528 Å³ por molécula y la superficie molecular o no accesible al disolvente es de 4708 Å³ por molécula. Presenta un radio de giro de 12,919 Å, un radio nuclear de 25,670 Å y un radio de van der Waals de 27,494 Å obtenidos mediante el programa Yasara©.

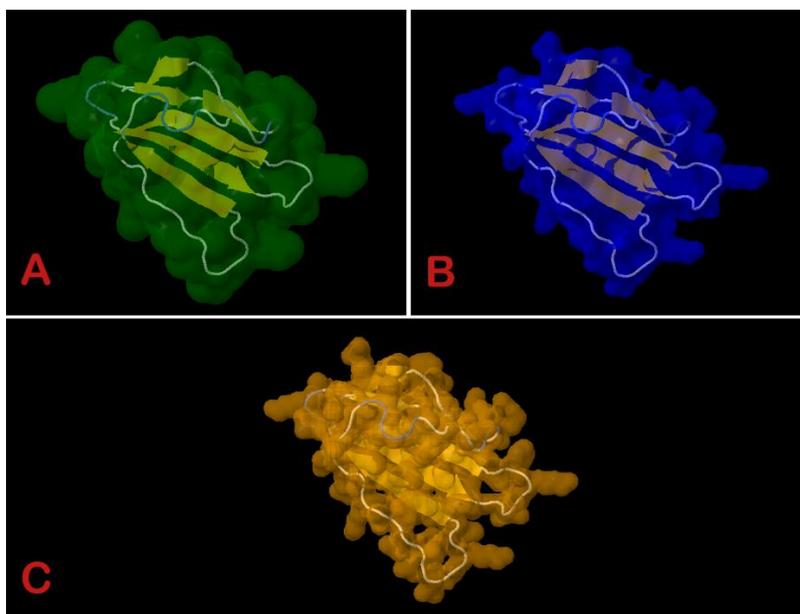


Figura 9. (A) Superficie accesible al disolvente o superficie de Lee-Richards. (B) Superficie molecular. (C) Superficie de Van der Waals. Obtenidas utilizando Jmol©.

En la Figura 10 se muestran los puentes de hidrógeno que estabilizan el modelo de I-TASSER refinado de caltrin II de ratón obtenidos mediante el programa DeepView, mientras que en la Tabla 6 se indican los aminoácidos y los átomos que forman los puentes, la distancia entre el átomo donante y aceptor del enlace y la distancia entre el hidrógeno del átomo donante y el átomo aceptor. Estos datos fueron obtenidos por el programa UCSF Chimera.

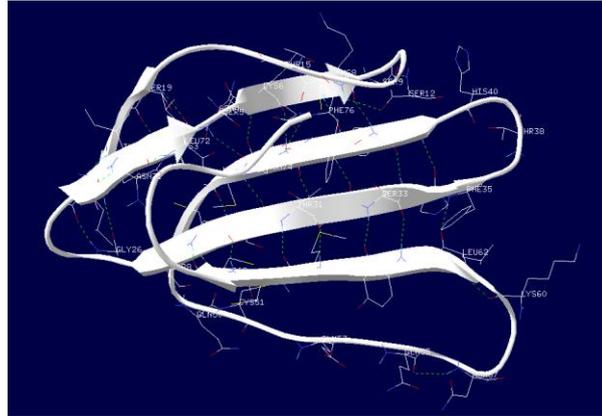


Figura 10. Puentes de hidrógeno presentes en caltrin II de ratón obtenidos utilizando el programa DeepView (Swiss-Pdb Viewer v 3.7).

Tabla 6. Puentes de hidrógeno presentes en el modelo obtenido para I-TASSER refinado utilizando el programa Chimera UCSF© 1.10.

| Donante | Aceptor | Hidrógeno | D-A distancia | D.H-A distancia |
|----------|------------|-----------|---------------|-----------------|
| ILE 2 N | ASN 71 OD1 | ILE 2 H | 2.960 | 2.076 |
| CYS 3 N | SER 19 O | CYS 3 H | 2.981 | 2.018 |
| ASN 4 N | ASN 74 OD1 | ASN 4 H | 3.138 | 2.212 |
| CYS 6 N | GLN 45 O | CYS 6 H | 2.959 | 2.014 |
| LYS 8 N | SER 43 O | LYS 8 H | 3.064 | 2.104 |
| SER 12 N | SER 9 O | SER 12 H | 3.460 | 2.520 |
| SER 19 N | CYS 3 O | SER 19 H | 2.918 | 1.967 |
| CYS 21 N | LEU 1 O | CYS 21 H | 2.931 | 1.979 |
| VAL 22 N | GLY 26 O | VAL 22 H | 3.114 | 2.149 |
| GLY 26 N | VAL 22 O | GLY 26 H | 2.865 | 1.901 |
| SER 28 N | SER 48 O | SER 28 H | 2.926 | 1.991 |

| | | | | |
|----------|----------|----------|-------|-------|
| CYS 29 N | CYS 68 O | CYS 29 H | 2.933 | 1.977 |
| SER 30 N | MET 46 O | SER 30 H | 2.883 | 1.942 |
| THR 31 N | MET 66 O | THR 31 H | 2.968 | 2.009 |
| VAL 32 N | LYS 44 O | VAL 32 H | 2.951 | 1.989 |
| SER 33 N | TYR 64 O | SER 33 H | 2.893 | 1.932 |
| HIS 34 N | TYR 42 O | HIS 34 H | 2.935 | 1.975 |
| PHE 35 N | LEU 62 O | PHE 35 H | 2.879 | 1.917 |
| TYR 42 N | HIS 34 O | TYR 42 H | 3.147 | 2.190 |
| SER 43 N | LYS 8 O | SER 43 H | 3.047 | 2.083 |
| LYS 44 N | VAL 32 O | LYS 44 H | 2.909 | 1.946 |
| GLN 45 N | CYS 6 O | GLN 45 H | 2.930 | 1.961 |
| MET 46 N | SER 30 O | MET 46 H | 3.002 | 2.044 |
| SER 48 N | SER 28 O | SER 48 H | 2.940 | 1.984 |
| LEU 62 N | LYS 60 O | LEU 62 H | 2.757 | 1.978 |
| TYR 64 N | SER 33 O | TYR 64 H | 2.931 | 1.967 |
| MET 66 N | THR 31 O | MET 66 H | 2.909 | 1.950 |
| CYS 68 N | CYS 29 O | CYS 68 H | 2.950 | 1991 |
| LEU 72 N | ILE 2 O | LEU 72 H | 2.983 | 2.045 |
| PHE 76 N | ASN 74 O | PHE 76 H | 2.466 | 1.647 |

Determinación de estructura secundaria

La estructura secundaria fue determinada utilizando ESPript 3.0 (39) para la plantilla y PSIPRED v 3.3 (40) para la secuencia (Figura 11). Ambas predicciones muestran 6 hojas β como únicas estructuras secundarias que representarían aproximadamente el 40% de los residuos de aminoácidos, mientras que el 60% restante estaría en una estructura desordenada. Las secuencias de las 6 hojas

β son: ICNS (2 a 5), RCV (20 a 22), CSTVSHF (29 a 35), KHVYSK (39 a 44), QLNT (55 a 58) y KLIYIM (61 a 66). Las secuencias encontradas para las hojas β del modelo son: ICN (2 a 4), CEK (6 a 8), QSR (18 a 20), SCSTVSH (28 a 34), YSKQMCS (42 a 48) y IYIMCC (63 a 68). La estructura secundaria del modelo se adapta considerablemente a la estructura predicha para la secuencia, debido a que ambos tienen la misma cantidad de hojas β y 5 de ellas se superponen en algunos aminoácidos. Estos datos también se observan en la predicción de desorden por residuo (Figura 12), la cual muestra que más del 50% de la estructura de la proteína está desordenada, es decir sin formar estructura secundaria (41).

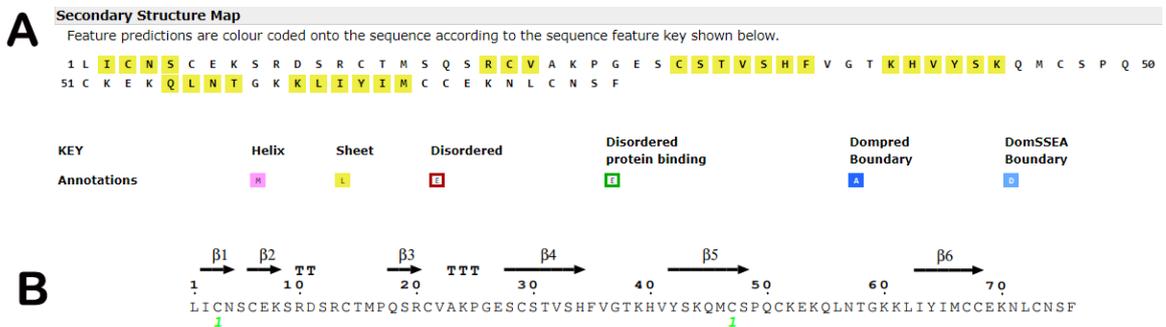


Figura 11. (A) Predicción de estructura secundaria a partir de la secuencia utilizando PSIPRED v 3.3. **(B)** Predicción de la estructura secundaria a partir de la plantilla del modelo de I-TASSER refinado utilizando ESPrpt 3.0.



Figura 12. Predicción de desorden por residuo obtenida a partir de la secuencia de caltrin II de ratón utilizando RONN v3.2.

Dicroísmo circular

En la Figura 13 se muestra el espectro de dicroísmo circular de caltrin II de ratón, en el cual se observa un pico negativo a 210 nm y uno positivo a 190 nm en el espectro realizado en agua, lo que indica que la estructura secundaria de la proteína se encuentra parcialmente formada por hojas β (32). Por otro lado, tanto el algoritmo de Chou-Fasman como el espectro de DC denotan la prevalencia de estructuras β y una baja proporción de α hélices.

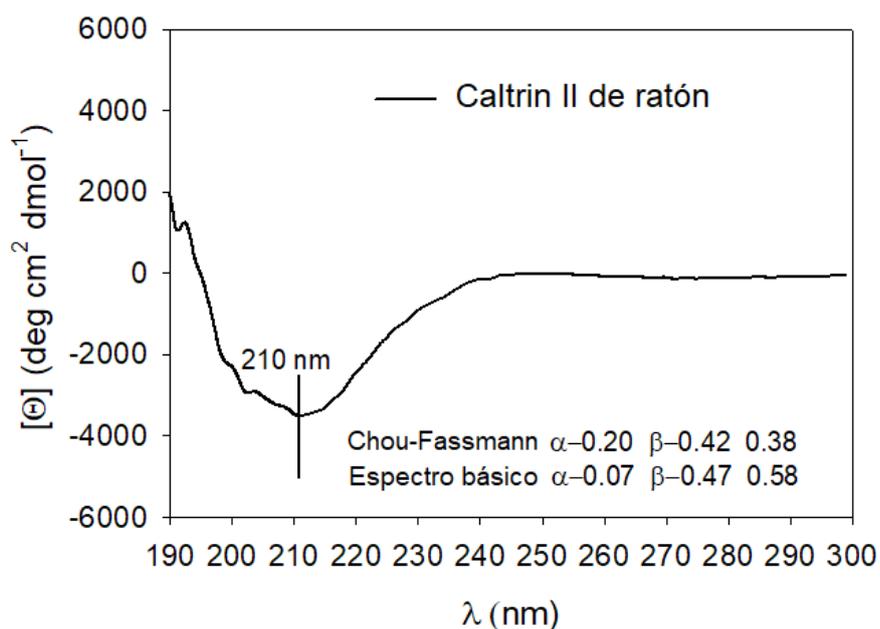


Figura 13. Se muestran los valores obtenidos por el algoritmo de Chou y Fasman y para el espectro de DC.

Potenciales electrostáticos y campos eléctricos

Las interacciones electrostáticas surgen debido a cargas locales, a la distribución no esférica en la densidad de electrones, a la redistribución de electrones causada por campos eléctricos presentes en el entorno y a la reorientación de grupos polares presentes en el soluto y en el solvente debido a los campos eléctricos presentes (42). La ley de Coulomb supone que las cargas de la proteína interactúan con las del medio y éstas últimas se hallan caracterizadas por una única constante dieléctrica (D). La ecuación de Poisson-Boltzmann por su parte, plantea que la proteína y el medio poseen cada uno una constante dieléctrica diferente y esto lo hace más realista para trabajar con los

modelos moleculares tridimensionales (30). En las Figuras 14 y 15 se muestra que la proteína está cubierta mayoritariamente por cargas positivas (azul), lo cual concuerda con su pI de 10,2. En la Figura 15 se puede apreciar una proyección de campo eléctrico con carga neta positiva que se expande hacia el solvente.

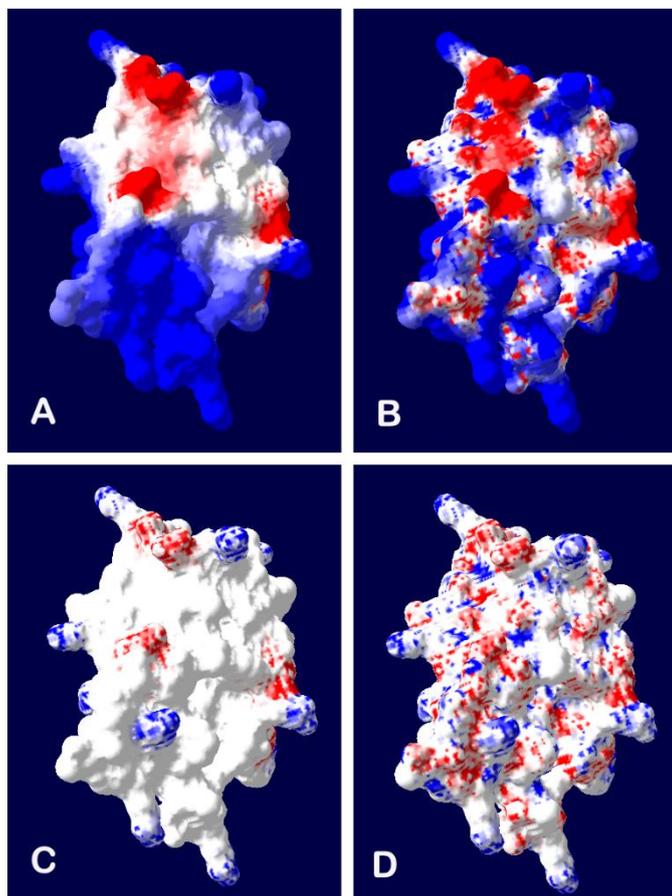


Figura 14. Potencial electrostático de superficie teórico calculado para el modelo de I-TASSER refinado obtenidas con el programa DeepView (Swiss-Pdb Viewer v 3.7). **(A, B)** Residuos cargados y cargas parciales de cadenas laterales para 0 mM NaCl de fuerza iónica, respectivamente. **(C, D)** Residuos cargados y cargas parciales de cadenas laterales para 145 mM NaCl de fuerza iónica, respectivamente. La superficie molecular está coloreada con un gradiente de color rojo (-1,8 mV como punto de corte), blanco (puntos neutros) y azul (1,8 mV como punto de corte).

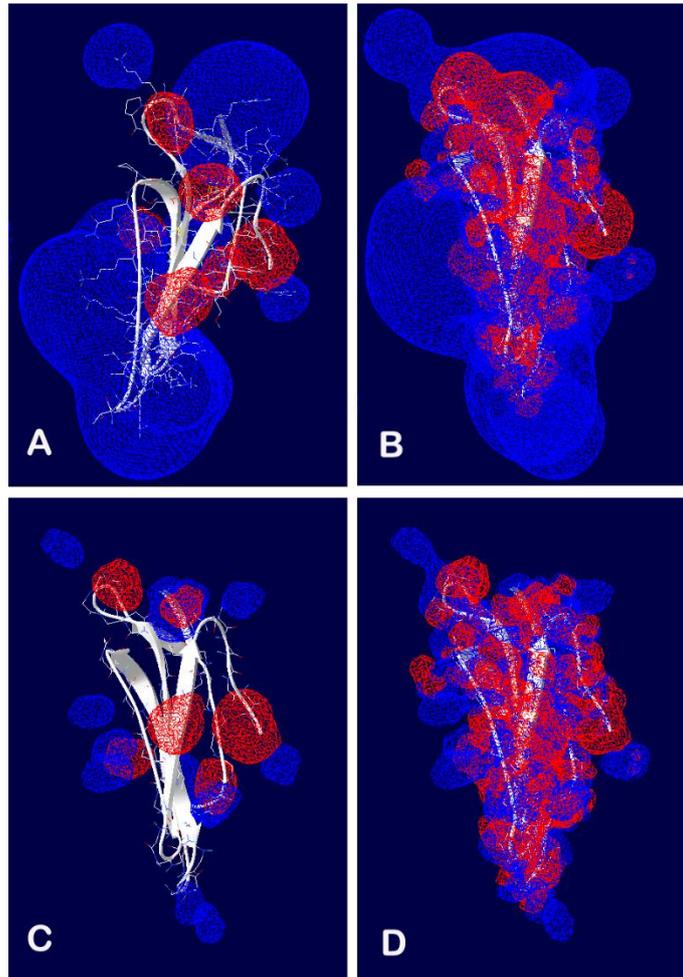


Figura 15. Campos eléctricos teóricos calculados para el modelo de I-TASSER refinado obtenidas con el programa DeepView (Swiss-Pdb Viewer v 3.7). **(A, B)** Residuos cargados y cargas parciales de cadenas laterales para 0 mM NaCl de fuerza iónica, respectivamente. **(C, D)** Residuos cargados y cargas parciales de cadenas laterales para 145 mM NaCl de fuerza iónica, respectivamente. El color rojo indica valores por debajo de -1,8 mV, mientras que el azul indica valor por encima de 1,8 mV.

Perfil de hidropaticidad de Kyte y Doolittle

El índice de Kyte y Doolittle (16) y el porcentaje de residuos accesibles al solvente (43) fueron obtenidos utilizando el server ExPASy ProtScale. Cada aminoácido posee un valor individual en kcal/mol para el cálculo de KD (Kyte y Doolittle) y el porcentaje de accesibilidad de cada residuo. Valores por arriba de 0 kcal/mol indica que los aminoácidos localizados en esa región son más hidrofóbicos. Las interacciones hidrofóbicas hacen que un aminoácido en solución acuosa se introduzca dentro de la membrana, mientras que las

interacciones polares y las cadenas laterales cargadas promueven la permanencia del mismo en el entorno acuoso (44). En la Figura 16 se observa que mayoritariamente se trata de una proteína hidrofílica ya que un porcentaje importante de los aminoácidos se encuentra por debajo de las 0 kcal/mol indicando que son más afines al agua.

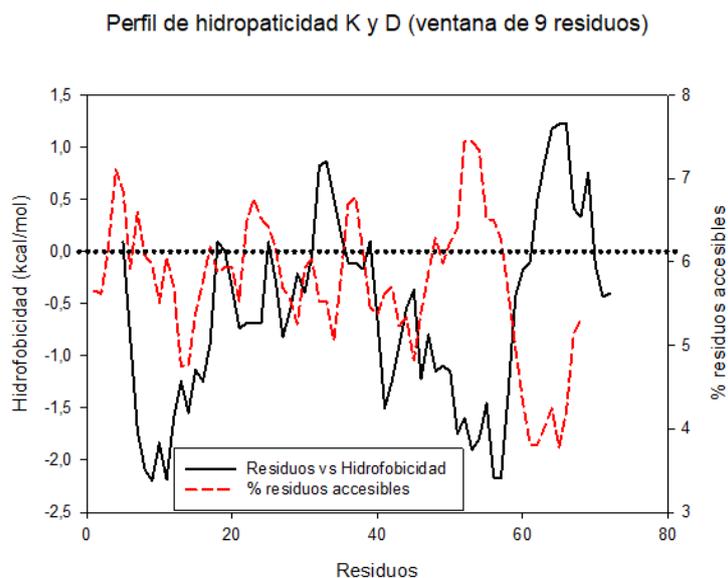


Figura 16. Escala de hidropaticidad de Kyte y Doolittle utilizando una ventana de 9 residuos ilustrada con línea continua negra y porcentaje de residuos accesibles ilustrada con línea discontinua roja.

Área óptima de unión o “docking” a membrana

El server M.O.D.A (*Membrane Optimal Docking Area*) muestra las zonas más propensas dentro de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interactuar con membranas. Utilizando este algoritmo, este método bioinformático permite detectar potenciales proteínas de membrana periféricas y residuos individuales que se insertan dentro de la membrana (34). En la Figura 17 se muestra que el área de mayor docking o unión abarca los residuos 34 a 37, que corresponden a los residuos HFVG, los cuales parecen ser altamente hidrofóbicos de acuerdo con lo que se observa en la Figura 16.

Área de membrana óptima para docking

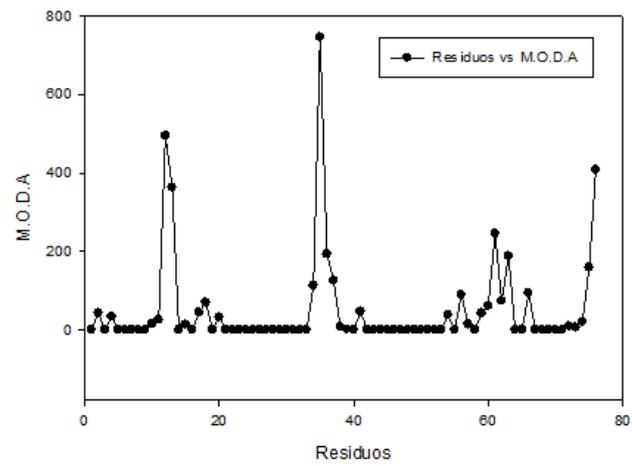


Figura 17. Valores de M.O.D.A (área de membrana óptima para “docking” o unión) para cada residuo de la proteína.

DISCUSIÓN

El propósito de esta tesina de grado fue el de llevar a cabo la caracterización físico-química y estructural de la proteína caltrin II de ratón, que es una proteína del plasma seminal sintetizada en las vesículas seminales y que se une a los espermatozoides durante la eyaculación (18). Los parámetros obtenidos y analizados nos permiten establecer las condiciones apropiadas para realizar diferentes estudios *in vitro* ya que indicaron que la proteína no es estable al ser almacenada en solución acuosa durante largos períodos de tiempo. A raíz de estos nuevos datos, procedimos a almacenarla luego de ser liofilizada y solamente se disolvió en agua la cantidad necesaria para realizar los experimentos. Se observó que el *pI* estimado por IEF (isoelectroenfoque) calculado por Coronel y colaboradores (18) difiere del determinado *in silico*; mientras el valor experimentalmente obtenido de *pI* fue de 10,2, el definido *in silico* fue de 9. Esta diferencia puede deberse a múltiples causas, la más probable es la falta de calibración en los algoritmos, comparando valores teóricos con experimentales, usados para la determinación *in silico* (45); otras podrían deberse a modificaciones post-traduccionales que cambian la carga, precipitación de la proteína durante la migración en el gel (45), etc. Teniendo en cuenta que la diferencia es poco mayor a una unidad, ambos valores o un promedio de ellos pueden ser aceptables.

Dado que no existen estructuras cristalográficas o por Resonancia Magnética Nuclear de caltrin II de ratón, elaboramos un modelo tridimensional de dicha proteína. Para esto se utilizaron dos métodos bioinformáticos que se basan en premisas diferentes para armar la estructura 3D. El motivo de hacerlo por dos métodos se debe a que de esta manera podemos comparar y seleccionar el modelo más preciso, es decir con mejores valores de ajuste, y también comparando con los datos obtenidos para la estructura secundaria. Ambos modelos presentaron una identidad de secuencia baja, ya que surgen de comparaciones con proteínas no homólogas a caltrin II. Para el caso de SWISS-MODEL la baja similitud de secuencia resulta en un modelo 3D con menor confiabilidad, mientras que el modelado por “*threading*” obtenido del servidor I-TASSER, que no tiene en cuenta la similitud de secuencia, pero sí las restricciones estéricas y configuraciones energéticas favorables, presentó un

mejor ajuste. Esto se evidencia en el gráfico de Ramachandran que muestra que el modelo de I-TASSER tiene mayor cantidad de aminoácidos en ubicaciones favorables, por lo tanto las estructuras formadas por esos aminoácidos presentan menos choques estéricos que las del otro modelo. En base a esto, se procedió a utilizar esta estructura 3D para realizar el resto de las determinaciones descriptas en el presente trabajo.

En cuanto a la estructura secundaria estimada para esta proteína, los distintos análisis computacionales coinciden con que la mayor parte de la secuencia (50 % al menos) se encuentra desordenada y el resto se halla formando estructuras tipo β , sin la presencia de hélices α . En comparación con los datos obtenidos del espectro de dicroísmo circular, los valores *in silico* coinciden en gran parte ya que el espectro básico para estas condiciones indica estructuras tipo β , en casi un 50% de la proteína, y el resto de la estructura es desordenada. Cabe resaltar que el espectro indica también una pequeña proporción de estructura de hélice α . Luo y colaboradores (19) a través de la misma técnica hallaron que la estructura secundaria de caltrin II presenta una composición predominante de hojas β respecto a las hélices α . Respecto a este tipo de estructura nuestro modelo 3D obtenido por I-TASSER previo a la refinación, también mostró un segmento de hélice α que comprende los aminoácidos SRD ubicados en las posiciones 9 a 11 de la secuencia. Sin embargo, dado que estos residuos muestran configuraciones estéricas desfavorables según el test de Ramachandran y que el modelo 3D por I-TASSER luego de ser refinado indica ausencia de hélices α , postulamos que no existiría este tipo de configuración secundaria en caltrin II.

El análisis computacional utilizando el algoritmo M.O.D.A, el cual indica los aminoácidos más propensos de unirse a membrana, muestra que los residuos 34 a 37 (HFVG) serían los que hacen “*docking*” o unión con la membrana del espermatozoide. Estos residuos no se encuentran en hojas β lo que facilitaría su posible unión a membrana. Además, estos aminoácidos se encuentran en un campo eléctrico positivo de la proteína determinado con una fuerza iónica de 145 mM, un entorno probable de encontrar en una célula. Además el perfil de hidropaticidad de Kyte y Doolittle muestra que dichos aminoácidos son hidrofóbicos, por lo tanto, intentan escapar del entorno acuoso

y se introducirían parcialmente dentro de la membrana plasmática del espermatozoide.

Luo y colaboradores (19) sugirieron que el sitio de unión de caltrin II en las membranas de los espermatozoides están constituidos por fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina. De hecho, la demostración de que lípidos extraídos de espermatozoides y dispersados en solución acuosa inhiben la unión de caltrin II a las membranas sugiere que el sitio de unión es de naturaleza lipídica. Sin embargo, en las membranas espermáticas, la fosfatidilserina es un componente relativamente menor y está asimétricamente distribuido en la hemicapa interna (46). Pero este hecho no descarta que la interacción caltrin II-membranas esté localizada en nanodominios aniónicos. Se ha demostrado la existencia de otras especies lipídicas como fosfoinosítidos y gangliósidos (47; 48) cargadas negativamente y localizadas en la superficie de los espermatozoides. La carga neta positiva de la proteína caltrin II favorecería la unión a estos lípidos. Teniendo en cuenta todas estas evidencias experimentales además de las determinaciones in silico, proponemos un posible modelo de interacción caltrin II-membrana espermática. Ver Figura 18.

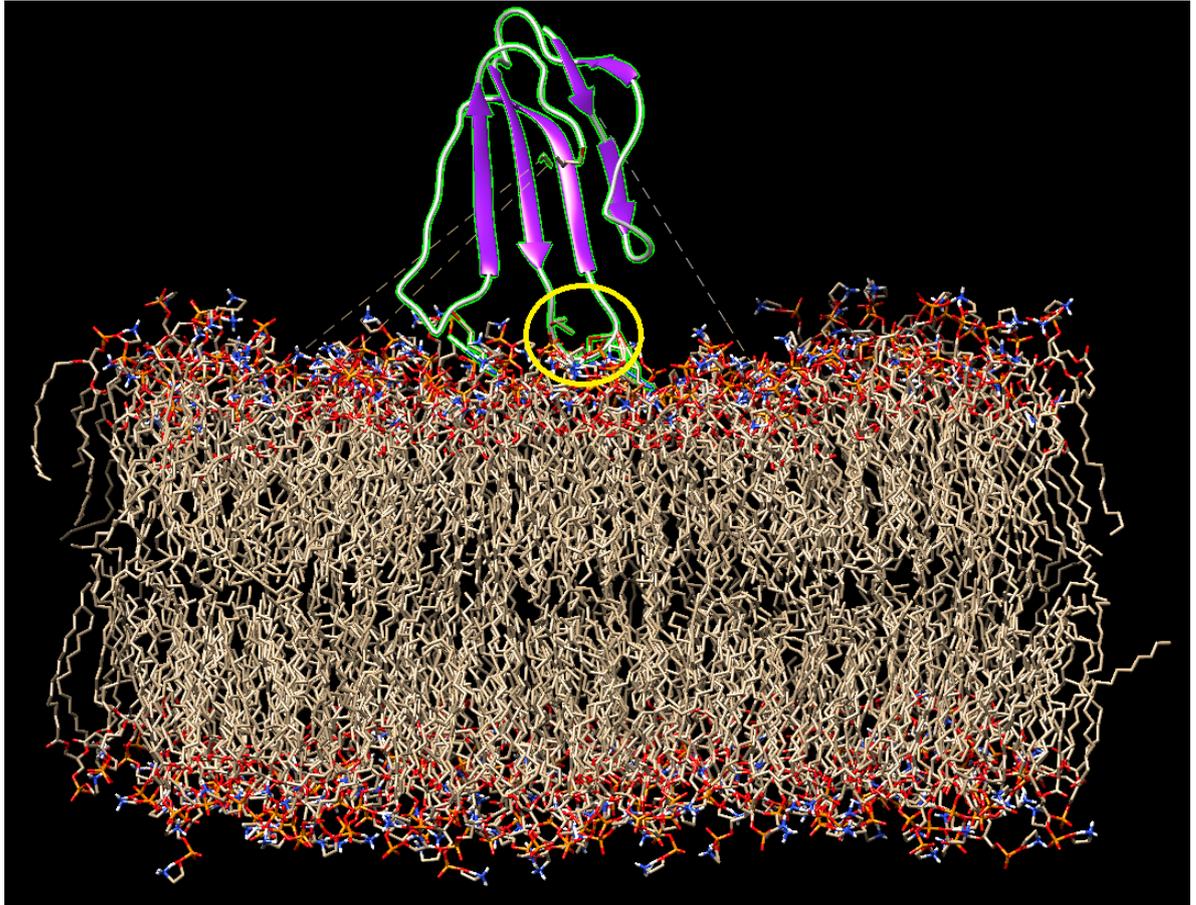


Figura 18. Modelo propuesto de interacción entre caltrín II y una membrana modelo (bicapa constituida por palmitoileoilfosfatidilserina, POPS). A partir de los valores de M.O.D.A. orientamos vectorialmente los residuos con mayor propensión de unirse a la membrana (región delimitada por el círculo).

CONCLUSIONES

Como ya mencionamos en la introducción, existen diversos factores que regulan la reproducción en mamíferos (1). Entre estos, las proteínas secretadas en el plasma seminal han dado muestras de cumplir un rol muy importante en la regulación de numerosos procesos fisiológicos del espermatozoide asociados a la fertilización (1; 8). Estudios proteómicos sobre los espermatozoides y los fluidos seminales de diversos mamíferos han permitido identificar diversas moléculas involucradas en mecanismos moleculares tanto para la generación como el mantenimiento de la capacidad fertilizante (1). Si bien en el presente trabajo nos limitamos al estudio de la proteína caltrin II de ratón, las proteínas tipo caltrin en general, las cuales son sintetizadas en el epitelio secretor de las vesículas seminales bajo estricto control androgénico (49; 50; 51) parecen estar involucradas en la modulación del proceso de fertilización, regulando no solamente la entrada extracelular de Ca^{2+} y, consecuentemente la reacción acrosomal y/o la hiperactivación del espermatozoide, sino también la actividad de enzimas espermáticas las cuales tendrían un rol en la capacidad fertilizante. La actividad de las proteínas tipo caltrin en modular dichos eventos fisiológicos los cuales ocurren previamente a la fertilización es muy específica y ocurren sin alterar la capacitación espermática (52). Por lo tanto, las proteínas caltrin protegen la integridad acrosomal y la funcionalidad requerida para que los espermatozoides se unan al epitelio oviductal donde son retenidos bajo condiciones protectoras hasta que ocurra la ovulación. Como fue demostrado previamente por Clark y colaboradores (13), la acción protectora de caltrin sobre el acrosoma espermático no interfiere con la reacción acrosómica inducida por la zona pelúcida lo cual garantiza el éxito reproductivo.

Si bien la actividad funcional de las proteínas caltrin se realiza mediante la unión específica a las células espermáticas, probablemente por medio de receptores o nanodominios lipídicos de la membrana, dichas interacciones no han sido descritas hasta el presente. Es más, pocos estudios estructurales han sido realizados sobre las estructuras secundarias y terciarias de estas proteínas. Por lo tanto, en la presente tesina de grado tratamos de conectar las propiedades biológicas y estructurales (secuencia) conocidas para la proteína caltrin II de ratón con su estructura secundaria y terciaria, obtenida mediante herramientas

bioinformáticas con el propósito de explicar como sería su interacción con las membranas espermáticas.

Dicha interacción estaría mediada por el campo eléctrico positivo generado por los residuos más propensos de unirse a membrana, determinados por el algoritmo M.O.D.A, los cuales son HFVG ubicados en la posición 34 a 37 de la secuencia de caltrin II de ratón. Se trata, además, de aminoácidos con un valor de hidrofobicidad moderado pero accesibles al disolvente y en consecuencia, con mayor probabilidad de unirse a membrana. La interacción de caltrin II de ratón con las membranas de espermatozoides podría estar mediada a través de nanodominios aniónicos formados por especies lípidas como fosfoinosítidos y gangliósidos que presentan carga negativa. Mediante esta unión caltrin cumpliría su rol de inhibir la entrada de Ca^{2+} extracelular y bloquear el comienzo del movimiento hiperactivado desde que los espermatozoides son depositados en el tracto reproductor de la hembra hasta que se capacitan con el fin de fertilizar el ovocito.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Yanagimachi, R.** Mammalian fertilization. 1998. E. Knobil. *The Physiology of Reproduction*. New York : Raven Press, 189-317.
2. **Jodar, M.; Soler-Ventura, A. & Oliva, R.** 2017. Semen proteomics and male infertility. *J Proteomics*, 162, 125-134.
3. **Gadella, B.M.** 2017. Reproductive tract modifications of the boar sperm surface. *Mol Reprod Dev*, 84 (9), 822-831.
4. **Florman, H.M. & Fissore, R.A.** Fertilization in Mammals. 2015. *Physiology of reproduction*. New York : Elsevier, 149-196.
5. **Rufo, G.A. Jr.; Singh, J.P.; Babcock, D.F. & Lardy, H.A.** 1982. Purification and characterization of a calcium transport inhibitor protein from bovine seminal plasma. *J Biol Chem*, 257 (8), 4627-32.
6. **San Agustin, J.T.; Hughes, P. & Lardy, H.A.** 1987. Properties and function of caltrin, the calcium-transport inhibitor of bull seminal plasma. *FASEB J*, 1 (1), 60-6.
7. **Grasso, E.J. & Coronel, C.E.** 2017. Structure and Function of Caltrin (Calcium Transport Inhibitor) Proteins. *Biochem Insights*, 10, 1-8.
8. **Lardy, H.A.** 2003. Happily at work. *J Biol Chem*, 278 (6), 3499-509.
9. **Dematteis, A.; Miranda, S.D.; Novella, M.L.; Maldonado, C.; Ponce, R.H.; Maldera, J.A.; Cuasnicu, P.S. & Coronel, C.E.** 2008. Rat caltrin protein modulates the acrosomal exocytosis during sperm capacitation. *Biol Reprod*, 79 (3), 493-500.
10. **Coronel, C.E.; San Agustin, J.T & Lardy, H.A.** 1990. Purification and structure of caltrin-like proteins from seminal vesicle of the guinea pig. *J Biol Chem*, 265 (12), 6854-9.
11. **Coronel, C.E. & Lardy, H.A.** 1992. Functional properties of caltrin proteins from seminal vesicle of the guinea pig. *Mol Reprod Dev*, 33 (1), 74-80.
12. **San Agustin, J.T. & Lardy, H.A.** 1993. Lysogenic activity of enhancer caltrin and the influence of phospholipids on its expression. *Biol Reprod*, 49 (4), 723-9.
13. **Clark, E.N.; Corron, M.E. & Florman, H.M.** 1993. Caltrin, the calcium transport regulatory peptide of spermatozoa, modulates acrosomal exocytosis in response to the egg's zona pellucida. *J Biol Chem*, 268 (7), 5309-16.
14. **Chen, L.Y.; Lin, Y.H.; Lai, M.L. & Chen, Y.H.** 1998. Developmental profile of a caltrin-like protease inhibitor, P12, in mouse seminal vesicle and characterization of its binding sites on sperm surface. *Biol Reprod*, 59 (6), 1498-505.

15. **Winnica, D.E.; Novella, M.L.; Dematteis, A. & Coronel, C.E.** 2000. Trypsin/acrosin inhibitor activity of rat and guinea pig caltrin proteins. Structural and functional studies. *Biol Reprod*, 63 (1), 42-8.
16. **Kyte, J. & Doolittle, R.F.** 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, 157 (1), 105-32.
17. **Wilkins, M.R.; Gasteiger, E.; Bairoch, A.; Sanchez, J.C.; Williams, K.L.; Appel, R.D. & Hochstrasser, D.F.** 1999. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol*, 112, 531-52.
18. **Coronel, C.E.; Winnica, D.E.; Novella, M.L. & Lardy, H.A.** 1992. Purification, structure, and characterization of caltrin proteins from seminal vesicle of the rat and mouse. *J Biol Chem*, 267 (29), 20909-15.
19. **Luo, C.W.; Lin, H.J. & Chen, Y.H.** 2001. A novel heat-labile phospholipid-binding protein, SVS VII, in mouse seminal vesicle as a sperm motility enhancer. *J Biol Chem*, 276 (10), 6913-21.
20. **Winnica, D.E.** 1996. Aislamiento y caracterización de proteínas caltrin del tracto reproductor de mamíferos. *Tesis Doctoral*. Córdoba, Argentina : Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas.
21. **Grasso, E.J; Sottile, A.E. & Coronel, C.E.** 2016. Structural Prediction and In Silico Physicochemical Characterization for Mouse Caltrin I and Bovine Caltrin Proteins. *Bioinform Biol Insights*, 10, 225-236.
22. **Gasteiger, E.; Hoogland, C.; Gattiker, A.; Duvaud, S.; Wilkins, M.R.; Appel, R.D. & Bairoch, A.** 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocol Handbook*. s.l. : Humana Press, 571-607.
23. **Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W. & Lipman, D.J.** 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215 (3), 403-10.
24. **Remmert, M.; Biegert, A.; Hauser, A. & Söding, J.** 2011. HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. *Nat Methods*, 9 (2), 173-5.
25. **Biasini, M.; Bienert, S.; Waterhouse, A.; Arnold, K.; Studer, G.; Schmidt, T.; Kiefer, F.; Gallo Cassarino, T.; Bertoni, M.; Bordoli, L. & Schwede, T.** 2014. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res*, 42 (Web Server issue), W252-8.
26. **Guex, N. & Peitsch, M.C.** 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18 (15), 2714-23.
27. **Yang, J.; Yan, R.; Roy, A.; Xu, D.; Poisson, J. & Zhang, Y.** 2015. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods*, 12 (1), 7-8.

28. **Xu, D. & Zhang, Y.** 2011. Improving the physical realism and structural accuracy of protein models by a two-step atomic-level energy minimization. *Biophys J*, 101 (10), 2525-34.
29. **Pettersen, E.F.; Goddard, T.D.; Huang, C.C.; Couch, G.S.; Greenblatt, D.M.; Meng, E.C. & Ferrin, T.E.** 2004. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, 25 (13), 1605-12.
30. **Neves-Petersen, M.T. & Petersen, S.B.** 2003. Protein electrostatics: a review of the equations and methods used to model electrostatic equations in biomolecules--applications in biotechnology. *Biotechnol Annu Rev*, 9, 315-95.
31. **Nolan, V.; Perduca, M.; Monaco, H.L. & Montich, G.G.** 2005. Chicken liver bile acid-binding protein is in a compact partly folded state at acidic pH. Its relevance to the interaction with lipid membranes. *Biochemistry*, 44 (23), 8486-93.
32. **Wiedemann, C.; Bellstedt, P. & Görlach, M.** 2013. CAPITO--a web server-based analysis and plotting tool for circular dichroism data. *Bioinformatics*, 29 (14), 1750-7.
33. **Kufareva, I.; Budagyan, L.; Raush, E.; Totrov, M. & Abagyan, R.** 2007. PIER: protein interface recognition for structural proteomics. *Proteins*, 67 (2), 400-17.
34. **Kufareva, I.; Lenoir, M.; Dancea, F.; Sridhar, P.; Raush, E.; Bissig, C.; Gruenberg, J.; Abagyan, R. & Overduin, M.** 2014. Discovery of novel membrane binding structures and functions. *Biochem Cell Biol*, 92 (6), 555-63.
35. **Ikai, A.** 1980. Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *J Biochem*, 88 (6), 1895-8.
36. **Baker, D. & Sali, A.** 2001. Protein structure prediction and structural genomics. *Science*, 294 (5540), 93-6.
37. **Wiederstein, M. & Sippl, M.J.** 2007. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res*, 35 (Web Server issue), 407-10.
38. **Lovell, S.C.; Davis, I.W.; Arendall, W.B. 3rd; de Bakker, P.I.; Word, J.M.; Prisant, M.G.; Richardson, J.S. & Richardson, D.C.** 2003. Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. *Proteins*, 50 (3), 437-50.
39. **Gouet, P.; Robert, X. & Courcelle, E.** 2003. ESPript/ENDscript: Extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins. *Nucleic Acids Res*, 31 (13), 3320-3.
40. **Jones, D.T.** 1999. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol*, 292 (2), 195-202.

41. **Yang, Z.R.; Thomson, R.; McNeil, P. & Esnouf, R.M.** 2005. RONN: the bio-basis function neural network technique applied to the detection of natively disordered regions in proteins. *Bioinformatics*, 21 (16), 3369-76.
42. **Moult, J.** 1992. Electrostatics, *Curr Opin Struct Biol*, 2 (2), 223–9.
43. **Janin, J.** 1979. Surface and inside volumes in globular proteins. *Nature*, 277 (5696), 491-2.
44. **Engelman, D.M.; Steitz, T.A. & Goldman, A.** 1986. Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*, 15, 321-53.
45. **Audain, E.; Ramos, Y.; Hermjakob, H.; Flower, D.R. & Perez-Riverol, Y.** 2016. Accurate estimation of isoelectric point of protein and peptide based on amino acid sequences. *Bioinformatics*, 32 (6), 821-7.
46. **Ladha, S.** 1998. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. *J Membr Biol*, 165 (1), 1-10.
47. **Bearer, E.L. & Friend, D.S.** 1980. Anionic lipid domains: correlation with functional topography in a mammalian cell membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77 (11), 6601-5.
48. **Bearer, E.L. & Friend, D.S.** 1982. Modifications of anionic-lipid domains preceding membrane fusion in guinea pig sperm. *J Cell Biol*, 92 (3), 604-15.
49. **Novella, M.L.; Maldonado, C.; Aoki, A. & Coronel, C.E.** 1999. Androgen-dependent synthesis/secretion of caltrin, calcium transport inhibitor protein of mammalian seminal vesicle. *Arch Androl*, 43 (1), 1-12.
50. **Mirosevich, J.; Bentel, J.M. & Dawkins, J.S.** 2001. Regulation of caltrin mRNA expression by androgens in the murine prostate. *J Androl*, 22 (3), 449-457.
51. **Furutani, Y.; Kato, A.; Kawai, R.; Fibriani, A.; Kojima, S. & Hirose, S.** 2004. Androgen-dependent expression, gene structure, and molecular evolution of guinea pig caltrin II, a WAP-motif protein. *Biol Reprod*, 71 (5), 1583-1590.
52. **Dematteis, M.A.** 1995. Efecto de las proteínas caltrin sobre la reacción acrosomal, hiperactivación y fertilización in vitro. Estudios en rata y ratón. *Tesina para optar al título de biólogo*. Córdoba, Argentina : Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.