



**Universidad Nacional de Córdoba**

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba**

**Fosfolipasas de Veneno de Yarará Chica**

**Clonado, Expresión Funcional y Análisis de Hidrólisis  
de Sustrato en Monocapas Aire /Agua**

**Por**

**Pablo Javier Yunes Quartino**

**Trabajo de tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas**

**Director: Prof. Dr. Gerardo D. Fidelio**

**Córdoba, República Argentina, Mayo de 2014**

**COMISIÓN DE TESIS**

**Dr. José Luis Barra**

**Dr. Gustavo Rivas**

**Dr. José Luis Bocco**

**EVALUADORA EXTERNA**

**Dra. Laura C. Leiva**

*A Norma, Luis, Gabriel y Natalia*

## Tabla de Contenidos

|   |    |
|---|----|
| Agradecimientos.....  | 7  |
| Glosario de abreviaturas.....   | 9  |
| Resumen general.....  | 12 |
| Introducción.....   | 14 |
| 1. Origen de la pregunta del trabajo de tesis.....  | 14 |
| 2. Hipótesis de trabajo.....  | 15 |
| 3. Venenos y toxicología.....   | 16 |
| 4. Fosfolipasas.....  | 19 |
| 4.1. Generalidades y clasificación de las PLA <sub>2</sub> .....  | 20 |
| 4.2. Características estructurales y funcionales de las PLA <sub>2</sub> secretadas.....  | 23 |
| 4.3. La importancia del extremo N-terminal en sPLA <sub>2</sub> s.....  | 29 |
| 4.4. Modificaciones post-traduccionales de PLA <sub>2</sub> secretadas.....   | 30 |
| 4.5. Ensayos de actividad fosfolipasa.....  | 31 |
| 5. Monocapas moleculares de fosfolípidos y su aplicación al estudio de enzimas lipolíticas.....   | 34 |
| 5.1. Tensión superficial ( $\gamma$ ) y presión lateral ( $\Pi$ ).....  | 34 |
| 5.2. Medición de tensión superficial o presión lateral.....   | 35 |
| 5.3. Uso del barostato de superficie para construcción de perfil de actividad hidrolítica de monocapas.....   | 36 |
| 5.4. Perfiles de actividad y $\Pi$ óptima.....  | 38 |
| 5.5. Método isocórico o de área constante de monocapa lipídica.....   | 41 |
| 5.6 Otras medidas con sustrato en forma de monocapa.....  | 41 |
| 6. Consideraciones finales sobre lipólisis interfásial.....   | 42 |
| 7. Espectrometría de masas.....   | 43 |
| 8. Uso de difracción de rayos X a bajo ángulo (SAXS) para estudio estructural de membranas.....   | 47 |
| Parte 1. Enfoque recombinante. Clonado, expresión recombinante funcional y perfil hidrolítico de monocapas de DLPC de sPLA <sub>2</sub> de <i>Bothrops diporus</i> .....      | 50 |
| 1. Objetivo.....  | 50 |
| 2. Resumen.....   | 50 |
| 3. Estrategia de clonado de isoformas de sPLA <sub>2</sub> .....  | 50 |
| 3.1. PCR. Diseño de oligonucleótidos y amplificación.....   | 51 |
| 3.2. Secuencias de sPLA <sub>2</sub> y miotoxina obtenidas.....   | 53 |
| 4. Expresión heteróloga.....  | 56 |
| 4.1 Construcciones de ADN.....  | 56 |
| 4.2 Inducción de la expresión proteica.....   | 57 |
| 4.3 Renaturalización, corte con peptidasa y actividad.....  | 58 |
| 5. Confirmación de secuencia y extremo N-terminal por espectrometría de masas.....  | 60 |
| 6. Gel 2D de proteína recombinante <i>Bd</i> sPLA <sub>2</sub> -I.....  | 62 |
| 7. Perfiles de actividad de fosfolipasas en monocapas de DLPC.....  | 63 |
| 8. Discusión.....   | 64 |
| Parte 2. Análisis a partir de veneno. Secuencia de fosfolipasas de <i>Bothrops diporus</i> a nivel de proteína.....   | 69 |
| 1. Objetivo.....  | 69 |
| 2. Resumen.....   | 69 |
| 3. Exclusión molecular de componentes del veneno.....   | 70 |
| 4. Análisis de actividad por monocapas de todo el cromatograma.....   | 72 |
| 5. Aislamiento de isoformas “baja presión”.....   | 73 |
| 6. Aislamiento de isoformas “alta presión”.....   | 74 |
| 6.1 Perfil hidrolítico de una nueva PLA <sub>2</sub> en fracción de alta presión.....   | 75 |
| 7. Análisis de secuencia por espectrometría de masas.....   | 75 |
| 8. Nueva iso especie de alta presión.....   | 84 |
| 9. Discusión.....   | 88 |
| Parte 3. Estructura y energía de unión a membrana. Interacción teórica de sPLA <sub>2</sub> con membranas neutras y su relación con el óptimo de hidrólisis experimental..... | 90 |
| 1. Objetivo.....  | 90 |

|   |     |
|---|-----|
| 2. Resumen.....   | 90  |
| 3. Método y resultados.....   | 90  |
| 4. Discusión.....   | 94  |
| Parte 4. Efectos de sPLA <sub>2</sub> s sobre mielina.....  | 96  |
| 1. Objetivo.....  | 96  |
| 2. Resumen.....   | 96  |
| 3. Estudios estructurales del efecto de sPLA <sub>2</sub> sobre mielina.....  | 96  |
| 4. Hidrólisis de monocapas de mielina.....  | 100 |
| 5. Discusión.....   | 104 |
| Parte 5. Método isocórico. Medidas de actividad fosfolipasa a área constante de monocapa lipídica.....  | 106 |
| 1. Objetivo.....  | 106 |
| 2. Resumen.....   | 106 |
| 3. Fosfolipasa secretada de origen procarionota.....  | 106 |
| 4. Descripción del método de detección de $\Pi$ óptima de hidrólisis en forma isocórica.....  | 107 |
| 5. Discusión.....   | 109 |
| Conclusión.....   | 110 |
| Métodos.....  | 112 |
| Parte 1.....  | 112 |
| P1.1. Homogeneización de glándulas.....   | 112 |
| P1.2. Extracción ARN.....   | 112 |
| P1.3. Transcripción reversa.....  | 113 |
| P1.4. Diseño de oligonucleótidos iniciadores ( <i>primers</i> ).....  | 113 |
| P1.5. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....  | 114 |
| P1.6. Clonado y secuenciamiento.....  | 115 |
| P1.7. Minipreparaciones de ADN.....   | 116 |
| P1.8. Preparado de bacterias electrocompetentes y transformación.....   | 116 |
| P1.9. Construcción de plásmidos de expresión.....   | 116 |
| P1.10. Inducción de síntesis proteica en cultivos bacterianos.....  | 117 |
| P1.11. Solubilización, renaturalización y corte con peptidasa específica de ubiquitina.....   | 118 |
| P1.12. Análisis de geles de electroforesis en poliacrilamida - SDS-PAGE.....  | 119 |
| P1.13. Cromatografía de afinidad por níquel.....  | 119 |
| P1.14. Ensayos de actividad fosfolipasa.....  | 120 |
| Parte 2: Veneno y espectrometría de masas.....  | 121 |
| P2.1. Cromatografía de exclusión molecular.....   | 121 |
| P2.2. Cromatografía de intercambio aniónico.....  | 122 |
| P2.3. Desalado de muestras.....   | 122 |
| P2.4. Reducción, alquilación y tripsinización de muestras.....  | 122 |
| P2.5. Geles 2D y estimación punto isoelectrico.....   | 123 |
| P2.6. Tinción de geles.....   | 124 |
| P2.7. Protocolo de destinción de geles teñidos con Azul Brillante de Coomassie.....   | 125 |
| P2.8. Protocolo destinción de geles teñidos con plata.....  | 125 |
| P2.9. Paso alternativo, alquilación de muestras en gel.....   | 125 |
| P2.10. Digestión con tripsina de banda proteica en gel.....   | 125 |
| P2.11. Extracción de los péptidos tripticos.....  | 126 |
| P2.12. Modificación de péptidos para fragmentación químicamente asistida (CAF).....   | 126 |
| P2.13. Espectrometría de masas.....   | 127 |
| P2.14. Tratamiento de datos de espectrometría de masas.....   | 127 |
| P2.15. Búsqueda en bases de datos.....  | 127 |
| Parte 3: Estructura y energía de unión a membrana. Interacción teórica de sPLA <sub>2</sub> con membranas neutras y su relación con el óptimo de hidrólisis experimental..... | 128 |
| P3.1. Descripción somera del método computacional.....  | 128 |
| Parte 4: Efectos estructurales de sPLA <sub>2</sub> s sobre mielina.....  | 129 |
| Parte 4.1. Purificación de mielina y sus lípidos.....   | 129 |
| Parte 4.2. Medidas de dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS).....   | 129 |
| Parte 4.3. Medidas en monocapas de mielina.....   | 129 |
| Parte 4.4. Medidas liberación de ácidos grasos.....   | 130 |

## Tabla de Contenidos

|   |     |
|---|-----|
| Marcas y Proveedores.....                 | 132 |
| Reactivos y enzimas.....                  | 132 |
| Insumos y kits .....                      | 133 |
| Software .....                            | 134 |
| Equipos y columnas de cromatografía ..... | 134 |
| Servicios.....                            | 135 |
| Cepas de bacterias.....                   | 135 |
| Referencias bibliográficas .....          | 136 |
| Reconocimientos técnicos .....            | 143 |
| Financiamiento .....                      | 144 |

## Agradecimientos

Al Dr. Gerardo Fidelio por brindarme la oportunidad y el lugar para desarrollar el trabajo de tesis, por su confianza y apoyo, así como por la inusual cualidad de encontrar siempre lo positivo en las ideas y el trabajo, por el *ir para adelante*.

A los miembros de mi Comisión Evaluadora de Tesis, Dr. José Luis Barra, Dr. Gustavo Rivas y Dr. José Luis Bocco, por los valiosos comentarios y aportes realizados a lo largo de este trabajo. En particular al Dr. Barra por su ayuda en el inicio del trabajo experimental.

De igual modo a la Dra. Laura C. Leiva de la Universidad Nacional del Nordeste, por gentilmente aceptar la revisión de este trabajo de tesis como evaluadora externa del mismo.

A los Directivos y miembros del CIQUIBIC y Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNC, por haberme permitido desarrollar mi trabajo de Tesis en esta Institución, y por el apoyo brindado a lo largo de estos años. Al Dr. Gerardo Leynaud, del Centro de Zoología Aplicada, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, por siempre tener la puerta abierta y proveerme de los ejemplares de víboras para el trabajo, así como veneno.

A la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay, y sus integrantes, Rosario Durán, Madelón Portela, Analía Lima, Magdalena Gil y Carlos Batthyány por permitirme llevar a cabo tres pasantías en su unidad, y fundamentalmente por la excelente recepción y apoyo.

Al Estado Argentino en general por financiar instituciones como la Universidad Nacional y el CONICET. A este último por el apoyo financiero brindado a través de su programa de becas, y a la Facultad de Ciencias Químicas que fue sede de mi formación académica.

Me gustaría también agradecer a las personas con quienes compartí gran parte del tiempo de trabajo y distensión durante estos años de desarrollo de la tesis. Entre ellas están mis compañeros del primer año esenciales para adaptarme e insertarme en la nueva familia: A Inés Burgos, Mariana Paolorossi, Marcos Villarreal y Lucy Posada (Vilú). A Guillermo Montich y Rafael Oliveira, compañeros de épocas de almuerzos y viajes al Sincrotrón. A Belén Decca, siempre dispuesta a ayudar y resolver dudas, y también participe de charlas generales de la vida. A Elisa Mariani, co-partícipe de los trajines experimentales de la renaturalización proteica .

A Soledad Celej, un motor de impulso y organización para el laboratorio. A Ernesto Ambroggio, la última reincorporación al laboratorio, que con su inquietud permanente garantiza la evolución. A Benjamín Carusso, compañero de escritorio, cuya tranquilidad y trabajo son contagiosas. A José Ignacio Gallea, que aporta la inyección de alegría diaria, con su sociabilidad es

un RRPP innato, y siempre con excelente onda. No hay límites de idioma, de personalidad o cultura para que integre a la gente. A Georgina Herrera por su buena onda y amistad. A Agustín Mangiarotti y Milagro Mottola por su cordialidad y predisposición.

Y finalmente a mis amigos de tantas juntadas y salidas, como Vanessa Galassi, amiga de todo el Doctorado, compañera de charlas, momentos de inanición no prevista, largas jornadas experimentales y expediciones en carpa. Cecilia Gaggiotti, amiga desde la primera SAB en el 2008, con enorme calidez humana y simpatía, organizadora nata de actividades. A Fernando Dupuy, todo laboratorio quisiera tener alguien como él, por su concentración, trabajo continuo y disposición a colaborar en lo que sea. A Federico Issoglio, compañero de viajes, seminarios y congresos, y junto con María Elena Carrizo, por su ayuda con el AKTA. A Luisina De Tullio, ejemplo de eficiencia en el laboratorio, amiga y compañera, por su ayuda en los primeros pasos con el equipo de monocapas circular.

A Juan Roldán, Hernán Rojas y Mario Bibolini, compañeros de Olimpiadas de CONICET y reuniones extra Instituto.

A Ernesto Grasso y Julio Pusterla, compañeros de almuerzo de los dos últimos años, charlas y debates de mediodía.

A Eduardo Heilbron, cuya estadía le fue suficiente para integrarse al grupo, compartir juntadas y salidas.

A Gabriel Ferrero, compañero de piso del instituto, compañero de casa y amigo. Co anfitrión de las juntadas en Iponá.

A Ariel de la playa de estacionamiento, con su saludo y cordialidad diarios.

A Marta Hallak quien me orientó y ayudó en los contactos iniciales en el Departamento de Química Biológica. A María Julia Pons.

A Bruno Maggio y su grupo extendido, Laura Fanani, Graciela Borioli y Natalia Wilke, por discusiones y aportes en seminarios y festejos internos. A Carla Rosetti y Soledad Bazán, nuevas compañeras.

A Agustín Carbajal, Natalí Chanaday y Guillermo Zampar, compañeros de cursos, dictado de clases, preparado de trabajos prácticos y debates variados.

Y a mis amigos de la Facultad extra muros CIQUIBIC, como Leonardo Fruttero.

Finalmente, a mi familia cercana, mi papá, hermano, Natalia y Cristina que fueron las constantes en estos años.

## Glosario de abreviaturas

**6xH**, hexa-histidina. 6 histidinas en tándem que se usan como marca de afinidad por Ni<sup>2+</sup> para facilitar purificación de proteínas recombinantes.

**ACN**: acetonitrilo. Solvente orgánico usado en cromatografía de fase reversa.

**AMBIC**: Bicarbonato de amonio, sal utilizada como *buffer* para tratamiento de muestras a ser digeridas con tripsina (pH≈8.5).

**Bd sPLA<sub>2</sub>**, PLA<sub>2</sub> secretoria de *Bothrops diporus* clonada, la I posee serina en su N-terminal, mientras que la II posee asparagina.

**BL21(DE3)**: cepa *E. coli* utilizada para la expresión de proteínas codificadas en plásmidos que tienen el promotor del fago T7, tienen en su cromosoma la polimerasa de ARN de éste con porción de operón lac, lo que permite expresar esta polimerasa con galactosa o un análogo (IPTG). Son además, deficientes en algunas proteasas.

**BPB**: Bromuro de para-bromofenacilo, agente alquilante utilizado para anular la actividad catalítica de fosfolipasas con histidina catalítica, por modificación de ésta.

**BrEt**. Bromuro de etidio, molécula fluorescente utilizada para detectar por irradiación UV fragmentos de ADN o ARN en electroforesis en agarosa o poliacrilamida.

**β-ME**. β-mercaptoetanol, agente reductor utilizado en soluciones de proteína para formar tioles libres (cadena lateral de cisteína) a partir de disulfuros, o evitar la formación de éstos. Uso similar al DTT, menor costo y menor potencia reductora.

**CAF**: *chemically assisted fragmentation*, fragmentación asistida químicamente. Método de modificación de aminos libres, para obtener mejor fragmentación en espectrometría con ionización tipo MALDI.

**CHAPS**: 3-[(3-Colamidopropil)dimethylammonio]-1-propansulfonato (CAS 75621-03-3), detergente zwitteriónico utilizado para solubilizar proteínas.

**CHCA**. Ácido α-Cyano-4-hidroxicinámico, usado como matriz para ionización por láser (MALDI).

**DEPC**: Dieti-lpirocarbonato, se utiliza en soluciones acuosas frescas para inactivar posible contaminación de ARNasas de material a ser usado con ARN. Se inactiva por autoclavado al descomponerse en dióxido de carbono y etanol.

**DH5α**: cepa de *E. coli*. Posee mutaciones que optimizan la preparación de ADN plasmídico (por ejemplo carencia de endonucleasa EndA y enzima de restricción RecA). Se utiliza como cepa huésped en las transformaciones de reacciones de ligado entre un plásmido y otro fragmento de ADN, por ejemplo, proveniente de clonación.

**DLPC**, dilauoil fosfatidil colina (1,2, di-dodecanoil fosfatil colina), fosfolipido usado como sustrato en forma de monocapa en ensayos de actividad fosfolipasa debido a que sus productos de hidrólisis se desorben rápidamente de la interfase.

**dNTP:** Nucleótido desoxirribonucleótido tri-fosfato. Usualmente se refiere a los tri-fosfatos de desoxi-guanosina, desoxi-timidina, desoxi-citosina y desoxi-adenosina. Sustrato necesario para la polimerización del ADN (por ejemplo, por PCR), al proveer el monómero activado para la reacción de acople con la cadena creciente de ADN.

**D.O. :** Densidad óptica, absorción aparente, por lo general a 600 nm, dada por la dispersión de partículas en un medio. Se usa frecuentemente como medida de crecimiento de cultivos bacterianos. Esta absorción aparente por ser ocasionada por dispersión, es dependiente de la distancia de la cubeta al detector, por lo que no es independiente del equipo que se use.

**DTT:** Ditiotreitól. Agente reductor más potente que  $\beta$ ME, utilizado para formar tioles libres de cisternas en caso de soluciones de proteína, a partir de disulfuros, o evitar la formación de éstos. Modificación lábil a la reoxidación.

**E. coli:** *Escherichia coli*. Especie bacteriana de la cual se utilizan varias cepas mutadas con fines biotecnológicos como expresión de proteínas recombinantes y amplificación de plásmidos.

**EDTA:** Ácido etilen diamino tetra-acético. A pH mayor o igual a 8 se halla deprotonado y se utiliza como quelante de cationes divalentes como el  $\text{Ca}^{2+}$ .

**Gdn.HCl:** Hidrocloruro de guanidinio. Agente caotrópico desnaturalizante de proteínas, se utiliza, junto con agentes reductores, en la solubilización de cuerpos de inclusión con múltiples puentes disulfuro. Es más potente desnaturalizante que urea a concentraciones comparables y no tiene el riesgo de carbamilación que presenta ésta.

**IAA:** Iodoacetamida. Reactivo alquilante utilizado para modificar tioles libres en forma estable, por agregado al azufre de un grupo carbamidometil. Origina un cambio de masa de 57 Da.

**IMAC:** *Immobilized Metal Affinity Chromatography*, cromatografía de afinidad por ión metálico inmovilizado. Método para separar muestras proteicas que poseen una marca con afinidad por algún metal, usualmente, catión divalente. Por ejemplo, la unión de poli-histidina con el  $\text{Ni}^{2+}$  a pH neutro o básico.

**IPTG:** Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido. Molécula análoga a galactosa que no es hidrolizable, permitiendo la inducción constante del operón lac, y así la expresión proteica en cepas de bacteria DE3 con plásmidos con promotor del fago T7.

**MALDI:** *Matrix assisted laser desorption ionization*, método de ionización de muestras biológicas (macromoléculas) asistido por matriz (compuesto orgánico pequeño como ácido cinapínico) que permite una transferencia suave de la energía del laser evitando la ruptura de la macromolécula.

**MilliQ:** nombre comercial de sistema de agua ultra pura de Millipore.

**Origami (DE3):** Cepa *E. coli* que permite inducción proteica en plásmidos con promotor del fago T7, tiene la ARN polimerasa de éste codificada en su cromosoma así como la porción del operón Lac UV inducible por galactosa o un análogo (IPTG). Vendida por Novagen, actualmente (2014) reemplaza por Origami2, que posee mutaciones en genes de la reductasa de tiorredoxina y la reductasa de glutatión para facilitar formación de puentes disulfuro en el citoplasma bacteriano.

**p.b.** Pares de bases, medida mínima de un monómero de nucleótido en el caso de ADN doble cadena.

**PBS:** *Phosphate buffer saline, buffer* fosfato salino, pH=7.4 por lo general, isotónico con medio fisiológico usual.

**PC:** *phosphatidyl choline*, fosfatidilcolina o glicerofosfocolina, cabeza polar de fosfolípido cuya cabeza polar, unida al fosfato, es un grupo colina. Es eléctricamente neutro en pH fisiológico.

**PCR.** *Polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa, procedimiento de amplificación enzimática de ácidos nucleicos.

**PEG:** Polietilenglicol; utilizado como agente reductor de volumen disponible (*molecular crowding*)

**pHUE:** vector de expresión (plásmido) que consiste en el vector pET15b con una secuencia codificante para ubiquitina en marco para expresión.

**P.I:** Punto isoeléctrico, pH al cual una molécula es electroneutra. Es el principio de separación de la primera dimensión en geles 2D.

**PLA:** *Phospholipase*, fosfolipasa, enzima que hidroliza uno más tipos de enlaces, éster o fosfoéster, de fosfolípidos.

**PSA:** Persulfato de amonio, utilizado en la iniciación de la reacción radicalaria para polimerizar, la mezcla de acrilamida – bisacrilamida en geles de poliacrilamida.

**PSD:** *Post source decay*, fragmentación espontánea de iones moleculares excitados (por ej. péptidos catiónicos) vinculada a la ionización MALDI, muy útil en secuenciación de novo por MS/MS.

**SDS:** *Sodium dodecyl sulfate*, dodecil sulfato de sodio. Molécula anfipática utilizada como detergente iónico a pH neutros o básicos, para otorgar una densidad de carga homogénea a soluciones de proteínas, al desnaturalizarlas por unión no covalente a sus residuos, permitiendo una migración diferenciada por tamaño en electroforesis de geles de poliacrilamida (PAGE).

**sPLA<sub>2</sub>**, fosfolipasa A<sub>2</sub> secretada.

**TEMED:** Tetrametil-etilen-diamina, usado para catalizar la formación de radicales libres a partir de PSA, en la polimerización de acrilamida con bis acrilamida para lograr geles apropiados para la separación de macromoléculas por electroforesis. (PAGE).

**TFA:** *trifluoro acetic acid*, ácido trifluoroacético, utilizado en espectrometría tipo MALDI para otorgar carga positiva a través de un protón.

**Tm:** Temperatura de fusión (*melting*). En el contexto de oligonucleótidos de ADN es la temperatura a la cual ocurre un cambio de fase de dímero a monómero, y se define como la temperatura a la cual el 50% de los dímeros se han disociado.

**TOF:** *time of flight*, tiempo de vuelo. Método para calcular la relación carga/masa de un ión (fragmento de macromolécula, en esta tesis, péptidos o aminoácidos cargados usualmente con 1 protón extra) en espectrometría de masas.

**U, ubiquitina:** Motivo proteico usado como marca en el N-terminal, escindible específicamente por una proteasa específica cuyo corte resulta en un N-terminal sin aminoácidos extra en la proteína deseada (fosfolipasa).

## Resumen general

El marco general del trabajo presentado en esta tesis fue el estudio de propiedades proteicas claves en la interacción con interfases lipídicas. El objetivo particular fue aportar información sobre las causas de las diferencias de actividad lipolítica de isoformas de enzimas fosfolipasas  $A_2$  de veneno de Yará Chica o *Bothrops diporus*. Este trabajo continúa la línea investigativa desarrollada en la tesis del Dr. José Julián Daniele, también dirigida por el Dr. Gerardo Fidelio. En aquel trabajo se caracterizaron bioquímicamente tres isoformas de fosfolipasas  $A_2$  de *Bothrops diporus*, siendo notable la diferencia de hidrólisis de monocapas entre una de ellas (P3), respecto a las otras dos (P1 y P2). P3 presentaba una presión lateral óptima de hidrólisis de monocapas de dilauoil-fosfatidil-colina (DLPC) mucho mayor que P1 y P2.

En la **Parte 1** de esta tesis, se resumen los resultados concernientes al clonado, expresión y renaturalización de dos isoenzimas de *Bothrops diporus*. Como primer paso se obtuvo la secuencia completa de aminoácidos, deducida a partir del ADN codificante clonado para cada una de ellas. Estas presentan gran similitud entre sí, y se clasifican como de grupo II. Las dos primeras fueron expresadas heterológamente (*E. coli*) y renaturalizadas, determinándose su perfil de velocidad de hidrólisis de monocapas de DLPC respecto la presión lateral de esas monocapas. Para ambas isoformas recombinantes, dicho perfil fue coincidente con los obtenidos para las isoformas purificadas de veneno, cuya secuencia completa era desconocida en su momento. Además, se clonó el ADN codificante de una miotoxina con estructura similar a fosfolipasa.

A partir de veneno, se purificaron fosfolipasas, encontrándose las dos cuyas secuencias proteicas coinciden con las expresadas en *E. coli*. Una tercera fosfolipasa fue parcialmente secuenciada a nivel de proteína, siendo distinta de la reportada en el trabajo previo a este (P3), y también diferente en su N-terminal a las dos clonadas. Su perfil hidrolítico en monocapas también difiere aunque es similar al de P3, descrito en el trabajo fundador de esta línea. La información de secuencia de esta nueva isoespecie, parcial, se logró a través del uso de espectrometría de masas de péptidos post digestión triptica. La **Parte 2** de este trabajo resume los puntos principales de este enfoque.

Además, en la **Parte 3** se presenta un estudio que relaciona los óptimos experimentales de actividad hidrolítica de monocapas de sustrato (lípidos) para una dada fosfolipasa secretada con su energía libre de unión a membrana, siendo esta última obtenida a partir de simulación computacional. Se evidenció una relación directa entre el óptimo de presión lateral de hidrólisis de sustrato en monocapa con un mayor valor absoluto de energía de unión a membrana simulado. Por

modelado molecular se generaron las posibles estructuras para las enzimas de *Bothrops diporus* y se calculó su energía de unión a membrana simulada. Este valor fue coherente con la presión lateral óptima de hidrólisis predicha por la relación obtenida con estructuras y óptimos conocidos. Al modelar una enzima quimérica consistente en la secuencia de una de las recombinantes con porciones de sus secuencia reemplazada por los péptidos de la nueva fosfolipasa de alta presión, se obtuvo una energía que se relaciona con un mayor óptimo de hidrólisis. Esto sugiere que esas regiones modificadas *in silico* podrían ser claves para que una isoespecie se comporte como de “alta presión” lateral.

En la **Parte 4** se presenta un estudio sobre los cambios estructurales de una membrana natural, la mielina, luego de la acción de diversas fosfolipasas. La información estructural se obtuvo a través de la metodología de difracción de rayos X a bajo ángulo (SAXS). Pudo detectarse un cambio en la estructura de mielina al ser incubada con fosfolipasas, evidenciándose una fase más expandida en coexistencia con la fase regular de mielina a la temperatura medida. No se hallaron diferencias entre fosfolipasas de veneno de víbora y de pancreática porcina.

Finalmente, en la **Parte 5** se describe una modificación al método usual para medir óptimos de hidrólisis en monocapas. Esta permite mayor sencillez en la configuración experimental respecto del método de barostato. Consiste en hacer medidas de la caída de presión lateral de una monocapa de dilauril-fosfatidil colina y encontrar el punto de inflexión de la curva expresada como moléculas superficiales vs. tiempo. El tiempo al que se da este punto de inflexión permite obtener la presión lateral óptima, es decir, a la cual es máxima la velocidad de hidrólisis.

Durante el desarrollo de este trabajo de Tesis se publicaron los siguientes artículos:

**Cloning and functional expression of secreted phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops diporus* (Yarará Chica)**, Biochemical and Biophysical Research Communications, vol.: 427 (2012), pp. 321-325. P.J. Yunes Quartino, J. L. Barra y G. D. Fidelio.

**Thyroid hormones-membrane interaction: Reversible association of hormones with organized phospholipids with changes in fluidity and dipole potential**, Chemistry and Physics of Lipids, vol: 175-176C (2013), pp.131-137. B.A. Issé, P.J. Yunes Quartino, G.D. Fidelio y R.N. Farias.

El trabajo del método de área constante, el cálculo de energías de unión a membrana y los estudios sobre mielina están en fase de escritura de manuscrito.

## Introducción

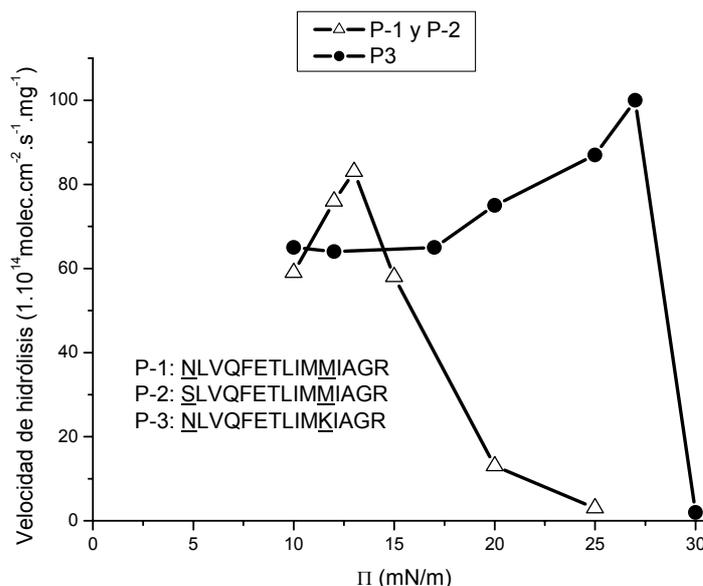
### 1. Origen de la pregunta del trabajo de tesis

El interés de nuestro laboratorio en el estudio de componentes de veneno de víbora se traduce en trabajo experimental desde inicios de los años 1990, cuando se comenzó a investigar las propiedades bioquímicas del veneno de Yarára chica. Esta víbora, cuyo nombre científico en esa época era *Bothrops neuwiedii diporus*, se denomina actualmente *Bothrops diporus* (Carrasco y col. 2012) o, en algunas referencias, *Bothropoides diporus* (Fenwick AM y col. 2009). Es una víbora predominante en el centro-norte de Argentina, con gran relevancia en casos de ofidismo (Bustillo y col. 2009), perteneciente al grupo de víboras de fosetas (sub-familia *Crotalinae*).

Los estudios bioquímicos del veneno de esta víbora se centraron en actividad de enzimas fosfolipasas A<sub>2</sub> secretadas (sPLA<sub>2</sub>). Así, mediante fraccionamiento cromatográfico se llegó a describir tres variantes de ese tipo de enzimas o **isoformas** (Daniele y col. 1997; Daniele y col. 1995).

En el área de **Biofísica** del Instituto (CIQUIBIC) donde se desarrolló este trabajo, existía experiencia en el estudio de los efectos de fosfolipasas (A<sub>2</sub> y C) de orígenes diversos sobre lípidos en sistemas modelos de membrana. En este sentido nuestro laboratorio ha puesto a punto el sistema de medición de actividad fosfolipasa sobre monocapas de fosfolípidos de cadena corta como el 1, 2 *sn*-dilauroil-fosfatidilcolina (DLPC). Con esta técnica se determinó la presión lateral ( $\Pi$ ) de estas monocapas a la cual la hidrólisis se lleva a cabo en forma óptima (mayor velocidad) para cada iso especie (Figura I.1).

De las tres isoformas previamente descritas, dos de ellas (P1 y P2) presentaban aproximadamente el mismo valor óptimo de  $\Pi$  (13 mN/m), mientras que una tercera (P3) tenía un óptimo notablemente más alto (27 mN/m, Figura I.1). Además, poseían otras características diferenciales, entre ellas la que permitió separarlas fácilmente por columna de exclusión molecular: P3 era menos retenida por la columna respecto a P1 y P2. También se secuenció el extremo amino terminal por degradación de Edman, observándose gran similitud (Figura I.1) entre las tres enzimas.



**Figura I.1. Perfil de velocidad vs.  $\Pi$ .** Adaptada de Daniele y col. 1997. El cambio de área de la monocapa (traducido a moléculas hidrolizadas por segundo y unidad de área por mg de enzima) a una presión lateral ( $\Pi$ ) dada. Se indican las secuencias de aminoácidos de P-1, P-2 y P-3 obtenidas por degradación de Edman. Los residuos subrayados indican la posición variable.

De estos datos preliminares surge la pregunta inicial de este trabajo de tesis:

**¿Cuál es el origen conformacional/estructural de la diferencia en comportamientos entre las diferentes isoformas de enzimas?**

## 2. Hipótesis de trabajo

Dado que las tres variantes de fosfolipasas purificadas de *B. diporus* (yarára chica) poseen secuencias muy similares en su extremo N-terminal, y suponiendo la misma escasa variabilidad en el resto de la secuencia, estas diferencias sutiles en secuencia primaria podrían traducirse en efectos notables en cuanto a la presión óptima de hidrólisis de DLPC en monocapas.

El primer paso fue ampliar el conocimiento de la secuencia primaria y al mismo tiempo introducir herramientas y técnicas de biología molecular en el laboratorio, con el objetivo final de producir en forma recombinante las enzimas a estudiar y aportar conocimiento básico sobre la relación entre estructura y función de estas proteínas.

### 3. Venenos y toxicología

“El célebre médico Mead, de Londres, vio con el microscopio el licor que arrojan las encías de las víboras irritadas, y sostiene que siempre lo encontró sembrado de láminas cortantes y puntiagudas, cuyo número infinito desgarran y rompe las membranas internas”. Voltaire (*Primera década*, lib. VIII, extraído de <http://www.e-torredebabel.com/Biblioteca/Voltaire/envenenamientos-Diccionario-Filosofico.htm>.)

La cita de Voltaire ilustra que la fenomenología de los efectos de estos venenos particulares (víboras) es conocida desde hace siglos. Las consecuencias dañinas e incluso fatales de los venenos son apreciadas desde los comienzos de la humanidad. Por ejemplo es conocido su uso como arma contra otras personas, aunque más frecuentemente como medio para cazar animales. Existen también usos directos sobre el ser humano con fines benéficos, como el veneno de abeja que se propone para el alivio de ciertas enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple (Mirshafiey 2007), o el *botox* (neurotoxina botulínica) de origen microbiano.

En el último siglo los venenos fueron objeto de estudios bioquímicos y biológicos intensos. Esta rama de las ciencias químicas-biológicas es conocida como **toxinología**. A partir de fuentes naturales surgieron preparaciones enriquecidas en un dado compuesto, y también se sintetizaron estas mismas moléculas u otras similares en forma *in vitro* o con organismos distintos de su fuente natural (**método heterólogo**).

En general, los venenos de reptiles son mezclas de proteínas y péptidos principalmente, que tienen una enorme diversidad de efectos biológicos, complejos y potentes, sobre las presas (Mackessy 2010). En particular, los venenos de crótalos (víboras de fosetas o *pit vipers*) que conforman la sub-familia *Crotalinae* a la cual pertenece *Bothrops diporus*, no presentan componentes pequeños no proteicos como el caso de nucleósidos libres, cuya presencia sí está establecida en otras serpientes (Aird 2005). Sin embargo, en crótalos se ha descrito la presencia de nucleasas (Dhananjaya y col. 2010) que liberarían endógenamente en la presa esos nucleósidos (notablemente, por sus efectos biológicos, la adenina). Se conoce que las purinas acentúan la hipotensión inducida por veneno y la parálisis, a través de receptores de purina (Aird 2002). Por otro lado, en el género *Bothrops* se han encontrado, incluyendo este trabajo de tesis, miotoxinas similares a sPLA<sub>2</sub>. Una miotoxina de *Bothrops asper*, constituye un ejemplo de un mecanismo que se acoplaría a la acción de nucleósidos purina, pues al dañar músculo provoca un influjo de ATP y potasio, lo que a su vez activa receptores purinérgicos con el resultado de una generalización del daño muscular (Cintra-Francischinelli y col. 2010). Así existe sinergia entre la miotoxina y

nucleasas. Esto es un ejemplo de la generalidad de la acción de un veneno, que puede resumirse como **la actividad del veneno total no es la suma de las actividades de los componentes individuales** (Larreche y col. 2008).

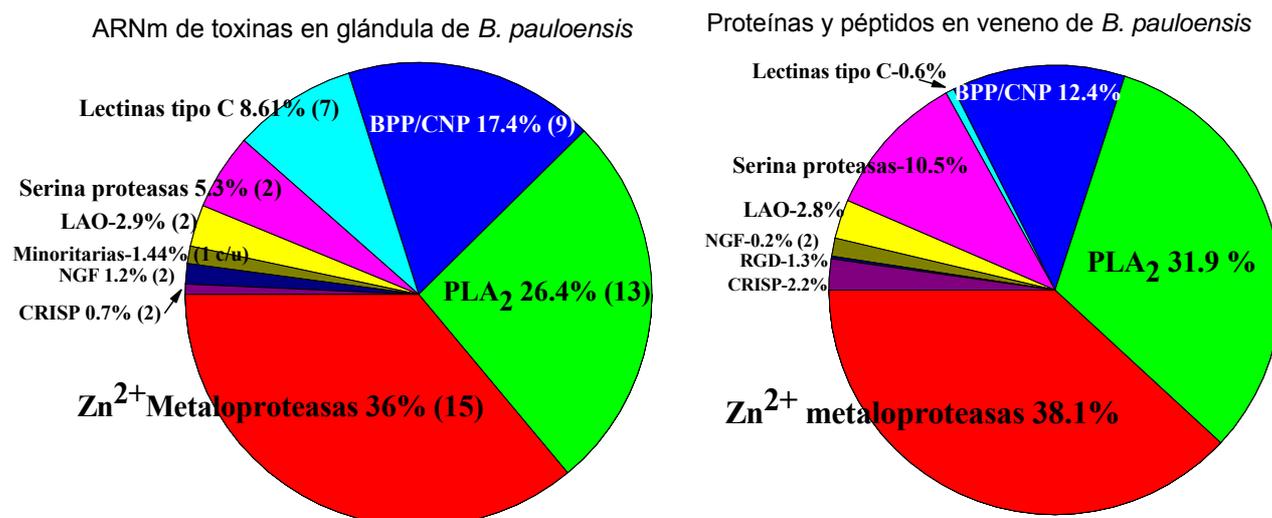
Los venenos de los crótalos pertenecientes al género *Bothrops*, como la yarará chica son en sí mismos un cóctel complejo de componentes. El envenenamiento humano debido a mordeduras de víboras de este género, se caracteriza por una rápida formación de edema con dolor, equimosis, hemorragia, inflamación, necrosis local de piel y músculo y una hemólisis sistémica, junto con perturbaciones en la coagulación y un *shock* hipotensivo (Rodrigues y col. 2012).

A partir de la investigación de los mecanismos de la hipotensión inducida por péptidos de veneno de *Bothrops jararaca*, surgió el Captopril, sustancia inhibidora de la peptidasa que convierte angiotensina I en angiotensina II. Este medicamento logra la disminución de la vasoconstricción lo que permite un control de la hipertensión. Este medicamento fue desarrollado por el argentino Dr. Miguel Ondetti y colaboradores basándose en estudios estructurales de péptidos inhibidores de aquella enzima presentes en el veneno de la mencionada víbora (Ondetti y col. 1971) y (Opie y col. 1995).

La crotoxina, presente en la cascabel austral (*Crotalus durissus terrificus*), fue fuente de estudios por sus posibles propiedades antitumorales. Se llegó a la fase 1 de prueba clínica en Argentina con pacientes con cáncer avanzado (Cura y col. 2002) obteniéndose una regresión en el tamaño de tumor aunque con presencia de neurotoxicidad.

En las últimas décadas, en particular gracias a los avances en técnicas que generan gran cantidad de datos, como lo son el secuenciamiento de ADN (genómica y transcriptómica) y técnicas de separación proteica acopladas a espectrómetros de masas de alto rendimiento (proteómica), se ha hecho un salto cuali y cuantitativo en la descripción de los venenos. La descripción de toxinas de diversas familias con actividades particulares es algo casi cotidiano. De esta investigación básica han surgido productos farmacéuticos aprobados para uso humano, además del uso de distintas de estas enzimas para analizar diversos procesos fisiológicos, como por ejemplo, aspectos de la hemostasia, apoptosis o neurotransmisión.

Existe variabilidad entre el transcriptoma y el proteoma, tanto a nivel de presencia o ausencia de ciertos componentes, como también de las cantidades relativas entre ellos. Especies que tienen transcriptomas similares pueden poseer proteomas muy disímiles, lo que evidencia que hay un control a nivel de traducción del ARNm que varía entre especies (Durban y col. ). Un ejemplo, para el caso de *Bothropoides pauloensis*, víbora brasileña, se resume en la Figura I.2. No existe gran diferencia entre proteoma y transcriptoma, con algunas excepciones (Rodrigues y col. 2012).



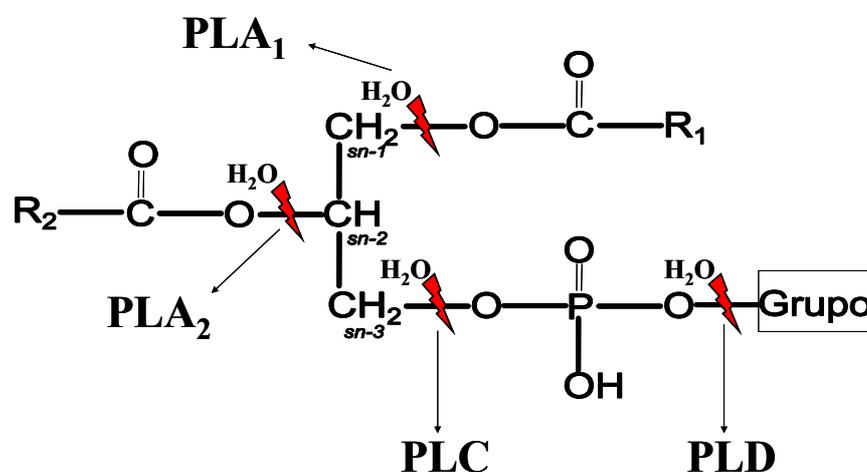
**Figura I.2.** Izquierda: Abundancia estimada de ARNm de toxinas identificables, a partir de glándula de veneno de *Bothropoides pauloensis*. PLA<sub>2</sub> incluye las fosfolipasas A<sub>2</sub> así como las miotoxinas homólogas K49 (hidrolíticamente inactivas). LAO: L-amino oxidasa. CRISP: proteínas secretorias ricas en cisteína. Minoritarias: ohanina, 5' nucleotidasa, BPP/NP: péptidos potenciadores de la bradiquinina y péptido natriurético tipo C, hialuronidasa y factor de crecimiento de endotelio vascular. NGF: factor de crecimiento nervioso. Derecha: Composición estimada en masa de proteína (absorbancia a 215 nm y densitometría de bandas proteicas SDS-PAGE, teñidas con Azul Brillante de Coomassie) obtenida con degradación de Edman y técnicas de espectrometría de masas a partir de veneno liofilizado de *Bothropoides pauloensis*

Se ha demostrado que ciertas toxinas, por ejemplo las PLA<sub>2</sub> de veneno de víbora, presentan una evolución acelerada en la porción codificante para la proteína madura cuando se compara con las porciones no traducidas e intrones del resto del gen (Nakashima y col. 1995). Esto se debería a la presión selectiva que ejerce el tipo de alimento que el animal tiene a su disposición. Esta hipótesis dietaria explicaría también la variación geográfica en la composición del veneno de una misma especie (Alape-Giron y col. 2008). Este último estudio indica que también existen variaciones ontogénicas (fase de desarrollo del animal) para algunos componentes.

La presencia de moléculas miotóxicas similares a PLA<sub>2</sub> en crócalos es otro ejemplo de la diversificación de estas moléculas por duplicación génica posiblemente. Estas conservan el patrón de cisteínas y el tamaño total de la molécula, pero tienen una sustitución clave del Asp49 (D49) por Lys49 (K49) lo que las hace hidrolíticamente inactivas (Lomonte y col. 2003). En este trabajo se clonó una de ellas.

#### 4. Fosfolipasas

Por definición, las fosfolipasas son **enzimas hidrolasas que catalizan la ruptura de enlaces ésteres o fosfoésteres de fosfolípidos**. Se denominan A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, C o D si el enlace hidrolizado es el *sn-1*, *sn-2*, *sn-3* o el enlace hacia el sustituyente del fosfato, respectivamente (Figura I.3). Se denominan fosfolipasas B a las que hidrolizan ambos ácidos grasos, es decir, las que presentan actividad A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>. Las fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) son en general estereo-específicas (carbono quiral del enlace *sn-2*), siendo un enantiómero (L) hidrolizable, y otro no (D). Los productos de esta hidrólisis son el ácido graso libre y el liso-fosfolípido. De acuerdo al sistema internacional de clasificación (EC), pertenecen a la categoría EC 3.1.1.4.



**Figura I.3. Hidrólisis de enlaces de un fosfolípido catalizada por fosfolipasas.** De acuerdo al enlace hidrolizado, se indica el tipo de fosfolipasa que cataliza esa reacción. El carbono 2 es quiral. En fuentes naturales el sustituyente R1 suele ser saturado y el R2 mono-insaturado. El Grupo unido al fosfato puede ser un protón (ácido fosfatídico), colina (lecitinas), glicerol, etanolamina, serina. Cuando una enzima posee actividades A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> se la denomina fosfolipasa B.

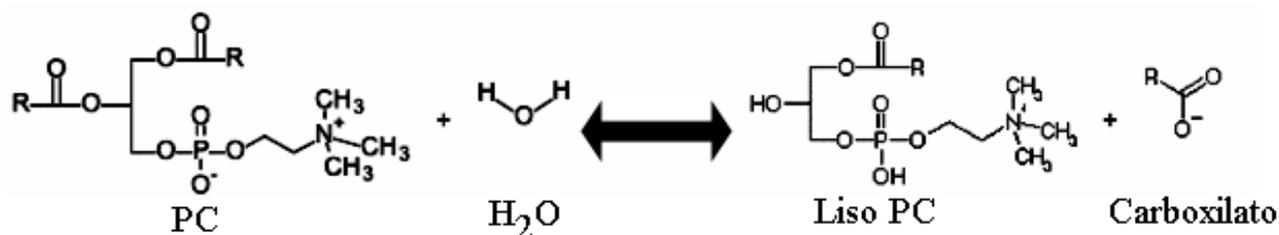
Además de hemorragia y perturbaciones en la hemostasia, el envenenamiento debido a víboras del género *Bothrops* se caracteriza por un daño local prominente del tejido debido a mionecrosis, edema e inflamación ampliamente correlacionados con moléculas de fosfolipasas secretadas o sPLA<sub>2</sub> (Rodríguez y col. 2012). La inhibición de la agregación plaquetaria inducida por ADP también se estudia para las nuevas sPLA<sub>2</sub> reportadas (García Denegri y col. 2010).

Varias sPLA<sub>2</sub> de venenos de víboras son neurotoxinas potentes que actúan bloqueando la transmisión neuromuscular a nivel presináptico. Algunas son monómeros (una sola cadena) y otras heterodímeros (dos cadenas diferentes), como la ya mencionada crotoxina. Ésta, posee una cadena de fosfolipasa activa básica (Cb) levemente tóxica en forma aislada, mientras que la otra cadena

(Ca), posiblemente una fosfolipasa procesada proteolíticamente, ácida y catalíticamente inactiva, no presenta actividad biológica (neurotoxicidad) en forma aislada. Sin embargo, cuando están unidas se exagera la acción farmacológica y por lo tanto letal de Cb al evitarse la adsorción inespecífica de la misma.

#### 4.1. Generalidades y clasificación de las PLA<sub>2</sub>

Una enorme familia de proteínas presenta actividad PLA<sub>2</sub>, y a medida que se fueron describiendo sus propiedades catalíticas y características estructurales se las fue clasificando en diversos grupos. Hace más de un siglo que se realizan experimentos con estas enzimas, siendo modelo de enzimología de lípidos, y paradigmas para el formalismo de catálisis interfasial.



**Figura I.4. Esquema de la reacción catalizada por una fosfolipasa A<sub>2</sub>.** Los reactivos son la fosfatidilcolina (R indica ácido graso) y el agua, siendo los productos el 1-acil 2-liso-glicero-fosfolipina y un ácido graso, usualmente como carboxilato (por el pH del medio en el que ocurre la reacción).

Los ácidos grasos producidos por la reacción de hidrólisis (Figura I.4), tales como el ácido oleico (18:1) o el araquidónico (20:4) son fuentes de reserva energética. Además, este último puede funcionar como un segundo mensajero intracelular en caso de ser producido por la PLA<sub>2</sub> citosólica, o bien como precursor de eicosanoides mediadores de inflamación, si es el producto extracelular de la reacción catalizada por fosfolipasa secretada, como la del líquido sinovial humano (Baynes y col. 2004). El otro producto de la acción de la PLA<sub>2</sub>, el liso-fosfolípido, es importante en señalización celular y remodelación o perturbaciones de membrana (Khan y col. 1995).

Una de las clasificaciones más difundidas y aceptadas en la literatura es la propuesta por Edward A. Dennis, y actualizada regularmente en diversas publicaciones. De acuerdo a las revisiones de los años 2000 y 2006 (Six y col. 2000), (Schaloske y col. 2006) hay 5 grandes subconjuntos de fosfolipasas, que están a su vez clasificadas en distintos grupos (indicados con números romanos) y subgrupos (letras). La asignación de una dada enzima a uno de estos subconjuntos o tipos está basada en el mecanismo catalítico y los aminoácidos claves que participan

en él, pudiendo ser díadas o tríadas de aminoácidos en el sitio activo (His/Asp, Ser/Asp o Ser/His/Asp). También se tienen en cuenta características funcionales (dependencia o no con  $\text{Ca}^{2+}$ ) y estructurales (tamaño, presencia de puentes disulfuro) para asignar un grupo a una nueva enzima.

Es requisito indispensable para asignar una  $\text{PLA}_2$  a un grupo, que la proteína tenga actividad  $\text{PLA}_2$  y su secuencia completa de aminoácidos sea conocida. De esta forma puede buscarse similitud con otras  $\text{PLA}_2$  secuenciadas, para clasificarla en el mismo grupo o generar uno nuevo, nombrándolo con números romanos (I, II...), como se hizo en este trabajo con las isoformas clonadas (ver Parte 1). Otro criterio propuesto por Dennis y col. para nombrar isoformas similares del mismo organismo, es añadir letras mayúsculas (A, B...) a continuación del número romano para distinguirlas. De existir proteínas alternativas por empalme diferencial de un mismo gen, se sugiere el uso de números arábigos (1,2...). Si bien la actividad principal de la enzima tiene que ser fosfolipasa  $A_2$  para clasificarse como tal, es usual encontrar proteínas que pertenezcan a esta superfamilia y presenten otras actividades de catálisis, como  $\text{PLA}_1$ , liso-fosfolipasa  $A_1$  o  $A_2$ , acil-transferasa, o trans-acilasa  $A_2$ , o di o triacilglicerol lipasa. Finalmente, es necesario remarcar que estas proteínas poseen actividades biológicas no hidrolíticas, como se discute en la próxima sección para el caso de las  $\text{PLA}_2$  secretadas.

Las fosfolipasas pueden ordenarse en los siguientes conjuntos:

\* **sPLA<sub>2</sub>**,  $\text{PLA}_2$  secretadas, pequeñas (12 a 18 kDa), usualmente producidas en gran cantidad por distintos órganos (páncreas y tejido sinovial de mamífero, glándulas de veneno de reptiles e insectos, etc.). Poseen una díada catalítica histidina / aspártico, y requerimiento excluyente por  $\text{Ca}^{2+}$ . Pertenecen a este tipo los grupos I, II, III, V, IX, X, XI, XII, XIII y XIV, junto con una de origen bacteriano. Las enzimas usadas en este trabajo son de este tipo.

\* **cPLA<sub>2</sub>**,  $\text{PLA}_2$  citosólicas, grandes (61 a 114 kDa) que utilizan una serina catalítica. Inicialmente fueron descritas en neutrófilos y plaquetas. La primera que se secuenció era una proteína de 85 kDa sin puentes disulfuro, no relacionada a las conocidas secretadas, clasificada como grupo IVA. Alguno de sus miembros no requieren calcio para la actividad catalítica pero sí para su traslocación hacia otro compartimento intracelular (ejemplo grupo IVA, posee díada Ser / Asp). La mayoría posee un dominio C2 (funcionalmente relacionado a direccionamiento de proteínas hacia membrana)

\* **iPLA<sub>2</sub>s**  $\text{PLA}_2$  independientes de  $\text{Ca}^{2+}$  con una serina catalítica, entre 85y 88 kDa. El grupo VIA (humano) es el primer ejemplo, posee múltiples variables de empalme alternativo de ARNm y 7 a 8 repeticiones de anquirina. También pueden incluirse los grupos IVB, VI, VII y VIII por su

independencia de calcio. Estos dos últimos caen dentro de otra clasificación, las **PAF-AH** (ver a continuación). Varios miembros poseen actividades lipasas y transacilasas.

\* **PAF-AH**, acetil-hidrolasas de factor activador de plaquetas (grupos VII y VIII). Tienen una tríada catalítica serina/histidina/aspártico. La del grupo VIIA es secretada, las demás no. La VIIA tiene además actividad di y triacilglicerol lipasa y también PLA<sub>1</sub>, pudiendo hidrolizar fosfolípidos oxidados de partículas de LDL (lipoproteínas de baja densidad). Por esto último también se la conoce como PLA<sub>2</sub> asociada a lipoproteína. Las VIIB y VIIC son intracelulares, así como las del grupo VIII. Estas últimas se hallaron expresadas sólo durante la embriogénesis del cerebro de mamíferos.

Puesto que no existe todavía gran cantidad de enzimas clonadas y estudiadas de los últimos tres tipos, las clasificaciones pueden solaparse en algunas características.

\* **PLA<sub>2</sub>s lisosomales**, grupo XV, tríada catalítica serina / histidina / aspártico, su pH óptimo es 4, y es independiente de Ca<sup>2+</sup>. Posee también actividades de O-acil-ceramida sintetasa y transacilasa.

En paralelo a la investigación de la relación de las fosfolipasas con diversos procesos fisiológicos normales y patológicos, se impulsó la búsqueda y diseño de drogas que inhibieran fosfolipasas específicas (Ali y col. 2013; Tawakol y col. 2014). Existen ensayos que permiten distinguir grupos de fosfolipasas basados en características distintivas de la enzima, como el requerimiento de Ca<sup>2+</sup> o la sensibilidad a ciertos inhibidores. Por ejemplo un enantiómero de bromoenol lactona, BEL, inhibe en forma irreversible a las enzimas del grupo VIA (Yang y col. 1999).

Se han encontrado aplicaciones industriales para las enzimas secretadas que incluyen el desgomado de mezclas alimenticias, producción de lisolecitinas para uso como emulsificantes (De Maria y col. 2007), y la producción de fosfolípidos con baja abundancia natural o enantio-seleccionados. Así pueden usarse en la producción de enantiómeros no hidrolizables, a partir de una mezcla racémica, por hidrólisis del enantiómero sustrato. Además, se ha probado que pueden funcionar como sintasas, cuando se incuba un ácido graso con liso-fosfolípido en una suspensión con baja cantidad de agua (Pernas y col. 1990). De esta manera se favorece la reacción inversa a la hidrólisis.

#### 4.2. Características estructurales y funcionales de las PLA<sub>2</sub> secretadas

Este trabajo de tesis doctoral se focalizó, por la pregunta que le dio origen, en enzimas PLA<sub>2</sub> secretadas o sPLA<sub>2</sub>. Estas fueron las primeras enzimas con actividad fosfolipasa conocidas hasta 1986 año en que se describió una citosólica. Las sPLA<sub>2</sub> se encontraron primero en venenos de serpientes y posteriormente en exudados pancreáticos de vaca y líquido sinovial humano (Six y Dennis 2000).

Además de su actividad hidrolítica, poseen otras actividades biológicas independientes de la hidrólisis de fosfolípidos, como por ejemplo mio y neuro-toxicidad (Rodrigues y col. 2004), anti-coagulación por unión al factor Xa, efectos similares a citoquinas mediante la unión a receptores celulares (Schaloske y Dennis 2006), formación de edema (Daniele y col. 1997; Daniele y col. 1995), etc.

Como ya se mencionó, las sPLA<sub>2</sub> son proteínas entre 13 y 16 kDa que utilizan una histidina catalítica, y como cofactor al Ca<sup>2+</sup>, por lo que su actividad se ve anulada o disminuida notablemente cuando éste se acompleja (con EDTA por ejemplo). En presencia de compuestos reductores como β mercapto-etanol (βME) o ditio-treitól (DTT) su actividad se ve afectada o simplemente anulada por disrupción de la estructura proteica (reducción de puentes disulfuro). Además, muestran gran resistencia a solventes orgánicos, condiciones ácidas y altas temperaturas (en presencia de Ca<sup>2+</sup> son aún más resistentes). Un procedimiento común para confirmar el mecanismo catalítico es la anulación de la actividad por alquilación de la histidina catalítica con bromuro de p-bromofenacilo (BPB).

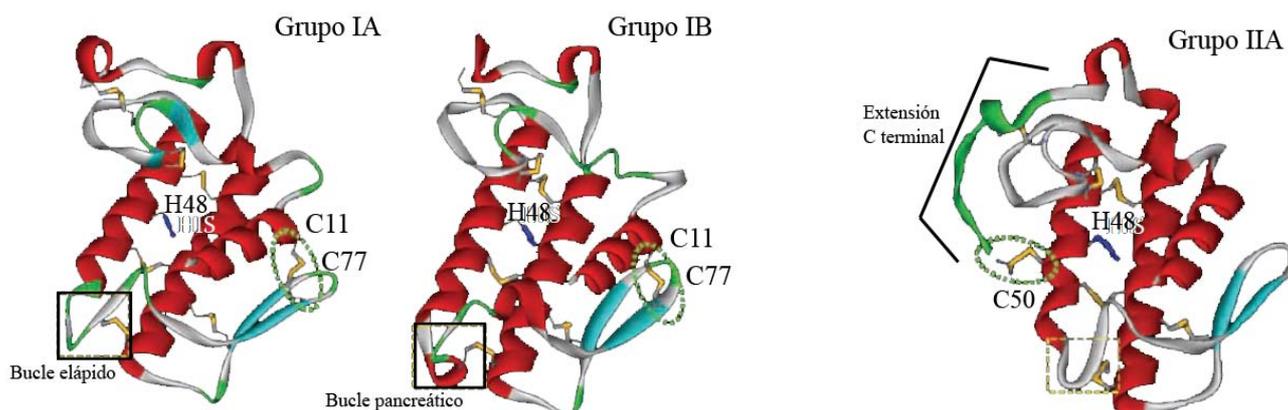
Sus sustratos naturales usualmente poseen un ácido graso insaturado de cadena larga en la posición *sn2* del fosfolípido. Éste al liberarse puede ser un segundo mensajero o también precursor de sustancias involucradas en inflamación, como es el caso del ácido araquidónico. Esto sin embargo no se traduce en una preferencia por el tipo de ácido graso a escindir. En cambio, la especificidad es notablemente variable respecto del tipo de cabeza polar del fosfolípido que le confiere carga negativa o neutra a la molécula, como glicerol o colina respectivamente (Burke y col. 2009).

De acuerdo a los criterios de clasificación de Dennis, como ya se mencionó, las PLA<sub>2</sub> secretadas pertenecen a alguno de los grupos I, II, III, V, IX, X, XI, XII, XIII y XIV. Las provenientes de vegetales y animales tienen entre 6 y 8 puentes disulfuro. Se han descrito también en virus (parvovirus, grupo referencia), hongos y bacterias. La primera sPLA<sub>2</sub> descrita en

bacterias, pertenece a *Streptomyces violaceoruber* (Sugiyama y col. 2002) y en este trabajo de tesis se estudió su comportamiento de hidrólisis en monocapas de DLPC (ver Parte 5).

Las enzimas de los grupos I, II, V y X son muy similares entre sí, lo que podría justificar un mismo grupo para todas, sin embargo se respeta la nomenclatura por tradición histórica. Además del tamaño (119 a 124 a.a. para la gran mayoría) y la conservación de la posición de 6 pares de cisteínas, tienen otros residuos conservados, como glicinas y tirosinas que participan en el sitio de unión a calcio y las redes de puentes de hidrógeno del sitio activo, junto con un segundo aspartato (D49) que activa y orienta a la histidina catalítica (H48, Figura I.5).

Estos grupos comparten características estructurales en el tipo de plegamiento, con tres hélices alfa y giros  $\beta$  (Matoba y col. 2002), un canal hidrofóbico por donde se desplazaría el sustrato cuya entrada es contigua a parte de la llamada superficie de reconocimiento interfásial (ver más adelante). De la misma forma, poseen requerimientos funcionales similares, como lo son la presencia  $\text{Ca}^{2+}$  y un pH entre 6 y 9.



**Figura I.5. Esquema estructural de esqueletos peptídicos de sPLA<sub>2</sub> de los grupos IA, IB y IIA**

Tomado y modificado de Mackesy 2010. Se observa en la enzima del grupo IA (de *Naja naja*), el bucle típico de las sPLA<sub>2</sub> de elápidos (serpientes de la familia *Elapidae*). A su derecha se observa una estructura de la enzima pancreática de mamífero del grupo IB, que presenta el bucle pancreático. Se indica el puente disulfuro típico de las enzimas del grupo I, entre cisteínas 11 y 77 (numeración pancreática). También se presenta una estructura de una sPLA<sub>2</sub> de víboras (serpientes de la familia *Viperidae*, como la yarará chica) donde se ve el puente disulfuro típico entre cisteína C50 y la C-terminal (122, o 134 según la numeración de alineado con la pancreática porcina). Se indica la presencia de la histidina catalítica en la posición 48 para los tres casos (H48) y las tres hélices alfa principales.

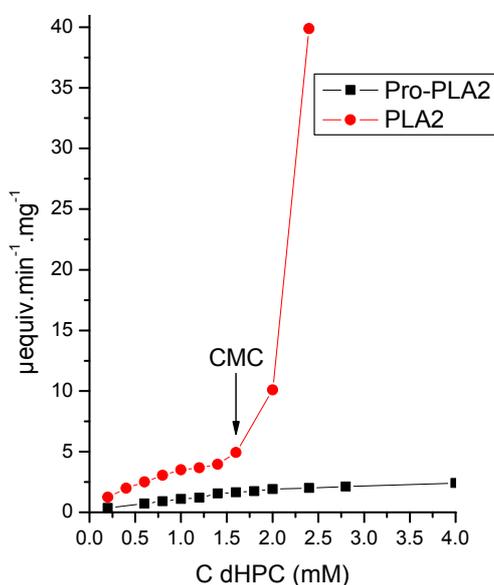
Entre las sutiles diferencias entre las enzimas secretadas de los grupos I y II, son de destacar la presencia o ausencia de un puente disulfuro dado característico de los miembros de un grupo, o en ocasiones, un bucle o *loop*. Por ejemplo, el **bucle pancreático** es una extensión de 5 a.a. que se halla en la sPLA<sub>2</sub> de páncreas de mamífero (grupo IB) mientras que el bucle eláptico se halla en la PLA<sub>2</sub> de cobra (grupo IA, (Six y Dennis 2000).

Si bien son muy similares estructuralmente, existen notables diferencias en comportamiento interfásial entre las enzimas de páncreas (porcino o bovino, por ejemplo), muy estudiadas por el grupo de **de Haas** y colaboradores, y las enzimas de veneno de víboras, como la de cobra (*Naja naja*), con gran aporte del grupo de Dennis. Estas últimas tienden a hidrolizar sustratos tanto en forma monomérica como en forma vesicular y micelar, y presentan óptimos de actividad sobre lípidos más empaquetados (medido por ensayos de monocapas lipídicas) que el caso de las pancreáticas. Tienen preferencia por lípidos zwitteriónicos como fosfatidilcolina (PC) respecto de los negativos. En cambio, las sPLA<sub>2</sub> pancreáticas presentan mucha mayor actividad contra lípidos aniónicos que zwitteriónicos. La sPLA<sub>2</sub> de cobra tiene un óptimo en monocapas de cadena corta de PC a 18 mN/m e hidroliza lípidos de la membrana de glóbulos rojos, mientras que el óptimo de la sPLA<sub>2</sub> de páncreas porcino está entre 8 y 9 mN/m y no produce dicha hidrólisis (Demel y col. 1975). Estas diferencias motivaron la expresión de una mutante de sPLA<sub>2</sub> pancreática con 5 aminoácidos removidos (el bucle pancreático), y sustitución de otros dos adyacentes a esta región de tal forma que la secuencia primaria sea muy similar a la de Cobra (Kuipers y col. 1989). Se observó que esta enzima mutante aumenta 16 veces su actividad frente a micelas zwitteriónicas y disminuye su actividad frente a lípidos aniónicos (posiblemente por remoción de una lisina), acercándose así al comportamiento de la de cobra. Cristalográficamente se observa que parte de este bucle está del mismo lado o cara que estudios químicos asignaron como la cara de contacto con la interfase lipídica (Kuipers y col. 1989). No se reportó en ese estudio la actividad de esa mutante sobre monocapas.

La región hipotética que interactuaría con la fase lipídica se denomina **sitio de reconocimiento interfásial** (Pieterse y col. 1974) o más recientemente **cara i o i face** (Jain y col. 2006). Utilizando mutantes (Liu y col. 1995; Noel y col. 1991), y modificaciones químicas (Dijkstra y col. 1984; Van der Wiele y col. 1988; van Scharrenburg y col. 1984) se ha mapeado la zona que correspondería a este sitio y relacionado estructuralmente (cristalografía y RMN). Con mutagénesis para incluir un solo triptofano en la secuencia, se logró hacer un mapa de desolvatación en la región de la *i face* para la enzima pancreática porcina, demostrándose que el ambiente del triptofano en las mutantes estudiadas está desolvatado cuando la enzima está unida a la interfase (Tsai y col. 2006).

Además se reportaron estudios de monocapas (Van der Wiele y col. 1988) y otros para enzimas pancreática y de veneno. Parte de los aminoácidos involucrados está presente en la hélice alfa N-terminal (ver próxima sección).

La actividad hidrolítica de estas enzimas es de 2 a 3 órdenes de magnitud mayor, (van den Berg y col. 1995) cuando el sustrato se encuentra agregado (micelas, vesículas, membranas o monocapas) que cuando está como monómero en solución acuosa. Este fenómeno se conoce como **activación interfásial**. La fosfolipasa pancreática cuando está en su forma inmadura de zimógeno no presenta este efecto y se comporta como una esterasa regular (curva hiperbólica al graficar velocidad vs. concentración de sustrato, Figura I.6) al no ser activada por la interfase agua / lípido (Verheij y col. 1981).

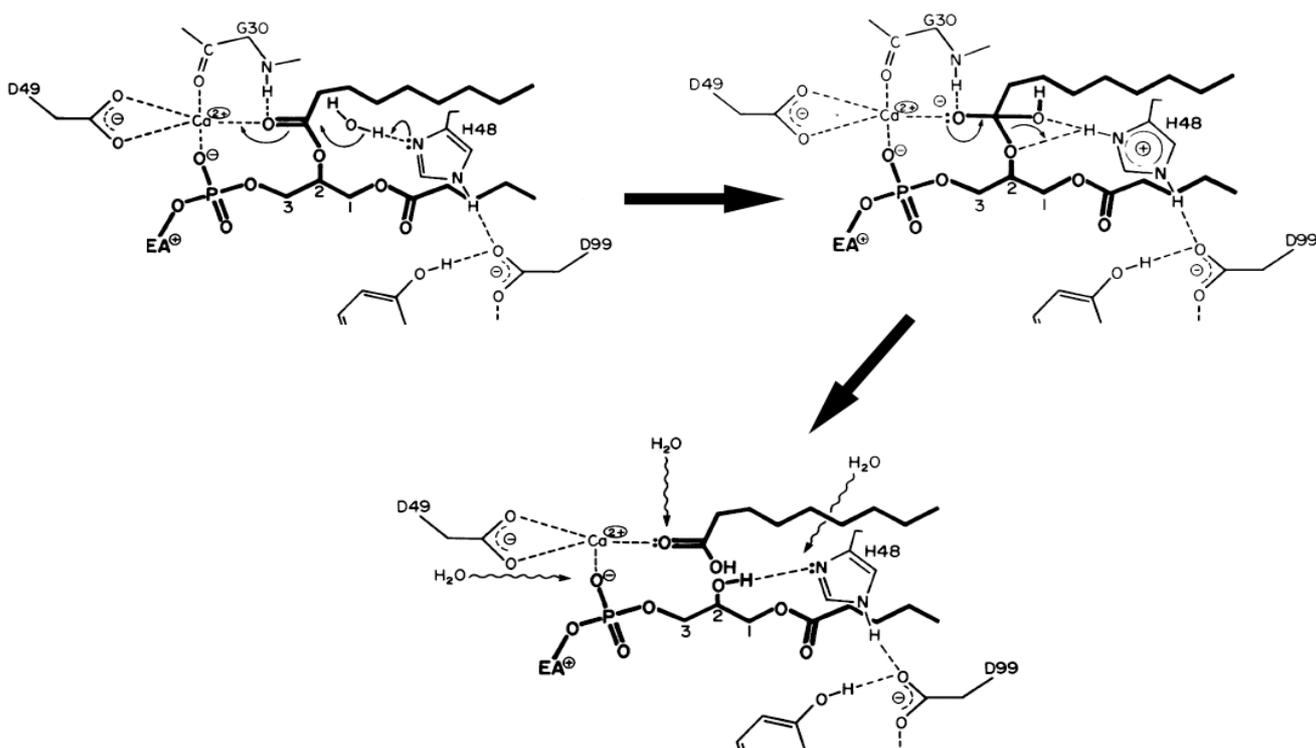


**Figura I.6. Ejemplo de activación interfásial.** Se indica con flecha la concentración micelar crítica para el sustrato dHPC (diheptanoil fosfatidil colina). En el caso de ser incubado con fosfolipasa pancreática madura (PLA<sub>2</sub>, círculos) se observa un aumento notable de velocidad hidrolítica a mayor cantidad agregada de sustrato. Ese aumento es casi nulo al agregar la misma cantidad de enzima en su forma inmadura o zimógeno (Pro-PLA<sub>2</sub>, cuadrados), que posee una extensión de 7 aminoácidos en su N-terminal. Tomado de Verheij y col. 1981.

El mecanismo propuesto para la hidrólisis del enlace éster consiste en una activación y orientación de una molécula de agua por puente hidrógeno con la His 48 del sitio activo, lo que explica la dependencia entre pH 6 y 9 para todas las PLA<sub>2</sub> que utilizan histidina. La unión del agua por puente de hidrógeno a la His 48, está estabilizada por la presencia adyacente de Asp 99. Esta molécula de agua es la responsable del ataque nucleofílico al carbonilo del enlace éster *sn*-2, siendo el Ca<sup>2+</sup> estabilizante de la carga del oxianión generado (intermediario tetraédrico, Figura I.5). En la

coordinación del  $\text{Ca}^{2+}$  participa el Asp 49 conservado en las sPLA<sub>2</sub> y ausente en las miotoxinas similares a éstas, inactivas catalíticamente, cuya posición 49 tiene una Lys. Además los mismos autores señalan la existencia de un sitio de  $\text{Ca}^{2+}$  secundario.

Las conclusiones anteriores se obtuvieron trabajando con estructuras cristalográficas de sPLA<sub>2</sub> de cobra china sin sustrato junto con otra unida a un inhibidor (fosfonato, no hidrolizable) considerado como un análogo de estado de transición. Además, se mostró que el esqueleto peptídico no presentaba cambios entre el estado unido y no unido, evidencia a favor que no existen cambios conformacionales drásticos en este tipo de enzimas que se den para hidrolizar el sustrato (Scott y col. 1990). Por esto se enfatiza que la activación interfásial se explica fundamentalmente por **accesibilidad al sustrato**, y el hecho de encontrarse éste ordenado en una interfase. Este tipo de enzimas no posee las características de sistemas alostéricos, son extracelulares y muy rígidas (muchos puentes disulfuro), lo que les da una gran robustez y estabilidad.



**Figura I.7. Mecanismo de hidrólisis.** Aminoácidos del sitio activo con una molécula de fosfolípido (líneas más oscuras). Molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  nucleofílica por abstracción del protón por parte de la H48 (izquierda) iniciando el ataque al carbonilo sn-2, seguido de la formación del intermediario tetraédrico (derecha) y ruptura final del enlace donde se indican dos moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  que tomarían el lugar de coordinación de  $\text{Ca}^{2+}$  que dejarían el fosfato y carbonilos salientes (abajo). Tomado y modificado de Scott y col. 1990.

Desde el punto de vista del efecto del sustrato sobre esta activación interfásial hay evidencias claras. Así, el incremento abrupto en la actividad que se da en presencia de vesículas o de micelas, (ver Figura I.6) de lípidos zwitteriónicos (neutros) puede ser reducido o eliminado al modificar las propiedades físicas del sustrato, por ejemplo, incrementando la carga aniónica superficial de las membranas (Tatulian 2001).

En contraposición a la postura que explica el fenómeno de activación interfásial por propiedades del sustrato y su presentación, existen estudios que apuntan a características propias de la enzima. Por ejemplo usando sPLA<sub>2</sub> de páncreas porcino y estudios estructurales de resonancia magnética nuclear, se observó que el extremo N-terminal es flexible y no posee estructura definida en solución, al contrario de lo evidenciado por cristalografía. Se hipotetizó que esta flexibilidad en solución estaría relacionada con la baja actividad contra sustrato monomérico (van den Berg y col. 1995).

Se ha descrito también regulación de la actividad, ya sea una activación o una depresión utilizando sustrato en forma de monocapa y aplicándole un potencial eléctrico en forma transversal (Thuren y col. 1987). Se observan cambios en la estructura del lípido pero también a menores voltajes se postula un cambio en la estructura proteica.

Surge así la visión sintética de las dos posturas extremas: la centrada en el papel del lípido y su presentación física y la centrada en los cambios estructurales de la enzima. Por ejemplo, utilizando la técnica de reflectancia total atenuada de infrarrojo (IR-ATR), se encontró una relación recíproca entre las propiedades superficiales de la membrana, la fuerza de la unión de la sPLA<sub>2</sub> a ésta, y los cambios estructurales inducidos por la membrana en la proteína (Tatulian 2001).

Además de las evidencias que apoyan el papel de la enzima o el sustrato ya mencionadas, existen consideraciones sobre la velocidad de desorción del producto de la interfase, y también el efecto de la concentración como responsables de la activación interfásial. Esta última hipótesis sugiere que en la interfase lípido : agua la enzima efectivamente está expuesta a una mayor concentración de sustrato estando prácticamente saturada (Kuby 1990). Una revisión sucinta sobre aspectos a tener en cuenta en el estudio de la activación interfásial es la de (Jain y Berg 2006).

### 4.3. La importancia del extremo N-terminal en sPLA<sub>2</sub>s

La región amino terminal o N-terminal tiene una hélice alfa que constituye una de las paredes del canal hidrofóbico por donde se postula la entrada del sustrato en el caso de las enzimas tipo I y II de veneno conocidas. Así, en el caso de la enzima pancreática, cuando el zimógeno se convierte en la forma activa se genera una hélice terminal cuya primera mitad estaría involucrada en la superficie de unión interfásial (Scott y col. 1990). Ésta se vería afectada por la extensión de 7 aminoácidos en el N-terminal en el zimógeno (pro-enzima) evitando la unión a la interfase agua lípido. Existen evidencias cristalográficas que el zimógeno presenta un N-terminal flexible, mientras que la proteína madura tiene un N-terminal más rígido (Kuipers y col. 1989).

El efecto sobre sPLA<sub>2</sub> pancreática de tan sólo un aminoácido extra puede ser crítico, si este es de naturaleza hidrofóbica por ejemplo (van Scharrenburg y col. 1984). Esto fue observado en los trabajos pioneros del grupo de **de Haas**, mostrándose que la extensión de un aminoácido (duplicación de la alanina terminal) causaba una gran disminución en la catálisis de la enzima hacia fosfatidilcolina (PC) de cadena corta presentada como micelas, y una menor actividad cuando el sustrato se encontraba organizado en monocapas (Slotboom y col. 1977). Además, en el caso de la enzima pancreática porcina, se requiere un extremo amino libre. Si se anula, por ejemplo, por transaminación, la interacción con interfases aniónicas se pierde (Dijkstra y col. 1984).

En trabajos con fosfolipasas de veneno del grupo II, al cual se asignaron las sPLA<sub>2</sub> con que se trabajó para esta tesis, también quedó en evidencia la importancia de un extremo N-terminal nativo. Por ejemplo, usando enzima modificada químicamente, y a su vez, estudiando un péptido con los 10 aminoácidos del N-terminal en forma aislada, los autores concluyeron que la región N-terminal cumple un rol mecanístico en la catálisis y es un componente superficialmente activo del sitio catalítico (Randolph y col. 1982) en la enzima de *Crotalus atrox*. También se comprobó este requerimiento estructural en sPLA<sub>2</sub>s de otras especies expresadas en bacteria, como las sPLA<sub>2</sub>s humanas. Se vio que al expresar en *E. coli* una fosfolipasa la metionina de inicio de traducción no era removida para la enzima que tenía una asparragina (Asn) en la posición 1 de la secuencia de la enzima. Esto es debido a que la aminopeptidasa terminal bacteriana no cataliza la remoción de la metionina inicial si es seguida por Asn. La actividad lipolítica de esta proteína era muy reducida respecto a la expresada con N-terminal nativo (Othman y col. 1996). En otro estudio, se observó en forma similar, que la proteína con metionina (Met) extra en su N-terminal presentaba el mismo óptimo de pH y preferencia por sustrato que la que tenía el extremo nativo (sin Met), pero con una drástica reducción en la actividad (Marki y col. 1993). La aminopeptidasa bacteriana remueve la

Met inicial eficientemente cuando el segundo aminoácido es pequeño y no cargado (ej. Ala, Gly, Ser), pero falla cuando es más voluminoso y cargado como Asn (Hirel y col. 1989). Debido a esto los autores del primer estudio mencionado (Othman y col. 1996) expresaron una mutante puntual, sustituyendo la Asn por Ala. Esta construcción permitió el procesado y la eliminación de la metionina inicial por parte de la bacteria, evitándose un paso posterior de remoción químico o enzimático.

Una observación similar fue hecha en mutantes de PLA<sub>2</sub> de cobra de Taiwán. La extensión de una Met en el N-terminal genera distorsiones estructurales, y se postula que afecta el sitio activo a través de una red de puentes de hidrógeno. Una metionina extra disminuye la actividad respecto de la que tiene extremo nativo (Chiou y col. 2008). Hay reportes de experimentos que apuntan a que la hélice N-terminal de las sPLA<sub>2</sub> de los grupos I y II actuaría como un dominio regulador que mediaría la activación interfásial (Qin y col. 2005).

Debido a estas consideraciones, para el diseño de la expresión heteróloga de las enzimas clonadas en nuestro trabajo, fue crucial tener en cuenta que la proteína a producirse debía tener su extremo N-terminal nativo, es decir, sin extensión de ningún aminoácido.

#### 4.4. Modificaciones post-traduccionales de PLA<sub>2</sub> secretadas

Las sPLA<sub>2</sub> presentan dos modificaciones ubicuas, la remoción del **péptido señal** que se describe a continuación, y la formación de **puentes disulfuro** entre cisteínas.

Entre las modificaciones presentes en todas las PLA<sub>2</sub> secretadas conocidas está el corte del péptido señal, entre 14 y 20 aminoácidos (a.a.) que convierte la enzima de pre-PLA<sub>2</sub> a PLA<sub>2</sub>, durante el proceso de secreción. En el caso de las pancreáticas la remoción del péptido señal (15 a.a.), conduce a una forma pro-PLA<sub>2</sub> (**zimógeno**) que no presenta activación interfásial. Cuando se remueve el pro-péptido (7 a.a.), la enzima muestra su actividad completa. Se ha descrito procesamiento proteolítico extra al mencionado en sPLA<sub>2</sub> de escorpión (Valdez-Cruz y col. 2004). La sub-unidad similar a fosfolipasa ácida de la crotoxina es también procesada proteolíticamente, lo que brinda mayor diversidad de isoformas de crotoxina al veneno (Faure y col. 1994).

Se han hecho modificaciones artificiales, como la trans-glutaminación enzimática intramolecular entre una glutamina terminal y una lisina que provoca la dimerización no covalente de la enzima aumentando 10 veces su actividad (Cordella-Miele y col. 1990). También se ha realizado acilación química de lisinas de ciertas posiciones de fosfolipasa pancreática porcina,

observando en un caso, un aumento considerable de la hidrólisis de glóbulos rojos y poder penetrante en monocapas (Van der Wiele y col. 1988).

Se reportó que la PLA<sub>2</sub> pancreática se dimeriza y auto acila al hidrolizar un sustrato sintético en Lys 56, ubicada en una zona que se postula estaría en contacto con la interfase lipídica durante la catálisis (Tomasselli y col. 1989). Esta acilación es concomitante con la dimerización y aumento de actividad contra el sustrato sintético (NOB, 4-nitro-4-octiloxi-benzoato) por lo que se hipotetizó como un paso catalítico. En un trabajo posterior se demostró usando la enzima bovina que la acilación en sí misma no es un requerimiento esencial, puesto que también se ve activación de catálisis cuando esa lisina es reemplazada por un grupo hidrofóbico o incluso negativo como el ácido glutámico (Noel y col. 1991). Se reforzó la idea que la cadena lateral del sitio 56 tanto en la sPLA<sub>2</sub> porcina como bovina es importante en la catálisis interfásial.

La glicosilación de fosfolipasas secretadas fue reportada para el grupo III de veneno de abeja (Lai y col. 2000) y escorpión (Valdez-Cruz y col. 2004). En 2009 se informó por primera vez la detección de dos fosfolipasas ácidas glicosiladas de veneno de víbora, que corresponderían al grupo IIA (mismo grupo que se asignó a las sPLA<sub>2</sub> descritas por nuestro grupo). El porcentaje de glicosilación por peso de proteína fue de 2.5 % para una iso especie y 0.5% para la otra (Zouari-Kessentini y col. 2009), de manera que las modificaciones post-traduccionales podrían tener influencia en la interacción con interfases aunque no hay estudios concluyentes al respecto.

#### 4.5. Ensayos de actividad fosfolipasa

Existen diversos métodos para cuantificar la actividad lipolítica de estas proteínas. Idealmente, podrían dividirse en dos grandes tipos, los directos e indirectos. Los primeros cuantificarían el producto formado (ácido graso o liso-fosfolípido) o reactivo consumido (fosfolípido) con la menor cantidad de suposiciones posibles. Los llamados indirectos serían aquellos que miden un efecto relacionado a la desaparición de sustrato o aparición de producto y requerirían una calibración previa con un método directo.

Por su utilidad histórica, y bajo costo, debe mencionarse el método del **pHstat**. Éste consiste en medir la cantidad de base utilizada para mantener el pH constante mientras ocurre la reacción de hidrólisis (producción de ácido graso). Es indirecto pues mide los protones liberados al producirse la ionización del ácido graso liberado tras la hidrólisis del fosfolípido. Para garantizar esta deprotonación y por lo tanto la sensibilidad del método, el pH de la solución de reacción debe ser

mayor al pKa del ácido que se libera. Por ejemplo, el ácido palmítico liberado de la hidrólisis de dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC), tiene un pKa  $\approx$ 4.8. Se debe evitar también la utilización de soluciones con capacidad *buffer* y disminuir al máximo la exposición a agentes acidificantes, como lo es el dióxido de carbono del aire. El **método acidimétrico** mide en forma continua el cambio de pH, lo que genera una desventaja pues al cambiar el pH del medio, cambia la sensibilidad (Reynolds y col. 1991).

A continuación se exponen los ensayos que se usaron en este trabajo de tesis. Para lograr reproducibilidad en medios heterogéneos (sustrato en forma de agregados), se deben controlar en forma estricta la presencia de impurezas, la temperatura y la forma de preparación (por ejemplo, tiempo de sonicación si es que se hiciera), de lo contrario puede notarse grandes cambios en la velocidad de la reacción entre repeticiones de ensayos. La pureza del lípido es crucial, por ejemplo la presencia de ácido graso en el ensayo de monocapas genera un corrimiento hacia mayores  $\Pi$  en el óptimo de hidrólisis (confirmado con observación propia).

**Método de hemólisis indirecta yema de huevo / sangre:** consiste en incubar la solución problema con un sustrato de yema de huevo y glóbulos rojos en una suspensión de agar al 1%. De haber hidrólisis, se liberan ácidos grasos y lisofosfolípidos. Estos últimos, por su acción detergente, alteran la integridad de la membrana eritrocitaria y conducen a una hemólisis evidenciada por un halo descolorido. Existe una relación aproximadamente lineal entre el diámetro del halo formado y el logaritmo de la concentración de enzima. Es muy barato, robusto y sencillo para detectar actividad enzimática en varias muestras al mismo tiempo, por lo que es ideal para un análisis inicial y general (*screening*), como análisis de condiciones de renaturalización (en nuestro caso) o de fracciones cromatográficas. Debe incubarse a 37 °C por varias horas para ver el resultado (Habermann y col. 1972), (Gutierrez y col. 1988).

**Método cuantificación ácidos grasos libres con reacciones enzimáticas acopladas.** Es un método indirecto y discontinuo desarrollado por la empresa Wako Pure Chemicals, Ltd. (Japón). Consiste en cuantificar los ácidos grasos liberados a través de su unión a coenzima A (CoA), reacción catalizada por la acilCoA sintetasa. Este producto, el acil-Coenzima A (RCOCoA) se oxida 2,3-trans-enoilCoA liberando peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por medio de la acilCoA oxidasa. En un segundo paso este peróxido participa en el acople oxidativo de 4-aminoantipirina con 3-metil N-etil N'-( $\beta$ -hidroxietil) dando un cromóforo violeta (pico de absorción a 550 nm). Este último paso es catalizado por peroxidasa (Reynolds y col. 1991). El método fue adaptado y probado

con diferentes fosfolipasas dependientes de calcio (Kasurinen y col. 1987). En nuestro medio resulta caro comparado con otros métodos, pero esto es más que compensado por su flexibilidad y la casi nula preparación previa para la titulación de ácido graso. El sustrato usado como estándar para realizar la curva de trabajo es provisto por el mismo producto comercial (ácido oleico), de tal forma de determinar la concentración de ácidos grasos. Es discontinuo, lo que permite mayor flexibilidad en las condiciones de reacción respecto a pHstat (se puede usar *buffer*) y puede adaptarse para utilizar volúmenes muy pequeños (tanto como sea posible para la mezcla de reacción y el manejo volumétrico y medición de absorbancia). Es sencillo y colorimétrico, requiriendo sólo un espectrofotómetro para medir absorbancia a 550 nm. Puesto que son reacciones enzimáticas se debe prestar atención a sus inhibidores. Por ejemplo, la azida sódica (conservante usado en la suspensión de yema de huevo del método anterior) inactiva la peroxidasa (Ortiz de Montellano y col. 1988).

**Método de monocapas lipídicas.** Consiste en medir la tensión superficial de una monocapa de lípidos sustrato y seguir su hidrólisis a través de cambios en la diferencia de potencial eléctrico entre el aire y la fase acuosa (Colacicco y col. 1966), en tensión superficial o presión lateral (Lagocki y col. 1970), o bien, en caso de usarse un equipo que permita la técnica de barostato de superficie (ver pág. 36) el descenso de área de la monocapa a  $\Pi$  constante (Dervichian 1971). Es sumamente sensible, se utiliza muy poco sustrato (10 a 100 nmoles, según el área de la cuba) y enzima (0.02 a 0.5 nmoles, según el volumen del compartimento de reacción). Permite además, controlar la densidad superficial del lípido y registrar diversos parámetros como la diferencia de potencial eléctrico o radioactividad. Las desventajas incluyen un mayor requerimiento de tiempo que un ensayo fotométrico y también la gran dificultad de hacer estudios en paralelo. A su vez, el método del barostato requiere equipo especial, comercialmente costoso. Este método brinda la posibilidad de estudiar la presión lateral óptima de hidrólisis de un dado sustrato por cierta enzima, y así construir el perfil de velocidad vs.  $\Pi$ . Los sustratos se limitan a aquellos que formen monocapas insolubles en tiempos razonables (más de 1 o 2 horas sin cambio notable en  $\Pi$  deseada en interfases libres de enzima). Esto excluye ácidos grasos de cadena corta (en caso de fosfatidilcolina, sus ácidos grasos deben ser de 8 o más átomos de carbono). En la Figura I.9 se esquematiza una cuba de orden cero y otros detalles del montado para este método.

## 5. Monocapas moleculares de fosfolípidos y su aplicación al estudio de enzimas lipolíticas

El punto de partida de esta tesis fue la observación de diferente comportamiento entre isoformas de sPLA<sub>2</sub> para la hidrólisis de sustrato en forma de monocapas o películas mono-moleculares. Con el objeto de introducir el método por el cual se obtienen las presiones laterales óptimas en monocapas de lípido se resumen los aspectos esenciales a continuación.

### 5.1. Tensión superficial ( $\gamma$ ) y presión lateral ( $\Pi$ )

La tensión superficial  $\gamma$  (gama) de una interfase se define como la cantidad de trabajo necesario  $w$  (energía libre de Gibbs para el caso que sea trabajo reversible) para modificar su área, ya sea expandiendo o comprimiendo su superficie. Por definición es  $\gamma \equiv dw/dA = dF/dl$ , donde  $F$  es la fuerza aplicada y  $l$  el perímetro del área. El agua es uno de los líquidos con mayor tensión superficial ( $\gamma \approx 72$  mN/m a 25 °C), lo que indica importantes fuerzas cohesivas intermoleculares. Cuando un compuesto debilita estas, se requiere menos energía para modificar la superficie del líquido. Este tipo de compuestos activos superficialmente son conocidos como **surfactantes** por su contracción en inglés de *surface active reagents*. Químicamente son anfífilos o moléculas anfipáticas, por tener una porción hidrofílica (cabeza grupo polar en el caso de lípidos) y otra hidrofóbica (cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos de lípidos por ejemplo).

Las películas insolubles de un anfífilo sobre la superficie de un líquido se denominan **películas mono-moleculares** o **monocapas de Langmuir**, y fueron las utilizadas en este trabajo, formadas por deposición o sembrado del lípido sobre la superficie acuosa. Para ser consideradas insolubles deben permanecer en la interfase por largo tiempo (al menos para permitir un ciclo de compresión en el que se vea una disminución de tensión superficial o aumento de presión lateral).

**El empaquetamiento molecular, o densidad superficial de moléculas**, es la cantidad de moléculas que ocupa una determinada área superficial. El parámetro recíproco es el **área molecular media** de una molécula. La dependencia de  $\gamma$  con el área molecular de un surfactante es característica de ese compuesto, y por supuesto, de las demás variables termodinámicas, de acuerdo a la ecuación de adsorción de Gibbs  $d\gamma = - \sum (n_i/A) \cdot \mu_i + (n_j/A) \cdot \mu_j$  donde  $\mu$  es el potencial químico de un dado componente,  $A$  es el área de la superficie, y  $n$  es la cantidad de moles de un componente en particular.

**Definición de presión lateral de superficie:  $\Pi = \gamma_0 - \gamma$**

donde  $\gamma_0$  es la tensión de la interfase del agua o buffer limpios antes de agregar el anfifilo, y  $\gamma$  luego de agregar una determinada cantidad de surfactante.

## 5.2. Medición de tensión superficial o presión lateral

El **método de placa Wilhelmy** consiste en registrar el peso resultante de poner una placa rugosa (papel, platino, etc.) en contacto con la subfase limpia. A medida que disminuye la tensión superficial (aumento de  $\Pi$ ) por adición de un anfifilo, en nuestro caso el lípido sustrato DLPC, el peso que registra la balanza disminuye pues hay menos tracción de la superficie del agua, manteniéndose constante el empuje si el nivel de agua no varía considerablemente.

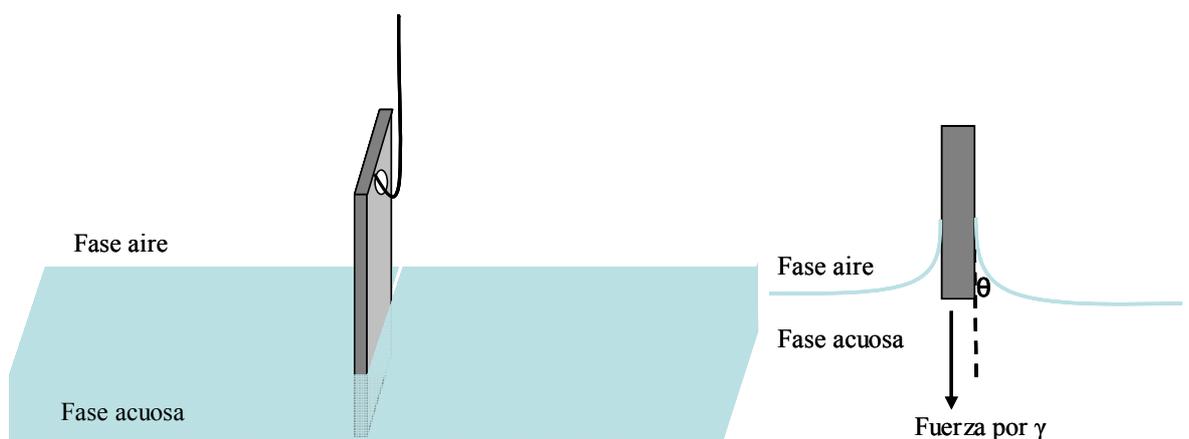
**F = Peso placa + Fuerza por tensión superficial - Empuje**

La fuerza debida a la tensión superficial depende del ángulo de contacto de la subfase con la placa y el perímetro total de la placa. Usualmente se utilizan placas rectangulares finas, por lo que el perímetro que es 2 veces el ancho + 2 veces el grosor de la placa puede aproximarse a que sea dos veces el ancho de la placa.

**Fuerza por tensión superficial =  $\gamma \cdot (\text{Perímetro}) \cdot (\cos\theta)$**

Cuando se hace la medición se tara la balanza con la medida de subfase sin anfifilo, de tal manera que el resultado obtenido es la diferencia de fuerzas inicial menos final

**$\Pi = -\Delta\gamma = -[\Delta F / 2(\text{ancho} + \text{grosor})] = -\Delta F / 2 \text{ ancho}$** , si ancho  $\gg$  grosor



**Figura I.8. Esquema de placa de Wilhelmy.** Placa en contacto con la fase acuosa, conectada por alambre fino a la balanza (no mostrada). El ángulo que se busca minimizar es  $\theta$ . Se indica la dirección de la fuerza a causa de la acción de la tensión superficial ( $\lambda$ ). No se indican las direcciones de la fuerza de empuje ni el peso.

Al usar el método de la placa de Wilhelmy, es crítico que se consiga un mojado completo de ésta de tal forma de que el ángulo de contacto sea siempre cercano a cero, pues en general no se controla. Para esto se usan placas rugosas.

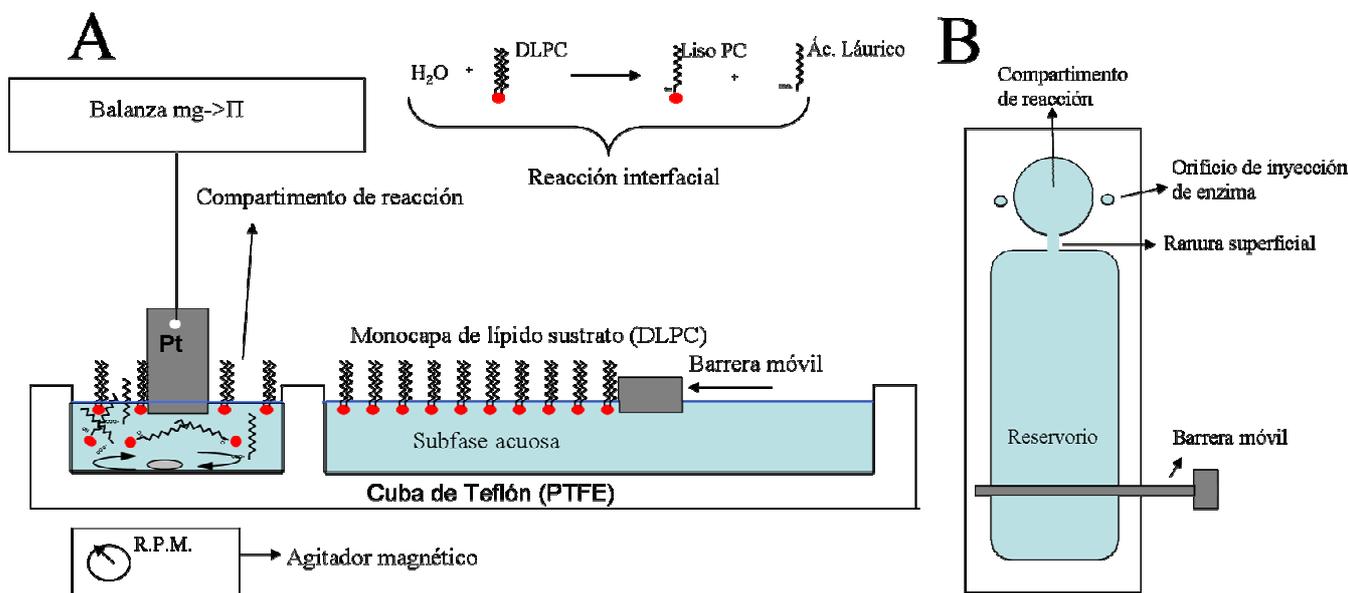
### 5.3. Uso del barostato de superficie para construcción de perfil de actividad hidrolítica de monocapas

Una ventaja importante del método de monocapas es la posibilidad de medir en forma continua la densidad superficial de moléculas (el empaquetamiento lateral) sin requerimiento de otro compuesto no sustrato que actúe como diluyente y homogeneizador de estructura (como es el caso del triton en los estudios sobre micelas mixtas). Además, permite mantener constante esa densidad superficial de moléculas por compresión en caso que los productos de la reacción sean solubles. Esto constituye el método de **barostato** de superficie (Dervichian 1971).

La pregunta del presente trabajo de tesis se originó en la observación que diferentes isoformas de veneno de *Bothrops diporus* presentaban óptimos de presión lateral para la hidrólisis de monocapas de DLPC que diferían para una isoespecie en particular (P-3, Figura I.1, pág.15). El método se basa en la medición de la presión lateral  $\Pi$  en forma continua a la vez que se compensa comprimiendo o expandiendo el área de la superficie para mantener  $\Pi$  constante (Dervichian 1971). Esta compresión o expansión de la superficie se logra mediante una barrera móvil (Figura I.9), usualmente controlada en forma automática. Al emplear fosfolípidos de cadena corta cuyos productos de hidrólisis (ácido graso y liso-fosfolípido para el caso de PLA<sub>2</sub>) son solubles en agua y con desorción rápida, si no se modifica su área superficial (**experimento isocórico**), la  $\Pi$  cae en forma continua a medida que avanza la reacción. En cambio, cuando el experimento se hace en modo barostato, ocurre un descenso de área a medida que disminuye la cantidad de sustrato en la superficie por hidrólisis y desorción de productos, al tiempo que se mantiene constante la  $\Pi$  por compresión. Es esta compresión lo que se cuantifica como cambio de área y se relaciona directamente con la cantidad de enzima inyectada en la subfase.

Es usual en esta metodología trabajar con agitación continua de la subfase en el compartimento de reacción, al menos durante los primeros minutos, pues se traduce en una mayor velocidad de descenso de área que si no se agitara. Esto se explica por la facilitación de la desorción de la interfase hacia el seno de la subfase de los productos de reacción, y un equilibrio más rápido entre enzima superficial y enzima en la subfase (Zografi y col. 1971). Con PLA<sub>2</sub> es usual encontrar

cinéticas donde el logaritmo del área disponible decrece linealmente con el transcurso del tiempo de reacción ( $\log A/A_{\text{tot}} = -k.t$ ) al usar un compartimento y manteniendo la  $\Pi$  constante (Zografi y col. 1971).



**Figura I.9. Arreglo experimental como cuba de orden cero usado en esta tesis.** Esquema de los componentes principales. **A.** Vista lateral de los dos compartimentos (el de reacción donde se inyecta la enzima, a la izquierda, y el mayor que actúa como reservorio de sustrato, a la derecha), la barrera móvil que permite la compresión, la placa de Wilhelmy para medición de la presión lateral, y la barra magnética para agitación continua en el compartimento de reacción (izquierdo). En la parte superior se esquematiza la reacción catalizada por la enzima. Los productos, el liso-fosfolípido y el ácido graso se desorben de la interfase para el caso de DLPC. Además, para medir la diferencia de potencial eléctrico  $\Delta V$  perpendicular a la interfase puede agregarse un electrodo ionizante o de plato vibrante sobre la subfase acuosa, en el aire, junto con uno de referencia inmerso en subfase del reservorio (conectado con puente salino al compartimento de reacción). **B.** Vista superior de la cuba y la disposición de los orificios de inyección de la enzima, el canal superficial que conecta los dos compartimentos y la posición de la barrera.

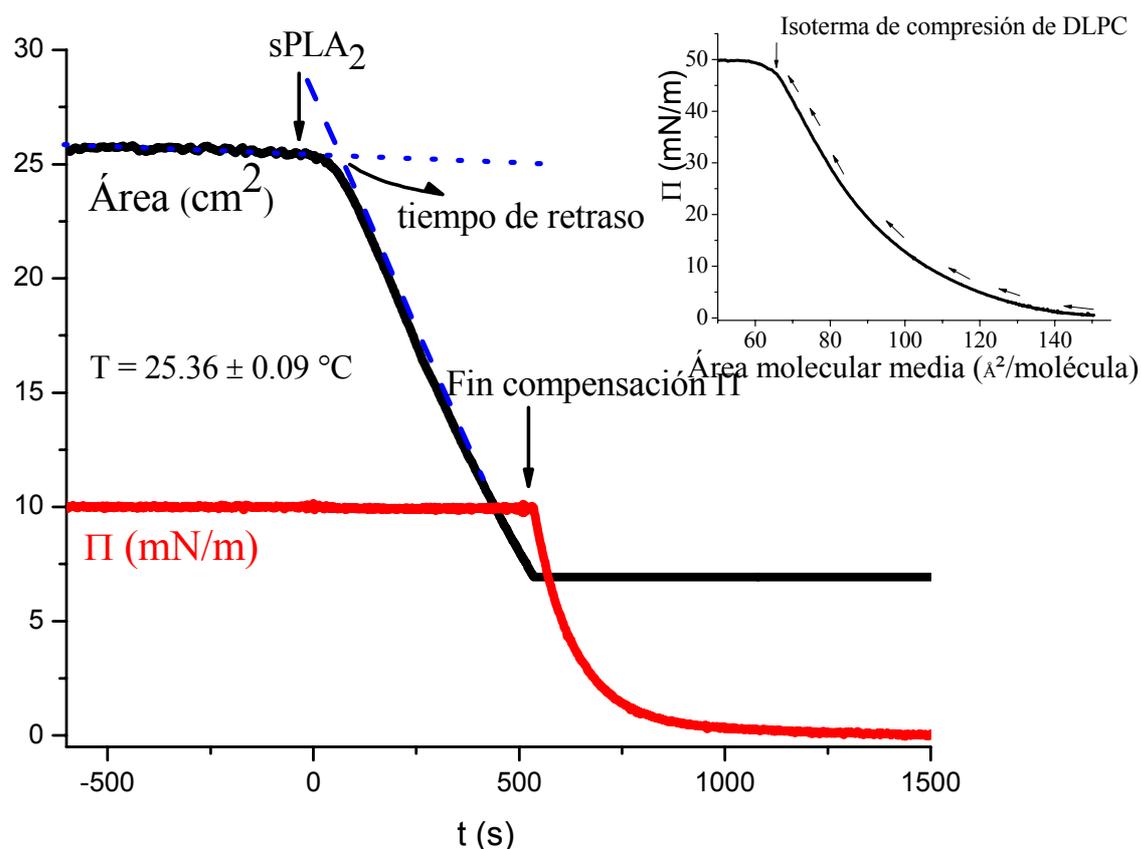
Verger y de Haas con colaboradores propusieron el uso de un segundo compartimento como reservorio de sustrato conectado al compartimento de reacción por una ranura superficial pequeña (Verger y col. 1973). Usando ese tipo de cuba (Figura I.9), se mantiene constante la cantidad de sustrato disponible para la reacción cuando se mantiene  $\Pi$  fija. La ranura superficial, al ser pequeña, minimiza la difusión de la enzima al compartimento reservorio pero permite suministrar sustrato fresco desde el compartimento reservorio. A este tipo de cuba, se la llama **cuba de orden cero** respecto de sustrato por no haber cambios en concentración superficial del mismo, ni área ocupada por éste en el compartimento de reacción. Las cinéticas de reacción obtenidas de este modo con

barostato son, por lo general, lineales con el cambio de área, como se ve en . La ventaja que presenta, más allá de la linealidad, es que puede usarse en estudios de mezcla con un componente no hidrolizable, como por ejemplo, el enantiómero D de un fosfolípido.

#### 5.4. Perfiles de actividad y $\Pi$ óptima

Utilizando una cuba de orden cero, junto con la técnica de barostato, se puede construir perfiles de velocidad hidrólisis de monocapas en función de la presión lateral a la cual fue medida cada velocidad. De estos perfiles surge un valor de  $\Pi$  al cual se obtiene la mayor velocidad de descenso de área (hidrólisis), denominado en este trabajo  **$\Pi$  óptima**. Este perfil, en nuestro trabajo, sirvió como elemento de comparación entre distintas fosfolipasas, ya que las condiciones de reacción siempre se mantuvieron constantes (lípidos, subfase y temperatura). En nuestros resultados no dependió de la configuración de la cuba (geometría).

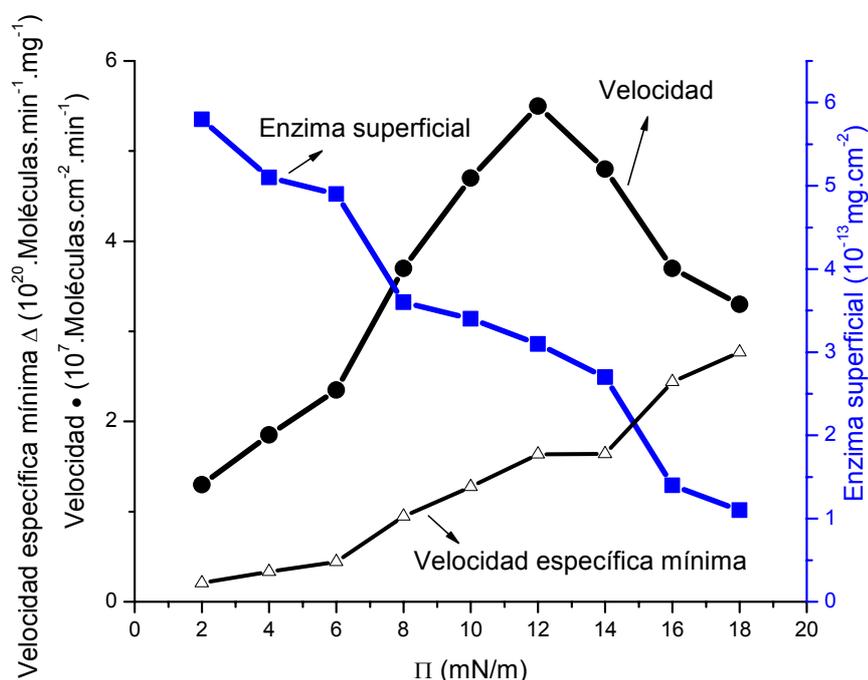
Otro dato que surge de estudios de barostato, es el **tiempo de latencia** o tiempo de inducción (**lag time** o *induction time*). Este se define en un experimento de barostato como el lapso entre el momento de inyección y el punto de corte de la proyección de las rectas de cambio de área previo a la inyección y la recta obtenida del ajuste lineal post-inyección (Figura I.10). El origen de este retraso estaría influenciado por la penetración de la enzima a la membrana (Pattus y col. 1979) y por la cantidad de producto acumulado (Cajal y col. 2000). A mayor penetración (de acuerdo al tipo de lípido usado, su longitud de cadena y densidad superficial a la que se encuentra), se observa menor latencia. Del mismo modo, cuando hay producto en la interfase hay también menor retraso (se postula que se debe a la presencia de carga negativa que otorga el ácido graso).



**Figura I.10. Registro temporal típico del área y presión de de monocapa de DLPC al ser hidrolizada. Centro:** monocapa de DLPC sobre subfase de tris 10 mM, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM pH=8 (25 °C). A  $t=0$ s, se inyectó en el compartimento de reacción sPLA<sub>2</sub> de páncreas porcino (30 nM final). Luego de unos minutos se obtuvo una cinética lineal de descenso de área ( $\text{cm}^2$ ). Al dejar de compensar la presión lateral  $\Pi$  ( $t \approx 500$ s), se observó el descenso continuo de  $\Pi$  debido a la hidrólisis de la monocapa. La latencia en obtener cinética lineal se define como el tiempo transcurrido desde la inyección hasta el tiempo de intersección de los dos ajustes lineales, pre y post inyección (líneas discontinuas). velocidad =  $0.1972$  moléculas<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. **Extremo superior derecho:** isoterma de compresión (25 °C) de una monocapa de DLPC con el mismo buffer utilizado para la reacción de hidrólisis. De esta isoterma se obtiene la cantidad de moléculas por unidad de área a una dada  $\Pi$ .

De estudios como el de Verger y col. 1976, surge que la  **$\Pi$  óptima de hidrólisis de monocapas** para una enzima es el resultado del balance de la cantidad de enzima unida a la interfase (Figura I.11), el tipo de sustrato y su orientación óptima para la hidrólisis, y no es un parámetro invariable para una dada enzima si no que depende del tipo de lípido y los demás factores. Manteniendo las condiciones de medida (lípido, agitación, cuba, temperatura, solución

acuosa, concentración de enzima) constantes, se pueden encontrar notables diferencias entre fosfolipasas A<sub>2</sub> (Figura I.1).



**Figura I.11. Perfil de velocidad y de cantidad de enzima absorbida en una monocapa de acuerdo a su presión lateral.** Figura tomada de (Verger y col. 1976) con modificaciones. PLA<sub>2</sub> pancreática 0.3 nM en cuba de orden cero (descenso de área a Π constante curva rectángulos) y exceso de enzima radioactiva en la superficie respecto del seno de la solución, luego de 15 minutos de reacción (círculos) a 25 °C. Sustrato: di-nonanoil PC

Conociendo la dependencia de Π vs. la densidad superficial de moléculas, se estima así la cantidad de moléculas hidrolizadas en una dada área (cm<sup>2</sup>) en un segundo (s). Al mantener todas las variables fijas, excepto la densidad superficial de sustrato, se puede construir un **perfil de velocidad** o variación de la tasa de hidrólisis respecto a la presión lateral a la cual se hace la medición. Es este tipo de figura la que suscitó el interés por analizar isoformas de fosfolipasas de veneno (Figura I.1, pág. 15).

Una de las principales diferencias entre el ensayo de actividad enzimática con dispersiones de lípidos en una fase acuosa (micelas mixtas de fosfolípido con algún detergente, o vesículas por ejemplo) es que en este caso puede llegarse a tener prácticamente toda la enzima adsorbida a una interfase, mientras que en el caso de la monocapa no. Esto es así porque hay mucha más área de sustrato (fosfolípido) disponible cuando se presenta en forma de agregados como micelas que cuando el lípido está como monocapa (debería tenerse un volumen de subfase minúsculo para llegar

a ser comparables las mediciones, o directamente no tener subfase). La razón del área total de la superficie lipídica respecto volumen total del compartimento acuoso ( $A_{total}/V_{ac}$ ) es del orden de  $1 \text{ cm}^{-1}$  mientras que cerca de  $10^5 \text{ cm}^{-1}$  para el caso de dispersión acuosa. La velocidad informada de hidrólisis en monocapas es en general una medida aparente, pues no se mide la cantidad de enzima unida a la interfase para calcular una actividad específica. Si igualmente se normaliza por la cantidad de enzima total agregada, se habla de **actividad específica mínima**, siempre teniendo presente que la cantidad de enzima involucrada en la reacción es muy pequeña respecto del total (Zografi y col. 1971).

La técnica mencionada permitió estimar la densidad superficial de lecitinas de cadena corta en micelas. Se hizo por comparación de los tiempos de latencia o *lag times* obtenidos en monocapas con los de estas micelas (Slotboom y col. 1977).

### **5.5. Método isocórico o de área constante de monocapa lipídica**

En la **Parte 5** de la tesis, se describe brevemente un método simplificado para estimar el óptimo de hidrólisis de una monocapa de DLPC por parte de una enzima, y se lo compara con el método de barostato. El método consiste en hacer mediciones isocóricas (área constante) inyectando la enzima a valores levemente mayores que la  $\Pi$  óptima estimada y observar la forma de la curva sigmoidea, para, a partir del punto de inflexión de la curva  $\Pi$  convertida a moléculas/cm<sup>2</sup>, obtener la zona de mayor velocidad de decaimiento.

### **5.6 Otras medidas con sustrato en forma de monocapa**

El uso de sustrato radioactivos ha sido reportado también en estudios donde se presenta como monocapas en interfase agua / aire, para medidas de hidrólisis por parte de PLA<sub>2</sub> o PLC. Por ejemplo, para seguir la actividad PLC en monocapas se usó DPPC con el grupo colina marcado radioactivamente, de tal forma que al desorberse hacia la subfase, se perdía cuentas de radioactividad superficial (Demel y col. 1975). Además, como en el caso del sustrato anterior, cuando no hay gran cambio de  $\Pi$  por la hidrólisis, se puede también medir de diferencia de potencial eléctrico  $\Delta\Delta V$  entre el aire y la subfase (Colacicco y Rapport 1966) y seguir así la acción

de una PLA<sub>2</sub>. En este trabajo se recurrió a este último para estimar el grado de reacción cuando se incubó monocapas de mielina con PLA<sub>2</sub> (ver Parte 3).

## 6. Consideraciones finales sobre lipólisis interfasial

Para finalizar, es necesario apuntar que usualmente los valores informados de los parámetros cinéticos son aparentes (esencialmente la constante  $K_M$  del formalismo de Michaelis-Menten), pues existen múltiples equilibrios (por ejemplo, disociación entre enzima, producto, y sustrato en la interfase y el seno de la solución), y es metodológicamente complejo adjudicar la catálisis a una cantidad conocida de enzima adsorbida.

En cuanto al formalismo para tratar reacciones interfaciales se han propuesto varios modelos usando el paradigma de las fosfolipasas A<sub>2</sub> secretadas, basados en la extensión del formalismo de Michaelis Menten y agregando los pasos de adsorción y desorción de la enzima a la interfase (Verger y col. 1973). Se entiende por enzimas interfaciales a aquellas proteínas solubles (fase acuosa) que deben asociarse a sus sustratos presentes en una interfase (Gelb y col. 1995). Considerando esto existen, hipotéticamente, dos modos extremos de acción de estas enzimas. El modo en el que está permanentemente unida la molécula de la enzima a un agregado (conocido en la jerga de estas enzimas como modo “scooting”) o bien, cuando la enzima realiza su ciclo catalítico cambiando o saltando de agregado en agregado (modo “hopping”). El primero es deseable para obtener parámetros cinéticos como la constante de catálisis y la  $K_M$  en la interfase, pues simplifica los parámetros a tener en cuenta. Además, usualmente los productos de estas catálisis tienden a quedar en la vesícula, siendo despreciable su intercambio con el seno de la solución. Si este no fuera el caso, puede presentarse el sustrato sobre un anfifilo no hidrolizable que retenga a los productos por un tiempo mayor al de la catálisis. Con estas y otras consideraciones experimentales que apuntan a medir en modo “scooting”, se puede hacer una comparación más fina entre los modos de acción de las distintas enzimas (Gelb y col. 1995).

## 7. Espectrometría de masas

En este trabajo se utilizó la técnica de espectrometría de masas para obtener información de secuencia de fosfolipasas de veneno y a su vez lograr la confirmación de las secuencias de fosfolipasas expresadas heterológamente (Parte 2 y 1, respectivamente). A continuación se hace una somera descripción de la mencionada metodología.

Durante la década de 1990 hubo avances técnicos que permitieron una ionización suave de macromoléculas y poder realizar espectrometría de masas sin fragmentación extensiva. Así se consiguió adaptar esta técnica, histórica y esencial en el campo de la química, a compuestos de gran peso molecular, como lo son las proteínas. Se diseñaron estrategias que permitieron obtener información específica de secuencia de tal forma de identificar proteínas a partir de sus espectros de masa. Con el conocimiento del patrón de fragmentación de los enlaces peptídicos y los tipos de iones comúnmente observados se evidenciaron reglas que permiten adjudicar una secuencia específica de aminoácidos a un dado péptido con muy buena confiabilidad en algunos casos, lo que permite obtener secuencia *de novo* al estilo de degradación de Edman. Esto, sumado a la creciente disponibilidad de base de datos genómicas y transcriptómicas, estimuló el desarrollo de algoritmos informáticos que analizan el mapa de péptidos o **huella peptídica** proveniente de digestión con proteasa de una proteína (usualmente tripsina) y lo comparan en forma estadística con digestiones teóricas de las proteínas en base de datos. Además, cuando se añade a esto la información de fragmentación de algunos de los péptidos, se puede aumentar notablemente el poder estadístico de la identificación. Un ejemplo de tales algoritmos está implementado en el servidor MASCOT, cuya versión gratuita en línea fue utilizada en este trabajo de tesis ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). El poder analítico de la técnica depende de la pureza de la muestra, por lo que usualmente las proteínas a analizar provienen de pasajes por columnas cromatográficas y finalmente por gel SDS-PAGE, o aún mejor, por un gel 2D.

Otros equipos además, poseen un cromatógrafo líquido (HPLC por lo general) acoplado con el espectrómetro de masa (usualmente con ionización del tipo de electroaerosol o ESI) que permite ir separando los péptidos tripticos y analizando su fragmentación a medida que van eluyendo de la columna del HPLC.

El principio básico de la espectrometría de masas es la generación de iones (en nuestro caso péptidos catiónicos por protonación) de la muestra a ser analizada y su análisis (e incluso selección) de acuerdo a su relación masa/carga ( $m/q$ ).

Un espectrómetro de masa apropiado para macromoléculas biológicas consiste en una **fente** que logra la gasificación e ionización de la muestra en forma lo suficientemente suave (baja energía) como para evitar su fragmentación antes de ser analizada. Actualmente las dos técnicas más extendidas para hacer esto son MALDI (Ionización Desorción por Láser Asistida por Matriz) y ESI (ionización por electroaerosol o *electrospray*), obteniendo la primera por lo general fragmentos cargados con un protón extra (carga +1), y para la segunda una población de iones con diversa cantidad de protones (desde +1 hasta +10 o quizás más). En este trabajo la técnica empleada fue MALDI. La matriz es un compuesto usualmente aromático que absorbe luz UV (de un láser pulsado) y transfiere en forma suave esta energía a la macromolécula. Por cada pulso de láser se genera una nube de iones de distinta relación  $q/m$ . Seguido a esto se enciende un voltaje acelerante en un electrodo cercano a la cámara de ionización que expulsa los iones positivos en dirección opuesta a éste y hacia el detector, todo en alto vacío (unos pocos mili Torr).

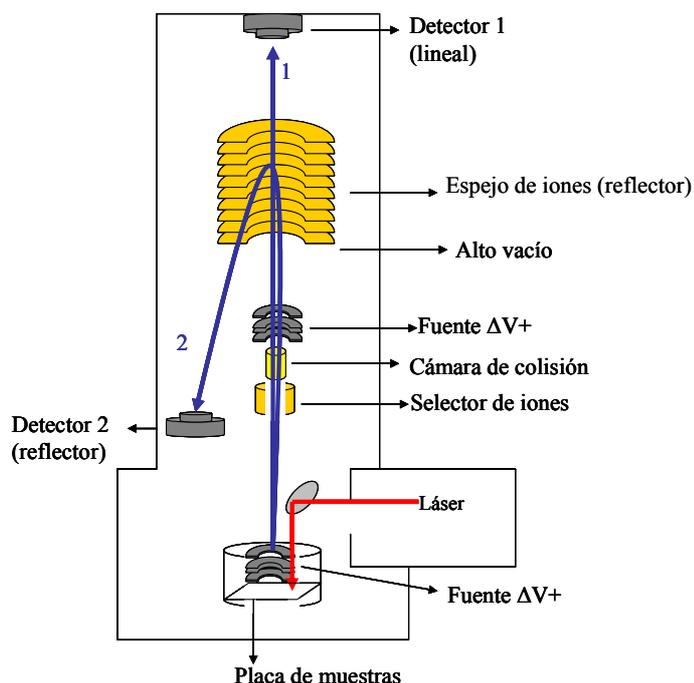
El **analizador de masa** es la parte del equipo que logra la discriminación de los iones de acuerdo a su relación masa/carga ( $m/q$ ). Un ejemplo es el TOF, o medición por tiempo de vuelo. Esencialmente consiste en registrar el tiempo para cada ión que llega al detector y de esta forma calcular su masa. Esto es así porque la energía potencial eléctrica ( $E_p=q\Delta V$ , carga por diferencia de potencial) que se aplicó se convierte en energía cinética ( $E_c=1/2m.v^2$ ) apenas empieza a moverse el ión, por lo que dos iones con la misma carga, llegarán a distintos tiempos si su masa es diferente (ver ecuación Figura I.12 ).

El gráfico de intensidad de cuentas vs.  $m/q$  es lo que se conoce como **espectro de masa**.

La técnica que involucra la selección de un péptido en particular (llamado ión precursor) y su fragmentación para así obtener información de secuencia, se denomina MS/MS, pues se realizan dos espectrometrías de masa en tándem. En esta tesis se utilizó MS/MS basado en dos detectores TOF con una cámara de colisión (para fragmentar los iones) interpuesta, de aquí el nombre de MALDI-TOF-TOF.

El flujo de trabajo (*workflow*) usual es determinar la masa total de la proteína en el modo lineal del espectrómetro. Además, y en paralelo, la misma muestra, usualmente en una banda de gel de poliacrilamida, se trata con tripsina para digerirla y extraer sus péptidos. Estos últimos se analizan en el modo reflector y se obtiene la **huella peptídica** (F) para elegir el grupo de péptidos que se quiere fragmentar. En este paso se descartan aquellos provenientes de la matriz, y residuos de tripsina por ejemplo. Una vez seleccionados, se hace una segunda ronda de extracción con láser, esta vez en modo reflectrón (para poder elegir un péptido y fragmentarlo). En este modo participa el

**selector de masas** (Figura I.12), un dispositivo que permite el paso sólo de iones con la relación  $m/q$  deseada.



$$\sqrt{d^2 m / (2q\Delta V)} = t$$

$$K.(m)^{1/2} = t$$

**d:** distancia fuente a el detector

**m:** masa

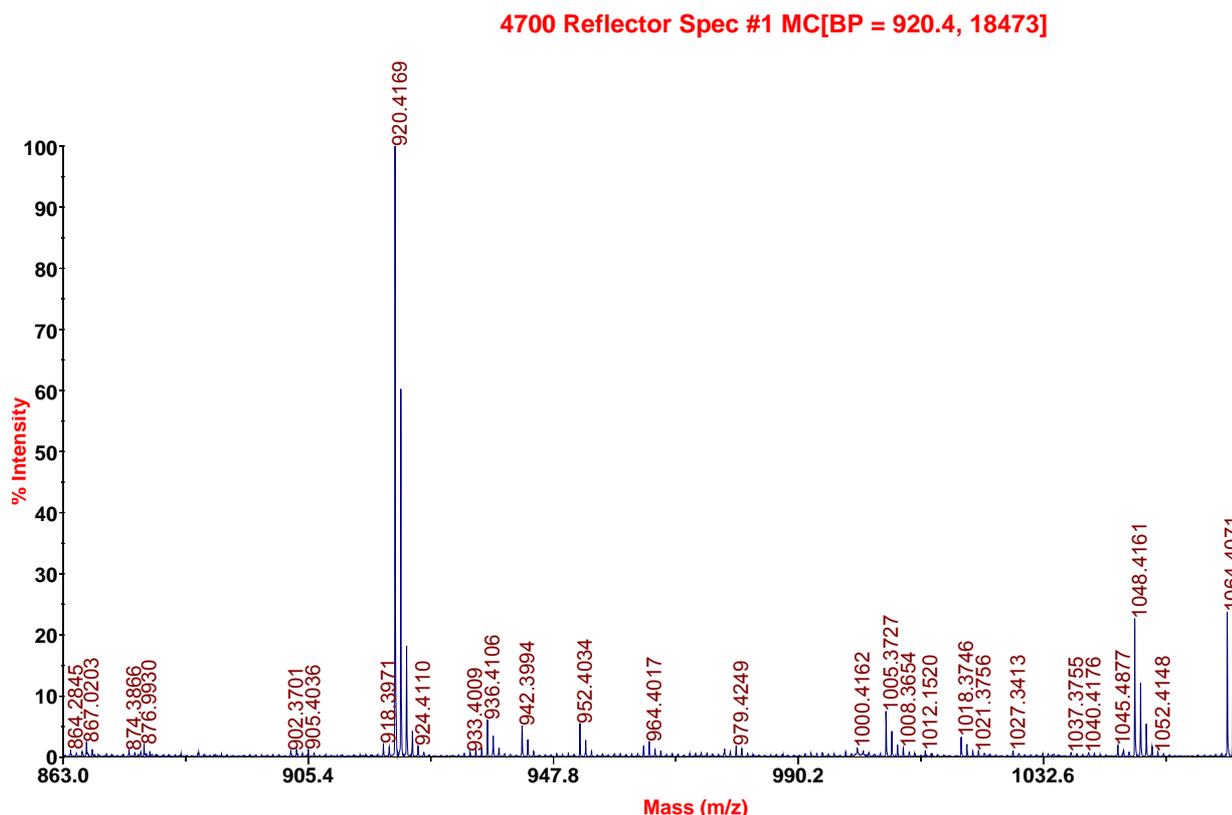
**t:** tiempo de vuelo

**ΔV:** diferencia de potencial

**Figura I.12. Esquema de un espectrómetro MALDI-TOF-TOF y principio de cálculo de masa,**

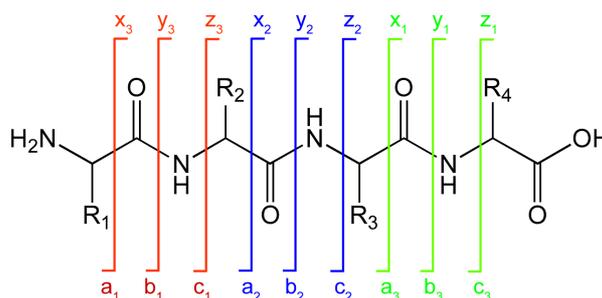
**Panel izquierdo** inspirado a partir de imagen de difusión del 4800 MALDI-TOF TOF Plus de Ab SCIEX. Se muestra en azul (línea 1) la vía de los iones generados en la Fuente inferior hacia el detector 1 (modo lineal, para determinar masa de proteínas enteras, usualmente entre 5000 y 200.000 Da, con errores cerca de 15Da). El camino 2 indica la vía de grupo de iones reflejados hacia un detector 2 (reflector) lo que permite determinar masas con mayor precisión, ideal para la hacer huella peptídica, con un error de 0.1 Da o menos. Cuando se usa el modo MS/MS, al indicar la selección de un valor de  $m/q$ , (en general desde 500 hasta 2500 Da) se obtiene en el detector reflector el patrón de fragmentación (desde unos pocos Da, hasta la masa del precursor, usualmente inferior a 3000 Da, con errores de 0.3 Da o menos). En el **panel derecho** se observa la relación entre diferencia de potencial, masa del ión y tiempo de vuelo.

Cuando se selecciona un ión de interés (péptido triptico por ejemplo) puede obtenerse el espectro de masa de su fragmentación. Esta, en MALDI-TOF ocurre en forma espontánea, lo que se conoce como fragmentación post fuente o PSD (*Post source decay*). También puede hacérselo fragmentar de forma asistida con un gas inerte en la cámara de colisión. Luego se hace la segunda detección de masa (MS2 por el segundo detector TOF) y se obtiene el patrón de fragmentación. Es a partir de éste que se obtiene información de secuencia *de novo* (Figura I.15) de acuerdo a conocimiento previo de los puntos de fragmentación (Figura I.14) y la diferencia en masa entre los iones.

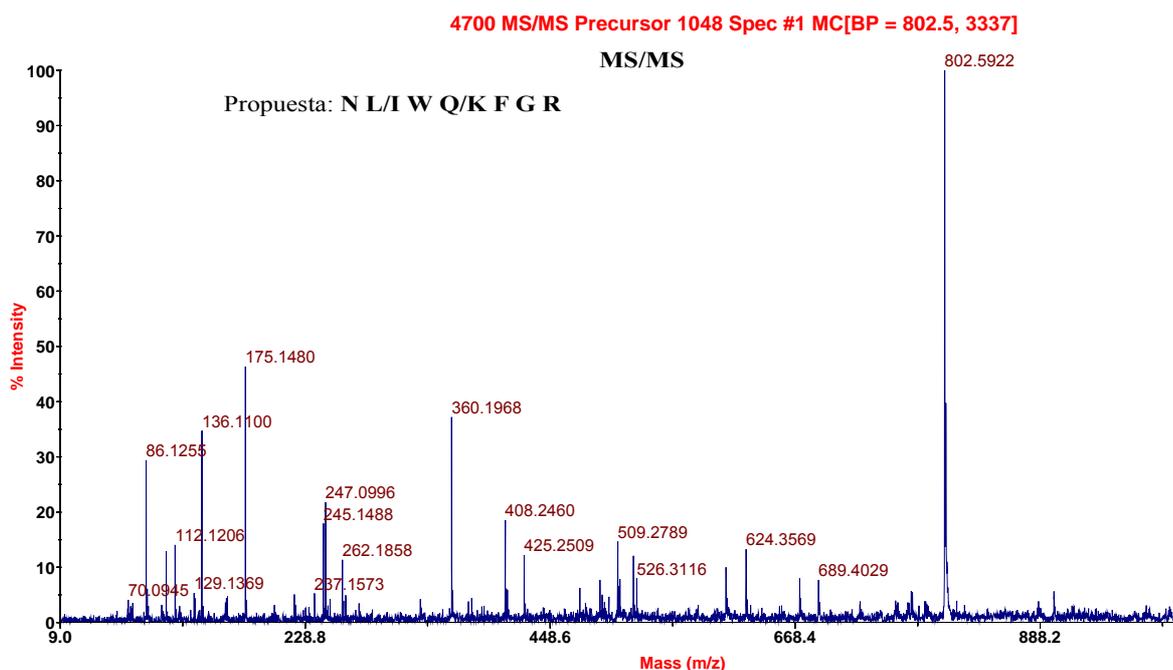


**Figura I.13. Huella peptídica post tripsinización de muestra con actividad fosfolipasa a alta presión obtenida en este trabajo.** Ejemplo de péptidos extraídos luego de incubar una banda de proteína en gel con tripsina. Cada péptido puede seleccionarse para una fragmentación (MS/MS), Figura I.15.

En MALDI-TOF-TOF, los iones de mayor intensidad que se observan son los de la serie **b** (iones de péptidos que conservan el N-terminal), los de la serie **a** (como los **b**, pero sin el carbonilo C-terminal), o los iones **y**, que poseen el carboxilo C-terminal (Figura I.14).



**Figura I.14. Puntos de fragmentación usuales de un péptido.** Se esquematiza con un subíndice que aminoácido se fragmenta, y su posición de corte los clasifica en iones tipo **a**, **b**, **c** y sus pares correspondientes **x**, **y**, **z**. Imagen extraída de Wikipedia, Kkmurray, en [http://en.wikipedia.org/wiki/Peptide\\_sequence\\_tag](http://en.wikipedia.org/wiki/Peptide_sequence_tag). Nomenclatura propuesta por (Roepstorff y col. 1984).



**Figura I.15. Espectro MS/MS.** Fragmentación de un péptido seleccionado ( $z/m=1048$ , Figura I.15) obtenido por digestión triptica. A partir de las diferencias entre picos observados se propuso una secuencia para ese péptido.

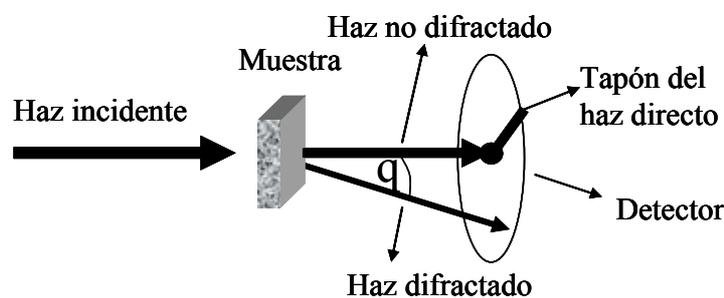
La gran ventaja de la espectrometría de masas frente a la degradación de Edman es su velocidad y costo, lo que permite tratar gran cantidad de muestras y obtener información de fragmentación en pocos minutos. Existen casos para los cuales es necesario un ciclo de degradación de Edman en caso que la asignación del aminoácido inicial sea incierta. Además, la técnica de Edman permite obtener información de secuencia sólo cuando el N-terminal no está bloqueado. Por lo general se obtiene entre 15 y 40 aminoácidos de secuencia, lo que obliga a la separación de péptidos si se quiere tener información más allá del N-terminal de la proteína. Se requiere mayor cantidad de masa para el método de Edman que para la espectrometría tipo MALDI-TOF-TOF.

## 8. Uso de difracción de rayos X a bajo ángulo (SAXS) para estudio estructural de membranas

En la Parte 4 del trabajo se describen los resultados obtenidos por la acción de sPLA<sub>2</sub> secretadas sobre mielina y sus lípidos, como ejemplo de membrana natural. La mielina es la envoltura membranosa del axón de las neuronas de mamíferos. Dentro de las técnicas estructurales empleadas para su estudio en el área de Biofísica de nuestro instituto, se encuentran aquellas de

monocapas, desde medición de  $\Pi$  y parámetros de compresibilidad, hasta estudios de reflectividad para estimar espesor, y morfología utilizando sondas en microscopía fluorescente o microscopía de ángulo de Brewster (sin sondas). Las técnicas estructurales más directas y potentes utilizadas son las de dispersión de neutrones y rayos X, en particular dentro de esta última, los estudios a bajo ángulo o SAXS (*Small Angel X-ray Scattering*).

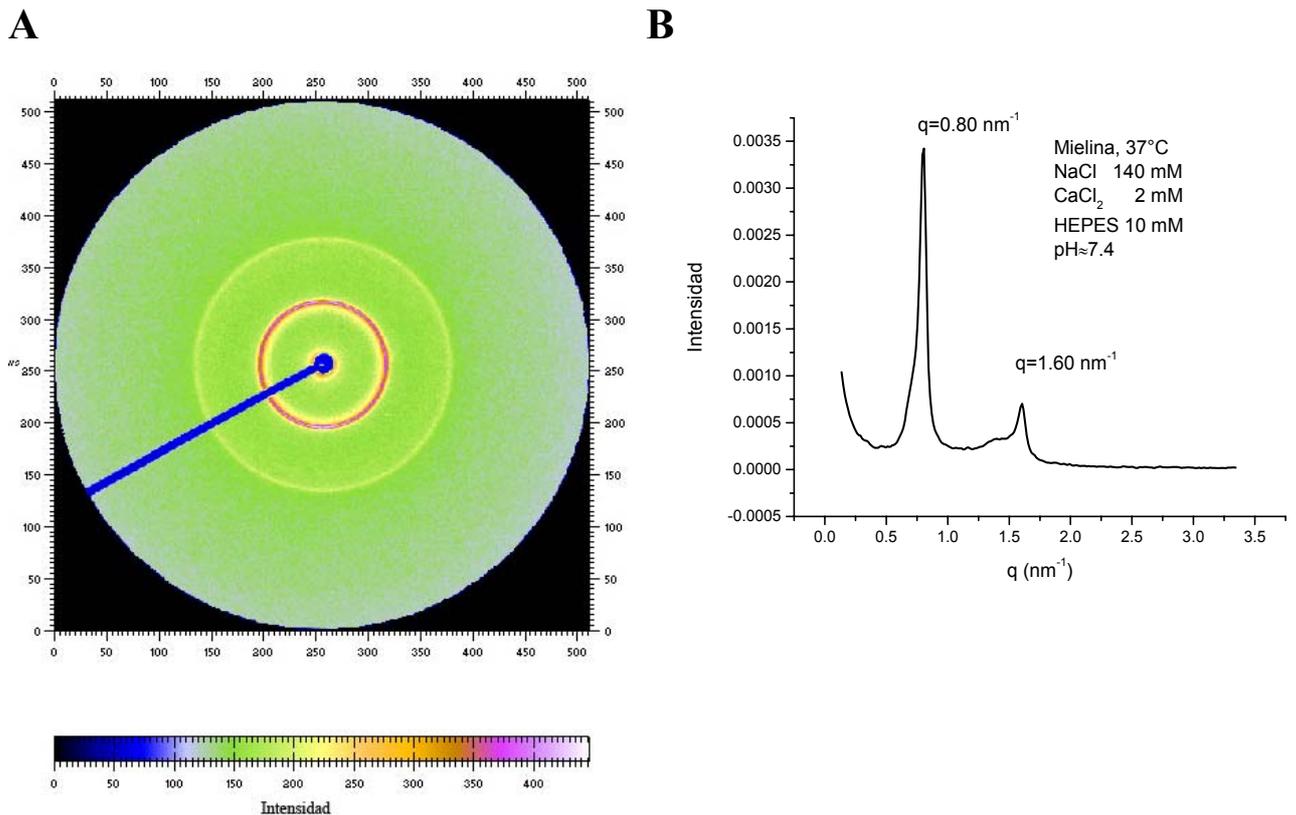
El método de SAXS consiste, brevemente, en hacer incidir un haz de rayos X de cierta longitud de onda (en nuestro caso  $\lambda = 0.1488$  nm) sobre una muestra, colectando el haz difractado a un ángulo pequeño  $q$  (usualmente de 0.1 a 0.17 radianes) con un detector. Éste se protege del haz no difractado, muy intenso, con una pieza metálica conocida como tapón del haz directo o *beam stopper* (Figura I.16).



**Figura I.16. Esquema simplificado de la disposición de muestra y haz en un experimento de SAXS.** La distancia típica entre muestra y el detector es del orden del metro, siendo  $q$  entre 0.1 y  $10^\circ$

Las ventajas de esta técnica incluyen la posibilidad de tener información estructural de muestras no cristalinas (por ejemplo, suspensiones acuosas de lípidos o soluciones de proteína). Se puede calcular el espaciamiento (a partir de los picos de difracción, si los hubiere) entre estructuras repetitivas de la muestra, así como la geometría de la fase repetitiva (a partir del llamado factor de forma, la porción de la curva sobre la que usualmente está montado el pico). No requiere una preparación especial de muestra que puede afectarla como es el caso de la microscopía electrónica.

Cuando una estructura presenta periodicidad los rayos difractados generan un patrón de interferencia. De la relación de picos (si los hubiere) puede conocerse el tipo de arreglo o fase lipídica que hay en la suspensión. La relación entre el ángulo  $q$  (variable del “espacio recíproco”) y la separación  $d$  entre estructuras con alta densidad electrónica, dispersantes (variable del “espacio real”) está dada por  $q = 2\pi/d$ .



**Figura I.17. Anillos de difracción de muestra de mielina.** **A.** Foto obtenida por el detector. Se puede observar el anillo principal, de menor diámetro (menor  $q$ ) y un anillo secundario, de mayor  $q$ , correspondiente a su armónico. Se obtienen anillos porque la muestra no tiene una orientación preferencial de dispersión. **B.** Integración radial de la intensidad de A en función de  $q$ . Se observa el armónico en el doble de su valor ( $q=1.60 \text{ nm}^{-1}$ ).

Es decir, la técnica de SAXS permite estudiar la forma y la organización espacial de objetos con tamaños entre 1 y 100 nm. Es una técnica de baja resolución comparada con la cristalografía de rayos X, sin embargo es útil para obtener información estructural en muestras periódicas no cristalinas, en solución o polvo, donde la cristalografía es inútil. En comparación con otra poderosa técnica, la resonancia magnética nuclear (RMN), presenta la ventaja de permitir la obtención de información de agregados de mayor tamaño (Svergun y col. 2003), ya que RMN tiene actualmente un límite entre 30 y 40 kDa para proteínas.

El trabajo realizado consistió, (ver Parte 4), en analizar los efectos de fosfolipasas en cantidades catalíticas (concentraciones de proteína muy bajas, invisibles a la técnica) sobre la estructura de la mielina vista por SAXS, junto con estudios complementarios de medición de ácidos grasos liberados y cambios de potencial eléctrico ( $\Delta V$ ) en monocapas.

## **Parte 1. Enfoque recombinante. Clonado, expresión recombinante funcional y perfil hidrolítico de monocapas de DLPC de sPLA<sub>2</sub> de *Bothrops diporus*.**

### **1. Objetivo**

Obtener la secuencia completa de las isoformas de PLA<sub>2</sub> de *Bothrops diporus* partir de su ARNm, y a su vez lograr la producción recombinante de las enzimas en forma activa para verificar su perfil de velocidad. Esto permitiría, a su vez, futuros estudios de mutagénesis dirigida.

### **2. Resumen**

Se clonaron dos isoformas de fosfolipasa A<sub>2</sub> y una miotoxina a partir de ARNm de glándula de veneno de *Bothrops diporus*. Las secuencias de fosfolipasa fueron expresadas en su forma madura, sin péptido señal, en una cepa de *E. coli* mediante fusión a ubiquitina. Esta construcción se halló sobre-expresada en cuerpos de inclusión, que fueron solubilizados. La proteína de fusión se renaturalizó y se activó por incubado con peptidasa específica de ubiquitina, que escindió este motivo de la fosfolipasa. Se confirmó la secuencia por espectrometría de masas. El perfil de actividad obtenido frente a monocapas de DLPC es semejante a las isoformas P1 y P2 purificadas previamente de veneno (Daniele y col. 1997), no mostrando actividad a presiones mayores a 18 mN/m en monocapas de DLPC.

### **3. Estrategia de clonado de isoformas de sPLA<sub>2</sub>**

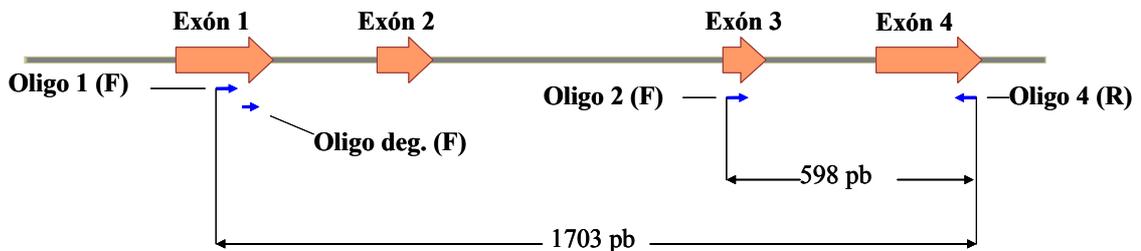
El material de partida, fuente del ARNm codificante para las sPLA<sub>2</sub> se obtuvo de glándula de veneno de especímenes de *Bothrops diporus*. Los ejemplares de esta especie fueron previamente (3 a 4 días antes) estimulados a producir veneno mediante la extracción del mismo.

Para clonar el ADN codificante para las isoformas de sPLA<sub>2</sub> y así obtener su secuencia completa, se optó por un enfoque dirigido de retrotranscripción de ARNm a ADNc usando ARN total como molde junto con Oligo dT15 (especificidad por poli A, característico de ARNm). Seguido a esto, se amplificó el ADNc por PCR usando oligos apropiados (ver a continuación).

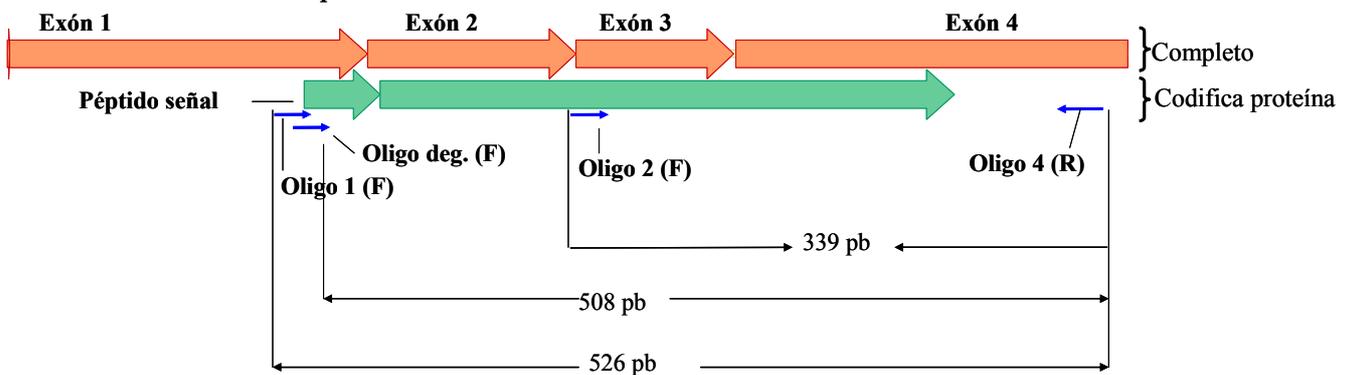
### 3.1. PCR. Diseño de oligonucleótidos y amplificación

El punto de partida para el diseño de los oligonucleótidos a usar como iniciadores de PCR fue la búsqueda en base de datos de secuencias sPLA<sub>2</sub> a partir de las secuencias de proteína obtenidas por degradación de Edman (Daniele y col. 1997). Del conjunto de secuencias detectadas con la búsqueda, aquellas que presentaron mayor detalle fueron de genes de sPLA<sub>2</sub> de víboras asiáticas (por ejemplo, *Trimeresurus gramineus*). Puesto que la región no traducida del ARN (UTR) posee menor variación que la proteica para este tipo de enzimas (Nakashima y col. 1995; Nakashima y col. 1993; Ogawa y col. 1992), se diseñaron oligonucleótidos basados en esos genes que hibridizaran tanto en la región 5'UTR como en la 3'UTR (Figura P1.1).

#### A Gen PLA<sub>2</sub> de *Trimeresurus gramineus* – GB: D31780 - 2387 pb



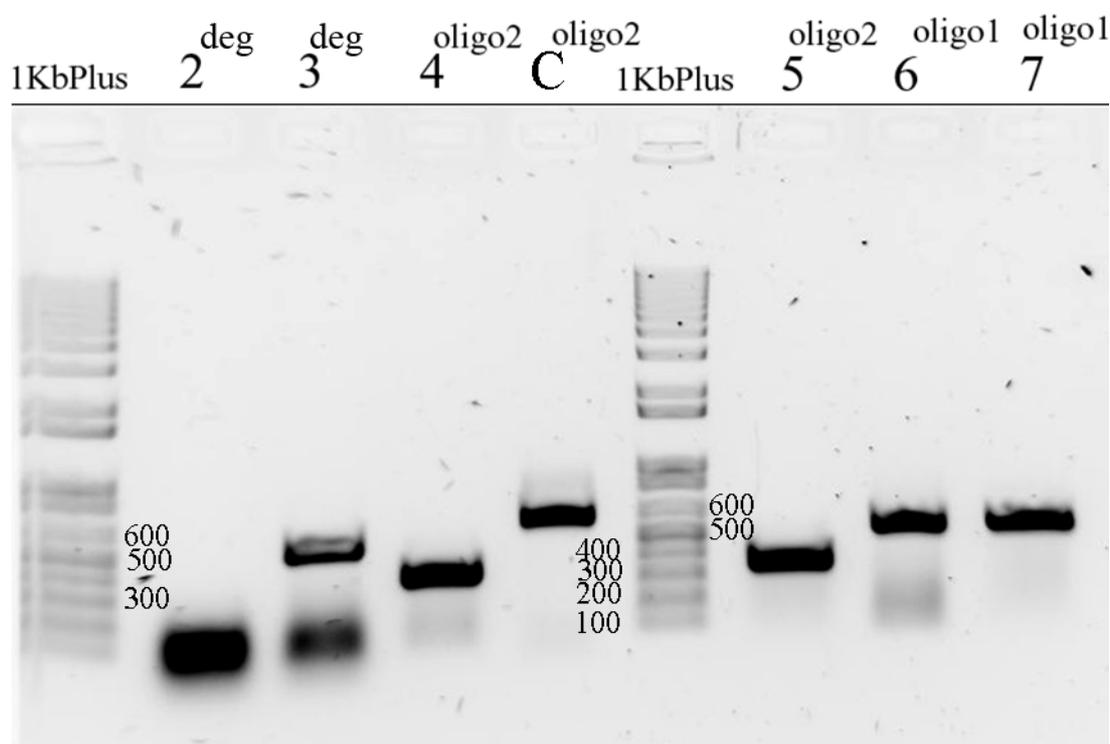
#### B ARNm deducido– 713 pb



**Figura P1.1. Estructura de gen completo (A) y de ARN empalmado (B) de una fosfolipasa secretada de víbora.** **A:** se observa la disposición general de intrones y exones de un gel de *Trimeresurus gramineus*. Sobre la información de esta secuencia y otra similares se diseñaron los oligonucleótidos para clonar las secuencias codificantes de las PLA<sub>2</sub> de *Bothrops diporus*. **B:** se muestra la estructura final del ARNm esperable luego del empalme de los intrones. Con flechas se indican los lugares de hibridación de los oligonucleótidos empleados en la PCR post-transcripción reversa.

En todos los casos, el oligonucleótido reverso fue el mismo (oligo 4) siendo diferentes los oligonucleótidos sentido (F), Figura P1.1. El oligo 2 se utilizó como detección de una posible contaminación con ADN genómico que interfiriera con amplificación de ADNc, al poder amplificar una banda de 598 pb, (Figura P1.1 A) a partir de ADN genómico u otra de 339 pb al usar ADNc como molde (Figura P1.1 B). Se logró amplificación para ambos casos (Figura P1.2).

En general estas proteínas tienen entre 119 y 122 aminoácidos en su forma madura, con un péptido señal de 16 a.a. que incluye la metionina inicial, por lo que se esperaba 138 a.a. a partir de fragmentos de ADN de entre 408 y 417 p.b. (incluyendo un codón de finalización). Se obtuvo amplificación y las migraciones de las bandas en electroforesis de gel de agarosa coinciden con los tamaños esperados (Figura P1.2). Estos fragmentos de ADN se clonaron, obteniéndose la secuencia completa codificante para proteína con su péptido señal.

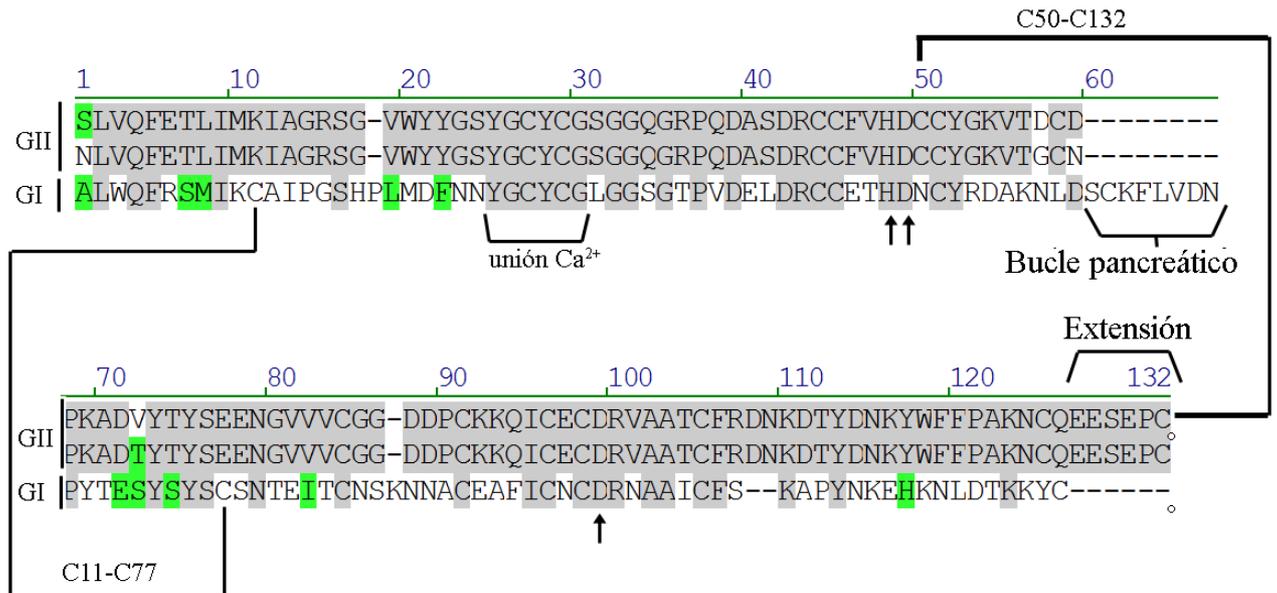


**Figura P1.2. Análisis electroforético de los productos de PCR.** Se muestra un gel agarosa teñido con BrEt donde se sembraron alícuotas de fracciones de PCR. El superíndice indica el oligo sentido de cada reacción. El C es el único donde el molde fue ADN genómico, en los restantes el molde fue ADNc. Las bandas de los carriles 6 y 7 se escindieron y se purificó su ADN para sub-clonarlo en vector de expresión. Los tamaños de las bandas obtenidas coinciden con lo esperado de acuerdo a estructura de gen de víboras asiáticas (Figura P1.1).

El tamaño esperado de los fragmentos se calculó de acuerdo a los genes completos de sPLA<sub>2</sub> de *Trimeresurus gramineus* (GenBank D31778, D31779, D31780, D31781), esto y los detalles de las mezclas se resumen en la Tabla M.1 (pág. 114, parte Métodos). *Trimeresurus flavoviridis* también tiene una estructura sumamente similar en los genes de sPLA<sub>2</sub>.

### 3.2. Secuencias de sPLA<sub>2</sub> y miotoxina obtenidas

Los insertos clonados en plásmidos de amplificación fueron secuenciados. Se obtuvieron al menos 4 secuencias de isoformas putativas de sPLA<sub>2</sub> y una miotoxina. Las que se informan (Tabla P1.1 A) fueron las dos con que se trabajó en su expresión heteróloga, siendo éstas las que se obtuvieron en experimentos independientes en forma repetida, de dos individuos diferentes, y en más de un clon (esto disminuye probabilidades que las diferencias sean artefactos inducidos por errores en la transcripción reversa o en la secuenciación, respectivamente). La diferencia entre las dos isoformas sPLA<sub>2</sub> clonadas es de 4 residuos, 3 de ellos en la porción madura (96.7% de identidad, Tabla P1.1 A ). La mayoritaria en los clones fue nombrada como ***Bd* sPLA<sub>2</sub>-I** o **S-PLA<sub>2</sub>** por su serina inicial en la secuencia madura, y fue depositada en GenBank (JQ661499). La minoritaria fue la ***Bd* sPLA<sub>2</sub>-II** o **N-PLA<sub>2</sub>** por su aminoácido inicial (asparragina), también depositada en GenBank (JQ661500). Son proteínas ácidas, con unos puntos isoeléctricos (P.I.) teóricos de 4.66 y 4.90 respectivamente, calculados como contribución individual de residuos de aminoácidos. Las secuencias de sPLA<sub>2</sub> son ricas en cisteínas y muy similares a otras sPLA<sub>2</sub> de veneno agrupadas como tipo II en la superfamilia de fosfolipasas (Schaloske y Dennis 2006). Cabe destacar que la secuencia de la proteína madura de *Bd* sPLA<sub>2</sub>-I es idéntica a la reportada para *Bothrops erythromelas* (víbora brasileña, GenBank DQ359953) (de Albuquerque Modesto y col. 2006). Estas secuencias tienen un 76% de identidad de posición de aminoácidos respecto a la sPLA<sub>2</sub> de *Crotalus atrox* (GenBank AF269131), clasificada como de grupo II A (Arni y col. 1996; Schaloske y Dennis 2006; Six y Dennis 2000).



**Figura P1.3. Ejemplificación de diferencias de secuencia primaria entre sPLA<sub>2</sub> de grupo I y II.**

Se compara las sPLA<sub>2</sub> clonadas, pertenecientes al grupo II (GII), con la enzima pancreática, perteneciente al grupo I. Se muestra el bucle (*loop*) pancreático del grupo IB y la presencia de la extensión C-terminal del grupo II. Se observa la conservación de la diada H48 y D99, y el D49 (flechas), así como una región conservada el sitio de unión a Ca<sup>2+</sup> y los puentes disulfuro únicos para cada grupo. Las demás cisteínas están conservadas en su posición.

Las sPLA<sub>2</sub>s de este grupo tienen 7 puentes disulfuros y un tamaño típico de 122 a.a. con un disulfuro único entre las posiciones 50 y 122 (132 si se sigue la numeración con la pancreática, ver Figura P1.3). Ambas secuencias clonadas tienen el par típico H48/D49, el D99 dentro del sitio activo D-CC-HD-CY, y el sitio de unión a Ca<sup>2+</sup> YGC-CG-GG. Además, se observa la extensión C-terminal característica del grupo II.

También se clonó la totalidad del marco de lectura de una miotoxina putativa similar a sPLA<sub>2</sub>, de características básicas (P.I. = 9.10, Tabla P1.1 B), denominada BdMyo-II (JQ661501), con la presencia típica de una lisina en posición 49 (K49) en vez de un aspártico (Lomonte y col. 2003). En base de datos se encontró una identidad del 87.7% con una miotoxina de *Bothrops moojeni* usando búsqueda BLAST-p.. Las miotoxinas similares a fosfolipasas son típicas de los venenos de crotálicos (víboras de los géneros *Agkistrodon*, *Bothrops* y *Trimeresurus*) y no se han descrito en otras serpientes (no víboras) como por ejemplo, elápidos (cobras, (Heinrikson 1991). Poseen una sustitución clave en la posición 49, encontrándose una lisina (K) en vez de aspartato (D), de aquí el nombre de **miotoxinas K49** (Maraganore Heinrikson 1984).

## A

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| P-1 <sup>a</sup>                  | <u>SLVQFETLIM</u> <u>MIAGR</u>  |
| P-2 <sup>a</sup>                  | <u>SLVQFETLIM</u> <u>MIAGR</u>  |
| P-3 <sup>a</sup>                  | <u>NLVQFETLIM</u> <u>KIAGR</u>  |
| <i>Pro-Bd sPLA<sub>2</sub>-I</i>  | <i>MRTLWI MAVLLVG</i> <b>VKG</b> <u>SLVQFETLIM</u> <u>KIAGRS</u> -GVW YGSGY <b>GCYCG</b> SGGQGRPQDA <u>SDRCCFVHDC</u> <u>CYGKVTDC</u> DP KADVITYSEE NGVVV <b>CGDD</b> |
| <i>Pro-Bd sPLA<sub>2</sub>-II</i> | <i>MRTLWI MAVLLVG</i> <b>VEG</b> <u>NLVQFETLIM</u> <u>KIAGRS</u> -GVW YGSGY <b>GCYCG</b> SGGQGRPQDA <u>SDRCCFVHDC</u> <u>CYGKVTGC</u> NP KADVITYSEE NGVVV <b>CGDD</b> |
| <i>Pro-C.atrox</i>                | <i>MRTLWI VAVLLL</i> <b>GVEG</b> <u>SLVQFETLIM</u> <u>KIAGRS</u> -GLL WYSAY <b>GCYCG</b> WGGHGLPQDA <u>TDRCCFVHDC</u> <u>CYGKATDC</u> NP KTVSYTYSEE NGEII <b>CGDD</b> |
| <i>Pro-Bd sPLA<sub>2</sub>-I</i>  | <u>PCKKQICECD</u> <u>RVAATCFRDN</u> <u>KDTYDNKYWF</u> <u>FPAKNCQEES</u> <u>EPC</u>  |
| <i>Pro-Bd sPLA<sub>2</sub>-II</i> | <u>PCKKQICECD</u> <u>RVAATCFRDN</u> <u>KDTYDNKYWF</u> <u>FPAKNCQEES</u> <u>EPC</u>  |
| <i>Pro-C.atrox</i>                | <u>PCGTQICECD</u> <u>KAAAICFRDN</u> <u>IPSYDNKYWL</u> <u>FPPKNCREEP</u> <u>EPC</u>  |

## B

|                     |   |
|---------------------|---|
| <i>Pro-Bd-MyoII</i> | <i>MRTLWI MAVLLVG</i> <b>VEG</b> <u>NLWQLGKMIL</u> <u>LETGKI</u> -PAK SYAAY <b>GCNCG</b> LGGRGKPKDA <u>TDRCCYMHKC</u> <u>CYKKLTC</u> DP KKDRYSYSWK DKTIV <b>CRENN</b> |
| <i>Pro-B.Asper</i>  | <i>MRTLWI MAVLLVG</i> <b>VEG</b> <u>SLVELGKMIL</u> <u>QETGKN</u> -PVT SYGAY <b>GCNCG</b> VLGRGKPKDA <u>TDRCCYVHKC</u> <u>CYKKLTC</u> NP KKDRYSYSWK DKTIV <b>CGENN</b> |
| <i>Bd-MyoII</i>     | <u>SCLKELCECD</u> <u>KAVAI</u> <b>CLREN</b> <u>LDTYNKKYRY</u> <u>NYLKPFC</u> CKKA <u>DPC</u>  |
| <i>B.Asper</i>      | <u>SCLKELCECD</u> <u>KAVAI</u> <b>CLRKN</b> <u>LDTYNKKYKN</u> <u>NYLKPFC</u> CKKA <u>DPC</u>  |

**Tabla P1.1. Secuencias de aminoácidos de fosfolipasas y miotoxinas.** Se indica en *italica* el péptido señal. Se introdujo un espacio en el alineamiento para mantener la numeración usual. En negrita se marcan las cisteínas, que están conservadas tanto en las miotoxinas como en las fosfolipasas. **A.** P1,P2 y P3 son las secuencias obtenidas por degradación de Edman a partir de veneno (Daniele y col. 1997). *Bd sPLA<sub>2</sub> I* y *II* son las deducidas obtenidas por duplicado en experimentos independientes (GenBank JQ661499 y JQ661500 respectivamente). Se incluye la secuencia de *Crotalus atrox* como modelo del grupo IIA (GenBank AF269131) **B.** Secuencia deducida de una miotoxina putativa símil a PLA<sub>2</sub>, *Bd MyoII*. Se muestra la secuencia de una miotoxina (IV) de *Bothrops Asper* (Swiss-Prot: AF109911) como referencia, idéntica a la porción de *Bothrops diporus* descrita por degradación de Edman (Geoghegan y col. 1999). Notar el cambio de D por K, en la posición 49, típico de estas moléculas.

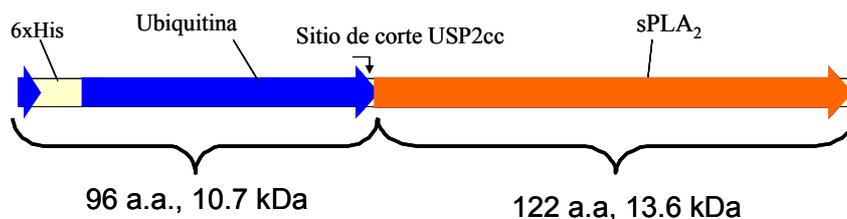
La secuencia madura deducida tienen un punto isoeléctrico teórico de 9.10 y una identidad de 78% con la porción N-terminal (41 residuos) de la miotoxina Bneu I, reportada por primera vez para *Bothrops diporus* (Geoghegan y col. 1999). Nuestra secuencia de *Bd Myo-II* también tiene la misma distribución de cisteínas de las isoformas *Bd sPLA<sub>2</sub>* (Tabla P1.1 B). Comparada con otras miotoxinas de víboras del género *Bothrops*, se obtuvo la mayor identidad con aquellas de las especies *Bothrops asper* y *Bothrops moojeni*.

#### **4. Expresión heteróloga**

Se eligió empezar los estudios de expresión heteróloga con *Bd sPLA<sub>2</sub>-I* debido a su identidad en la secuencia de proteína madura (dos aminoácidos distintos en secuencia de péptido señal), con una enzima probada a nivel de veneno y funcional de una víbora brasileña, *Bothrops erythromelas*, B-E-I-PLA<sub>2</sub> (de Albuquerque Modesto y col. 2006). Luego de hacer pruebas infructuosas de expresión de proteína con secuencia nativa, es decir, sin proteína de fusión (vector pET11a, no mostrado), se recurrió a un enfoque de fusión con ubiquitina en el N-terminal y la utilización de una peptidasa específica de ubiquitina (Catanzariti y col. 2004), cuyo corte no deja aminoácidos extras en el extremo C-terminal a la ubiquitina, requerimiento esencial para la catálisis interfásial (ver Introducción, pág.29).

##### **4.1 Construcciones de ADN**

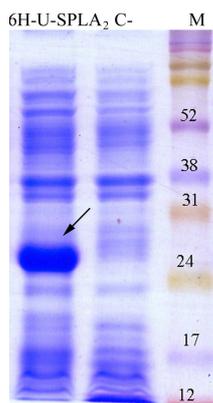
Para introducir la secuencia codificante de la proteína madura en el plásmido de expresión con ubiquitina, se excluyó la secuencia del péptido señal haciendo una PCR con iniciadores con sitios de clonado del nuevo vector de expresión (plásmido). Este fue un vector pET15b con una secuencia de ubiquitina en marco, (Catanzariti y col. 2004). Luego del clonado (detalles en sección de Métodos) se obtuvo una proteína de fusión con seis histidinas en tándem, seguidas de un sitio de corte de trombina, una metionina, ubiquitina y finalmente la sPLA<sub>2</sub>. Esta construcción se denomina aquí como pHUE- *Bd sPLA<sub>2</sub>-I* y su producto de expresión proteica como 6xH-Ub- *Bd sPLA<sub>2</sub>-I* (Figura P1.4).



**Figura P1.4. Esquema de proteína de fusión para expresar *Bd* sPLA<sub>2</sub> I y II.** El tamaño total esperado es de 218 a.a con un peso de 24.3 kDa. Al producirse la proteína con un N-terminal no nativo se reduce las posibilidades de que sea activa y tóxica a la bacteria huésped (*E. coli*). Este sistema permite escindir el motivo ubiquitina utilizando el núcleo catalítico de una peptidasa específica de ubiquitina (USP2cc), y obtener N-terminal nativo de la proteína de interés. Las 6 histidinas en tándem (6xHis) facilitan la remoción de la ubiquitina, incluso en condiciones desnaturalizantes, por cromatografía de afinidad por Ni<sup>2+</sup>.

#### 4.2 Inducción de la expresión proteica

La inducción de los cultivos de *E.coli* transformados con el plásmido con la construcciones se realizó con IPTG 0.01 mM (ver Métodos) por 4 h a 37 °C. En geles de SDS-PAGE se observó una banda migrando como de 24 kDa, peso molecular esperado (Figura P1.5). El uso de mayores concentraciones de IPTG no mostró un aumento significativo de rendimiento de expresión a las 4h. La proteína de fusión se observó sólo en la fracción de pellet, en forma insoluble a condiciones suaves (sin agentes caotrópicos ni reductores). Las pruebas de sobre-expresión a menores temperaturas no resultaron en una banda en la fracción soluble en geles de SDS-PAGE y tampoco se vio banda purificada al ser pasada esta fracción por columna de afinidad por Ni<sup>2+</sup>. También se estudió la posibilidad de una renaturalización durante el proceso de expresión *in vivo* al co-expresar la proteína de fusión con chaperonas dnaK, dnaJ, grpE o chaperonas groES and groEL, o bien las cinco al mismo tiempo, utilizando el vector plasmídico pG-KJE8, ya sea en cepa BL21 (DE3) o en la cepa deficiente en reductasas Origami (DE3) a diferentes temperaturas. Esto no mostró diferencias notables respecto del protocolo usual en BL21 (DE3) y tampoco hubo una apreciable purificación de banda a partir de sobrenadante en ninguna de las condiciones probadas.



**Figura P1.5. Gel SDS-PAGE 12% de pellets de homogeneizado bacteriano post inducción con IPTG.** La flecha indica la banda de sobre-expresión proteica para el caso de cultivo con IPTG (0.01mM, 4h a 37°C). El carril C- es una fracción del mismo cultivo sin agregado de IPTG, incubado en las mismas condiciones. El peso aparente de la banda proteica es entre 25 y 27 kDa. M: es marcador comercial Rainbow (GE).

#### 4.3 Renaturalización, corte con peptidasa y actividad

Los cuerpos de inclusión se lavaron, disolvieron y renaturalizaron, usando la estrategia usual para otras sPLA<sub>2</sub>s expresadas en *E. coli* (ver Métodos). La renaturalización consistió en dializar la solución proteica en desnaturalizante (limpia de agente reductor) contra una solución a pH básico con L-cisteína para promover la oxidación y formación de puentes disulfuro en concentraciones bajas de desnaturalizante (Gdn.HCl 0.6M o urea 2M) en. El corte con peptidasa se probó en la solución post diálisis, así como también en una solución de proteína de fusión que fue diluida en forma rápida contra urea 2M o guanidinio 0.6M. No hubo una diferencia notable en la eficiencia del corte de la peptidasa, si bien sí se observó gran cantidad de proteína agregada en la dilución rápida. Por esta razón se prefirió la opción de renaturalización seguida de corte con peptidasa y pasaje por columna de afinidad para el protocolo rutinario. La otra opción fue el corte con peptidasa acoplado a una dilución rápida, seguido de un segundo paso de desnaturalización, pasaje por columna de afinidad en las mismas condiciones y renaturalización final. La presencia en el *buffer* de diálisis de L-cisteína, usado como reactivo de intercambio de disulfuros, permitió obtener actividad en forma reproducible.

Luego del paso de diálisis, la porción soluble de proteína de fusión no mostró actividad (Figura P1.6, pocillo C1G). La actividad de hemólisis indirecta por PLA<sub>2</sub> se detectó en cambio en la alícuota tratada con peptidasa deubiquitinante USP2cc (1G). Curvas de concentraciones crecientes

de desnaturalizante mostraron que esta peptidasa es activa al menos hasta urea 2M o Gdn.HCl 1 M (no mostrado). Cuando la solución con actividad que había sido incubada con peptidasa se corrió en geles sin reductor ( $\beta$ ME), no se observó la banda de proteína de fusión, lo que sugiere que esta, no digerida, estaba formando parte de un agregado multimérico conectado por puentes disulfuro.. La presencia de  $\beta$ -ME hasta 250 mM no afectó drásticamente la actividad de USP2cc luego de 3h a 37°C de incubado con proteína de fusión (no mostrado).

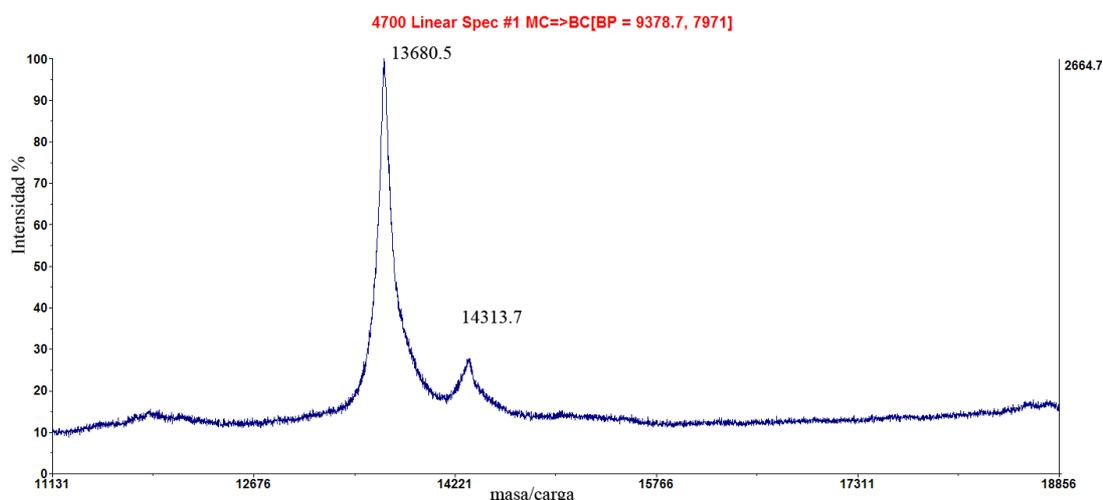
Luego de incubar con peptidasa USP2cc, se hizo un segundo pasaje de purificación pasando por resina con  $Ni^{2+}$  para retener la peptidasa y ubiquitina marcada.



**Figura P1.6 Análisis por SDS-PAGE de proteína de fusión pre y post corte, detección de actividad y limpieza por IMAC. Izquierda:** muestra solución de proteína de fusión post solubilización y diálisis incubada con peptidasa (carril +USP2c) y su control negativo (C-). M marcador de peso molecular (Benchmark). La flecha vertical muestra la banda atribuida a sPLA<sub>2</sub>-I, mientras que la horizontal al residuo N-terminal que contiene ubiquitina. **Centro:** foto de placa de Petri del ensayo de hemólisis indirecta, 15  $\mu$ L de solución por pocillo. 1G, (flecha vertical) solución con proteína de fusión con peptidasa, C-1 control sin peptidasa. En C-3 se sembró la solución de renaturalización con peptidasa sin proteína de fusión, y en Panc se depositó 15  $\mu$ g de sPLA<sub>2</sub> pancreática porcina como control positivo. **Derecha.** Gel SDS-PAGE de la fracción no retenida por columna de afinidad de  $Ni^{2+}$ . IMAC.

## 5. Confirmación de secuencia y extremo N-terminal por espectrometría de masas

Se determinó la masa molecular total de las proteínas recombinantes con la metodología de MALDI-TOF, obteniéndose valores acordes a los teóricos de proteínas con sus cisteínas formando cistinas para ambas isoformas. Las masas moleculares medias esperada para *Bd* sPLA2 I y II serían de 13651.3 Da y 13621.2 Da respectivamente. La diferencia entre ellas está en el límite del error de la determinación por el equipo MALDI en modo lineal (TOF) utilizado. En la figura siguiente se ejemplifica un espectro lineal para la isoforma sPLA<sub>2</sub> -I

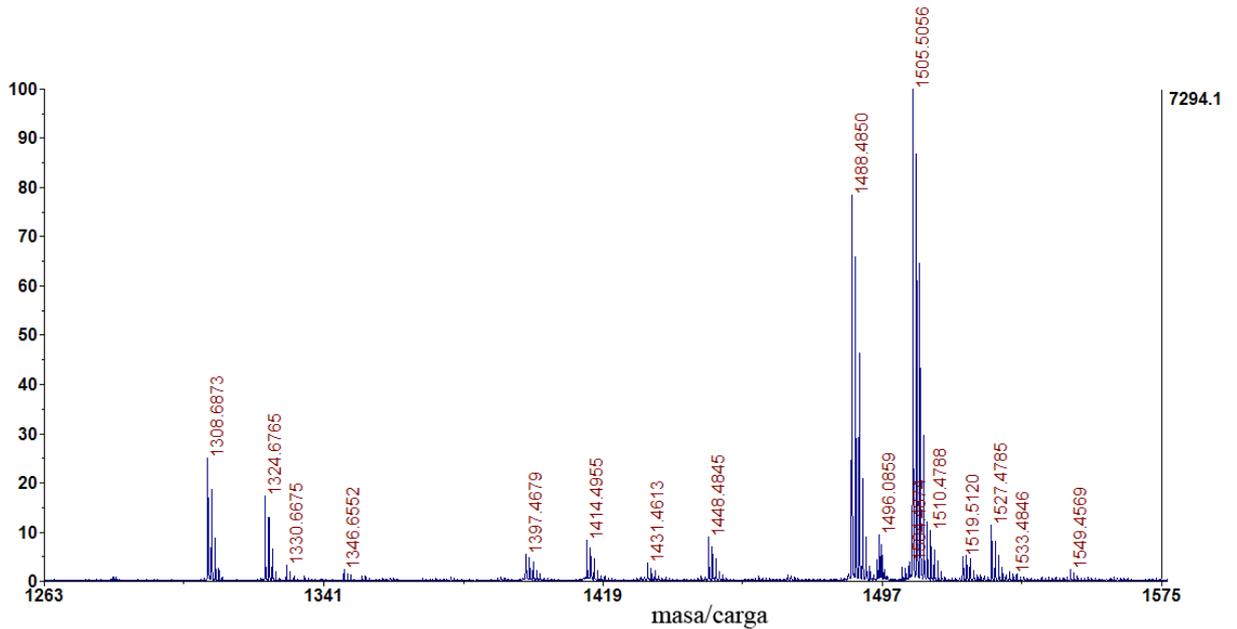


**Figura P1.7. Estimación de la masa molecular proteica, ejemplo con *Bd* sPLA2 I.** La relación masa/carga promedio de la proteína recombinante *Bd* sPLA2 I +1 H<sup>+</sup> calculada es 13666.3, con sus 14 cisteínas en puente disulfuro (7 cistinas) sería de 13651.3. La observada es  $13681 \pm 15$  (error calculado como ancho a la mitad del pico). Si se considera que la única metionina es sensible de oxidación (confirmado por MS/MS, ver abajo) coincidiría con la masa esperada. Se observa un segundo pico a 14313.7 no explicado. En ocasiones, se observó también un pico a  $9379 \pm 52$ . Este pico podría corresponder al ión del fragmento de ubiquitina con cordón alternativo, cuya relación carga masa calculada sería de: 9198.55 (ver texto para más detalles).

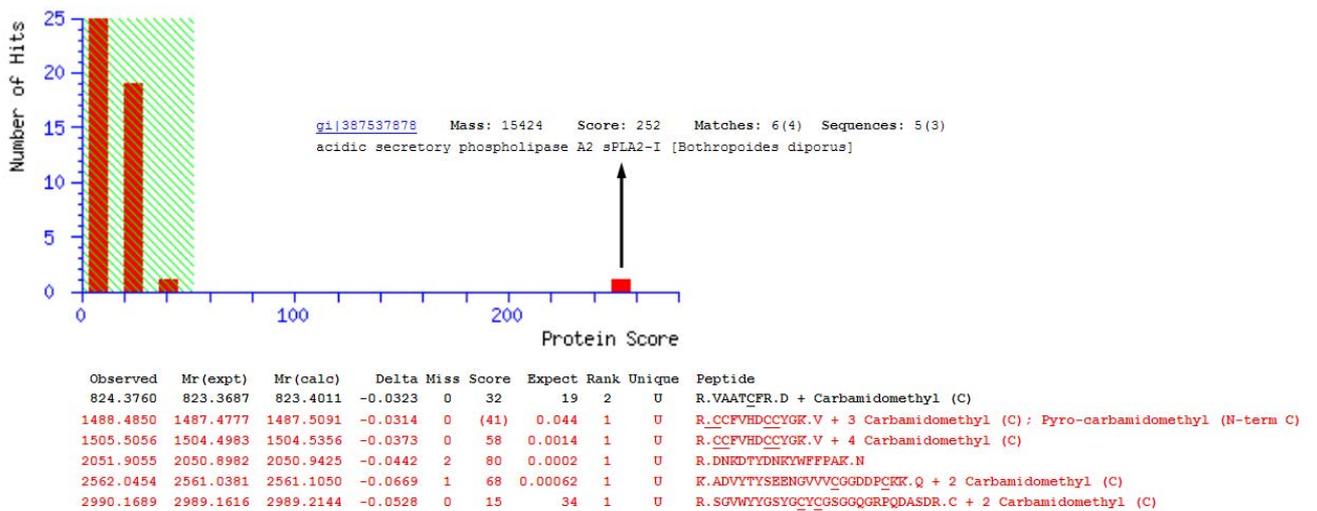
Para confirmar que la peptidasa específica de ubiquitina haya generado el corte y secuencia esperados, se hizo un análisis por espectrometría de masas de una digestión triptica de las dos isoformas recombinantes (ver Parte 2 para detalles), de tal forma de obtener una huella peptídica y seleccionar péptidos para su fragmentación (MS/MS). Así se identificaron los péptidos N-terminal de ambas isoformas, lo que sumado a la evidencia de actividad en monocapas (considerando el requerimiento estricto de un N-terminal nativo de estas enzimas), constituyen pruebas que la peptidasa fue específica.

A

4700 Reflector Spec #1 MC[BP = 2052.9, 8665]



B

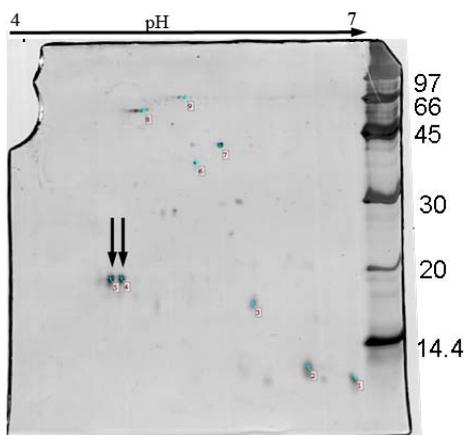


**Figura P1.8** Región diagnóstica de N-terminal de *Bd* sPLA2 I, espectrometría de masas MS/MS. **A:** Ampliación de la huella peptídica post tripsina de la proteína previamente reducida y carbamidometilada. Se observan varios fragmentos correspondientes a iones de péptidos tripticos. **B:** asignación estadísticamente significativa con el servidor Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) de los péptidos de mayor intensidad. Se corroboraron varios manualmente. A su vez, los péptidos ya asignados se inspeccionaron visualmente sus fragmentaciones. Los de relación masa/carga 1308.68 y 1324.67 corresponden al N-terminal SLVQFETLIMK sin modificar, y oxidado en su metionina (+16 Da), respectivamente. Otros asignaciones se informan en la tabla 2.1 de la Parte 2 de esta tesis.

Para *Bd* sPLA<sub>2</sub> I se obtuvieron muy buenas fragmentaciones para diversos péptidos, observándose entre otros, los péptidos de 1308.68 y 1324.67 Da que corresponden al N-terminal SLVQFETLIMK (Figura P1.8). En forma similar, para *Bd* sPLA<sub>2</sub> II se observó el péptido 1351.8 correspondiente a NLVQFETLIMK (M oxidada)

### 6. Gel 2D de proteína recombinante *Bd* sPLA<sub>2</sub>-I

También se llevó a cabo el análisis por gel 2D para confirmar el punto isoeléctrico de la proteína recombinante *Bd* sPLA<sub>2</sub>-I, obteniéndose el valor próximo al esperado. Sin embargo, no se observó sólo 1 punto sino 2 (Figura P1.9), con intensidad similar y patrón de fragmentación idéntico. La diferencia podría deberse a alguna modificación post-traducciona sencilla como una deamidación de glutamina a ácido glutámico en un péptido pequeño fuera del rango medido con el equipo. Si fuese este el caso, la diferencia sería de +1Da, pero se observaría claramente sólo si el péptido es mayor a 600 Da, donde no hay interferencia con matriz de MALDI.



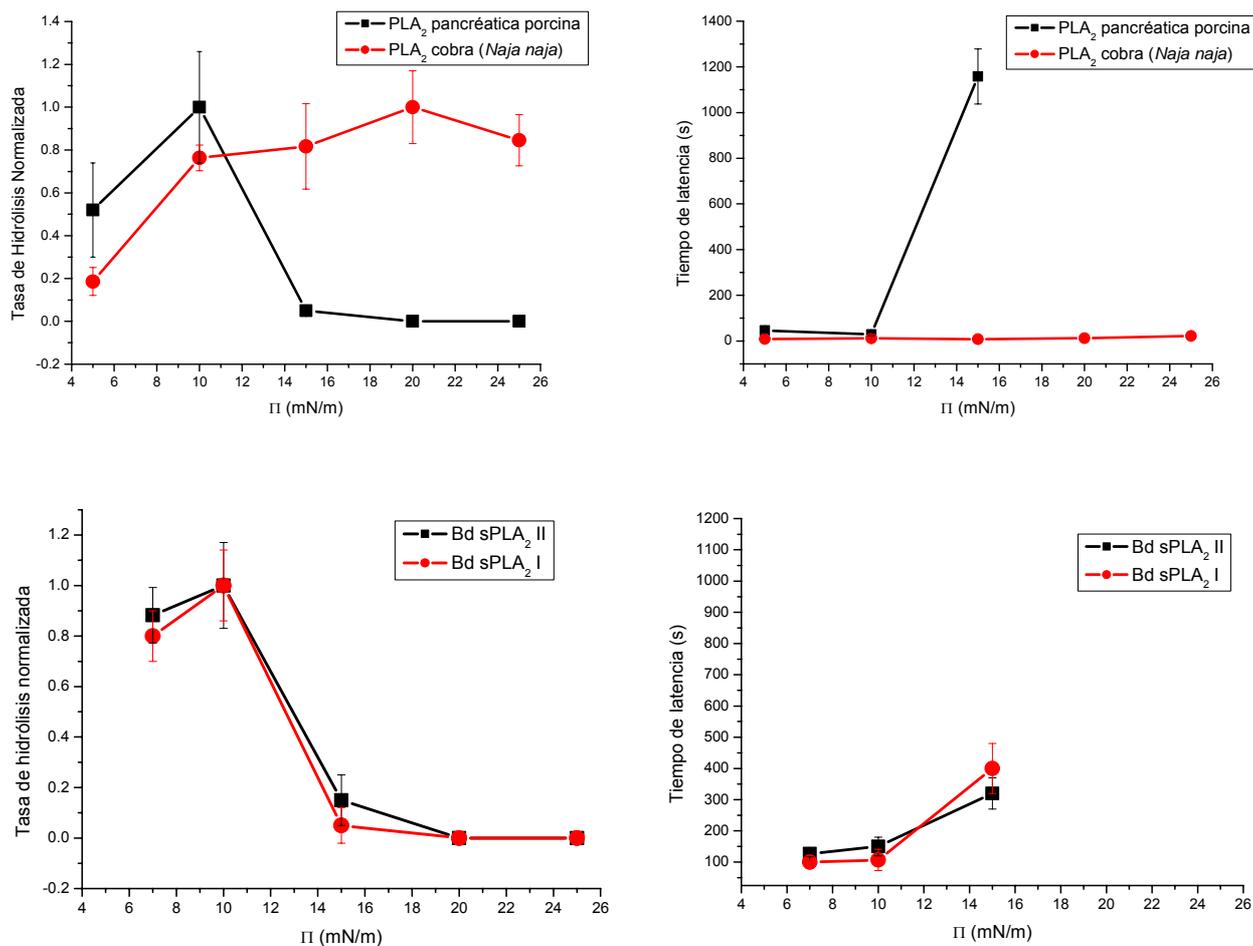
**Figura P1.9. Isoelectroenfoque seguido de SDS-PAGE (Gel 2D) para la muestra *Bd* sPLA<sub>2</sub> I.**

Con flechas se indican dos puntos nítidos con la misma posición vertical (tamaño) y diferente posición vertical (punto isoeléctrico). Estos dos puntos junto con otros 6 se analizaron por espectrometría de masa, obteniéndose sólo buena fragmentación para los indicados con las flechas. Tuvieron huellas peptídicas idénticas. La diferencia puede deberse a una modificación post traduccional lábil al tipo de ionización MALDI.

## 7. Perfiles de actividad de fosfolipasas en monocapas de DLPC

Dado que uno de los objetivos del trabajo fue explorar la relación entre estructura de las sPLA<sub>2</sub> y su relación con su capacidad de hidrólisis de fosfolípido con distinto empaquetamiento (densidad superficial) en monocapas, se midió la actividad de las dos proteínas recombinantes usando monocapas de DLPC a cuatro diferentes presiones laterales ( $\Pi$ ). La técnica de monocapas de Langmuir acoplada a una balanza permite medir y controlar la densidad superficial del lípido, incluso mantenerla constante (técnica del barostato, ver Introducción, pág. 36). Las velocidades medidas y los tiempos de latencia hasta alcanzar linealidad (*lag times*) se resumen en la Figura P1.10. Para comparar, se construyó el mismo perfil para sPLA<sub>2</sub> de veneno de cobra (*Naja naja*) y de sPLA<sub>2</sub> de páncreas porcino. Se comprobó también que ambas enzimas anulan su actividad en presencia de EDTA (no mostrado), lo que es esperable si se considera que el Ca<sup>2+</sup> es esencial para la actividad. La presión lateral óptima para hidrólisis de ambas proteínas recombinantes es similar a las denominadas P-1 y P-2, purificadas de veneno (Daniele y col. 1995).

Como se esperaba para este tipo de enzimas, el tiempo de latencia sigue una tendencia inversa respecto al perfil de velocidad de hidrólisis vs  $\Pi$  (Figura P1.10, paneles a la derecha). Como control, también en monocapas, se chequeó que no hubiera actividad en la solución de peptidasa USP2cc y tampoco se vio actividad interfásica con el agregado de la proteína de fusión sin cortar (este resultado tiene un peso estadístico enorme por la cantidad de pruebas de renaturalización con resultados negativos de actividad por esta técnica) en las cantidades usuales (es decir, el valor de  $\Pi=10$  se mantenía constante, llegándose a esperar 45 minutos sin cambios apreciables).



**Figura P1.10. Tiempos de latencia y perfiles de velocidad de hidrólisis de DLPC vs.  $\Pi$ .** En los paneles superiores se indica a la izquierda el perfil de velocidad para enzimas control (de veneno de *Naja naja* y de páncreas porcino) y a su derecha los tiempos de latencia. En los paneles inferiores se indica análogamente dichas medidas para las isoformas recombinantes de este trabajo. La subfase consistió en NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM, Tris 10 mM pH=8 (25°C). El compartimento de reacción se agitó con barra magnética. La masa proteica inyectada osciló entre 0.1 y 0.3  $\mu$ g, para concentraciones 2 y 7 nM. La velocidad se informa relativa a la máxima pendiente obtenida. Para el caso de las enzimas recombinantes y páncreas porcino, la velocidad de descenso de área (hidrólisis de DLPC) es nula a 20 mN/m.

## 8. Discusión

La víbora Yarará chica es muy común en el centro-norte de Argentina (de Oliveira y col. 2011). En este trabajo se clonaron dos isoformas de sPLA<sub>2</sub> así como una miotoxina, putativa hasta el momento. Hasta la publicación del trabajo relacionado a esta tesis (Yunes Quartino y col. 2012) no se había informado de una secuencia completa de fosfolipasa secretada (sPLA<sub>2</sub>) de esta especie.

Es esperable que existan cerca de una decena de sPLA<sub>2</sub> diferentes para una especie de serpiente (Kini 2003) lo que implica cierto grado de incerteza en la homogeneidad de las isoformas purificadas a partir de veneno usando los procedimientos cromatográficos convencionales. Esto es así porque el veneno liofilizado con que se trabajó proviene usualmente de distintos individuos, ya que su uso primordial es la generación de suero anti-ofídico. Para superar esto se planeó poner a punto un protocolo de expresión recombinante a partir de las secuencias clonadas. El objetivo final del trabajo fue iniciar el estudio fino de la estructura de la enzima en relación a su capacidad de hidrolizar DLPC a alta presión lateral en monocapas.

La estrategia elegida fue exitosa, y permitió obtener la amplificación de ADNc esperada. Las bandas amplificadas tanto del ARNm como del ADNg (incluyendo también la amplificación parcial usando el oligo 2) migraron de acuerdo al tamaño esperado lo que sugiere que la estructura del gen de *Bothrops diporus* es la misma que la de otros miembros de la sub-familia *Crotalinae*, como la de las víboras sobre la cual se diseñaron los oligos, una del sur de India (*Trimeresurus gramineus*) y de la isla japonesa de Okinawa (*Trimeresurus flavoviridis*). Así, nuestros resultados son otra evidencia a favor de la hipótesis que la forma de evolución de estas toxinas está conservada en las especies de la sub-familia *Crotalinae*. Existe una gran divergencia (evolución acelerada) en la porción codificante de la proteína, mientras que la variabilidad en las porciones no codificantes (intrones incluyendo regiones UTR) para proteína del ARNm (Nakashima y col. 1995) es mucho menor (entre 1/8 y 1/3) y muy similar a regiones codificantes de proteínas no consideradas parte de veneno. Se debería secuenciar los genes completos de estas proteínas de *Bothrops diporus* para corroborar la hipótesis de los autores japoneses. Además, en este trabajo se logró la amplificación de una banda del tamaño esperado para el gen completo utilizando el oligo 1 (F) y oligo 4 (R) a partir de ADN genómico, si bien no se secuenció.

Se logró establecer un protocolo reproducible de producción de estas enzimas heterológamente. El sistema de expresión utilizado se eligió por la disponibilidad del plásmido codificante para la peptidasa específica de ubiquitina (USP2cc), que no deja ningún aminoácido extra en el aminoácido terminal cuando el motivo de reconocimiento, ubiquitina, está fusionado del lado N-terminal de la proteína de interés. Como se mencionó en la introducción (**La importancia del extremo N-terminal en sPLA<sub>2</sub>s**, pág.29), es crítico que el extremo amino terminal no tenga aminoácidos extra para que la enzima muestre su máxima catálisis interfásial. Puesto que es conocido que la remoción de la metionina inicial puede darse en *E.coli* en forma eficiente sólo cuando el segundo residuo es pequeño y no cargado (Hirel y col. 1989), la asparragina inicial de la clonada *Bd* sPLA<sub>2</sub>-II (N-PLA<sub>2</sub>) podría no ser removida adecuadamente en caso de expresarse sin

marcas. Por otro lado, existía la posibilidad de que la enzima sea tóxica, y una fracción de la proteína expresada con actividad inhibiera la expresión en el cultivo de bacteria huésped. Esto explicaría por qué no se observó sobre-expresión cuando se indujo la *Bd*-sPLA<sub>2</sub>-I (serina inicial, removible por *E. coli*) sub-clonada en un vector sin marcas de fusión pET11a (no mostrado).

Otra característica del sistema usado es la robustez de la marca de 6xHis (6 histidinas en tándem) presente en el motivo ubiquitina y peptidasa, lo que, acoplado a un pasaje por cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC) permite su remoción específica. Esta cromatografía presenta ventajas frente a otras, puesto que es tolerante a altas concentraciones de agentes caotrópicos (urea o guanidinio). Esto último es una condición que *a priori* resultaba conveniente, pues los reportes de sobre-expresión de este tipo de enzimas en bacterias indicaban una gran propensión a presentarse como cuerpos de inclusión, lo que requiere un paso de solubilización / desnaturalización con agentes caotrópicos.

Como desnaturalizante se prefirió el Gdn.HCl puesto que reduce la posibilidad de modificación de la proteína por carbamilación, como podría ocurrir en soluciones concentradas de urea a pH básico (Gerding y col. 1971; Hagel y col. 1971). La presencia de EDTA mejoró el rendimiento de renaturalización presumiblemente al quelar cationes divalentes que catalizan la formación de puentes disulfuro que podrían ser inespecíficos. Otra mejora fue la presentación de la proteína de fusión con sus cisteínas sulfonadas en lugar de reducidas. El proceso de renaturalización, corte y purificación fue notablemente sub-óptimo en cuanto a la recuperación de masa (<5% de masa inicial), sin embargo, fue suficiente para ensayos de actividad y espectrometría de masas. La gran pérdida de masa de proteína se debió mayoritariamente a la formación de agregados intramoleculares por puentes disulfuro. Una vez que se obtuvo actividad, ésta permaneció por meses conservando en pH levemente ácido la muestra líquida en refrigeración a 4-8 °C.

La actividad de hidrólisis en monocapas así como en el ensayo de yema de huevo / agar / sangre se detectaron sólo luego de incubar con la peptidasa la proteína de fusión tratada en el *buffer* de oxidación. El rendimiento de renaturalización fue bajo, nunca se llegó a más del 5% de proteína final soluble, por lo que queda por ser afinado en caso que se requiera mayor cantidad de masa para estudios como calorimetría o intentos de cristalización. Se consideran otras estrategias como expresión en un huésped eucariota, como las levaduras *Pichia pastoris* o *Saccharomyces cerevisiae* en primera medida, por su menor costo respecto de sistemas como células de insecto. El paso de renaturalización con formación de puentes disulfuro en forma correcta es crítico, y si bien las proteínas sPLA<sub>2</sub> poseen la misma estructura se han encontrado enormes diferencias en rendimientos

de renaturalización para enzimas de la misma especie. Por ejemplo, en el caso de las enzimas de ratón del grupo II y III, hubo algunas que no pudieron ser renaturalizadas a partir de cuerpos de inclusión y se recurrió a expresión en células S2 de *Drosophila* (Rouault y col. 2007). Actualmente no hay un método propuesto para predecir el método óptimo de renaturalización y se requiere ensayos de prueba y error. Existe sólo un reporte de expresión soluble de una sPLA<sub>2</sub> en *E. coli* (Yang y col. 2003) y una miotoxina K49 (Seto y col. 2008) a febrero de 2014 en PubMed. Ambos laboratorios recurrieron a la estrategia de proteína de fusión, combinada con enzima tiorredoxina en el primer caso y chaperonas en el segundo. Este último intento se llevó a cabo en este trabajo sin obtener resultados positivos.

Las enzimas recombinantes mostraron actividad lipolítica y se analizó su perfil de velocidad en monocapas de DLPC. *Bd*-sPLA<sub>2</sub> I posee el mismo N-terminal que la isoforma P-3 de alta presión (óptimo próximo a 27 mN/m, Figura I.1) purificada de veneno previamente (Daniele y col. 1997), sin embargo, mostró un perfil de “baja presión” (no se observó ninguna actividad a 20 mN/m). Por degradación de Edman se había visto en ese mismo trabajo que las tres isoformas tenían extremos N-terminal muy similares (Figura I.1 inserto), por lo que existía la posibilidad que existieran diferencias sutiles en la secuencia primaria involucradas en esta capacidad para hidrolizar monocapas de DLPC a alta presión (como P3). No se encontró que las diferencias entre estas isoformas expresadas les confirieran cambios notables en los perfiles de actividad sobre monocapas de DLPC. Existe la posibilidad que las diferencias en la porción no secuenciada de las de veneno fueran mayores. Esto se explora en la Parte 2, a partir de estudios de veneno. Se halló una nueva sPLA<sub>2</sub> clasificable como de “alta presión”, aunque no coincide con la P-3 reportada previamente (Daniele y col. 1997).

Por otro lado, hay que mencionar que existe la posibilidad que las enzimas con la misma secuencia primaria posean diferentes presiones óptimas si tienen alguna modificación post-traducciona l o si la proteína se halla asociada no covalentemente a moléculas pequeñas, como lípidos, que modifiquen su actividad. Esto se observó en caso de lipasas de un hongo (Mateos Diaz y col. 2006; Mateos Diaz y col. 2007) cuyo óptimo dependía del medio de cultivo donde crecía el organismo productor. Además, también con lipasas de origen microbiológico, se observó un efecto también diferencial entre proteína recombinante y nativa (Horchani y col. 2010), descartándose modificaciones como la glicosilación y fosforilación, teniendo la misma masa dentro del error de la técnica utilizada para medirla (MALDI-TOF). Los autores sugirieron una diferencia conformacional, si bien no explicitaron cuál podría ser.

Un control a realizar es la desnaturalización completa de una enzima de alta presión, por ejemplo la P3, o la misma de cobra, y su renaturalización con el protocolo utilizado para las recombinantes, y comprobar si su perfil se recupera. Tenemos estudios preliminares donde se observa un cambio de actividad hacia menores presiones, pero debe ser reproducido en otros ensayos para sacar alguna conclusión. Es necesario también explorar el rango a muy bajas concentraciones de enzimas de alta presión en monocapas, pues podría ocurrir que el perfil de velocidad cambie, o los tiempos de latencia se incrementen mucho. Se está explorando esta posibilidad.

Además, está planteada la síntesis del gen de cobra y su expresión recombinante para verificar su presión lateral óptima en monocapas de DLPC. Curiosamente, no se ha encontrado en la literatura, en especial la del grupo de Dennis, quien trabaja con sPLA<sub>2</sub> de cobra y la ha expresado en forma recombinante, datos sobre el perfil de velocidad en monocapas y su comparación con la nativa purificada de veneno.

## **Parte 2. Análisis a partir de veneno. Secuencia de fosfolipasas de *Bothrops diporus* a nivel de proteína.**

### **1. Objetivo**

Obtener mayor información de secuencia a nivel de proteína, extraída de veneno, y corroborar la presencia de la secuencia deducida de los ARNm clonados a partir de glándula de veneno.

### **2. Resumen**

Se simplificó el procedimiento de aislamiento de las isoformas empleado originalmente por Daniele, eliminando el paso inicial de fraccionamiento por Sephadex G50, colección de picos, diálisis y liofilización.

El protocolo general consistió en pasar una disolución de veneno por una columna de exclusión molecular y analizar la actividad sPLA<sub>2</sub> de las fracciones eluidas. La mayor actividad a alta presión (20 mN/m) fue eluida primero (menor volumen de elusión) mientras que las de actividad casi nula a 20 mN/m eluyeron después. Hecho esto, el paso siguiente fue un pasaje por columna de intercambio aniónico.

Las fracciones finales con actividad, se analizaron por electroforesis SDS-PAGE. Se extrajeron las bandas proteicas y se las sometió a digestión con tripsina para su análisis por espectrometría de masas. Se obtuvo información de secuencia peptídica que confirma la presencia en veneno de las isoformas clonadas y expresadas (Parte 1). Aparecen en la zona dimérica y monomérica de la exclusión molecular. Las fracciones de la zona dimérica de la cromatografía poseen actividad notable a presiones laterales de 20 mN/m en monocapas de DLPC, mientras que las fracciones con actividad fosfolipasa de la zona monomérica tienen una actividad muy reducida a 20 mN/m.

Se describen además, porciones de secuencias que corresponderían a una nueva fosfolipasa, hallada sólo en la región dimérica.

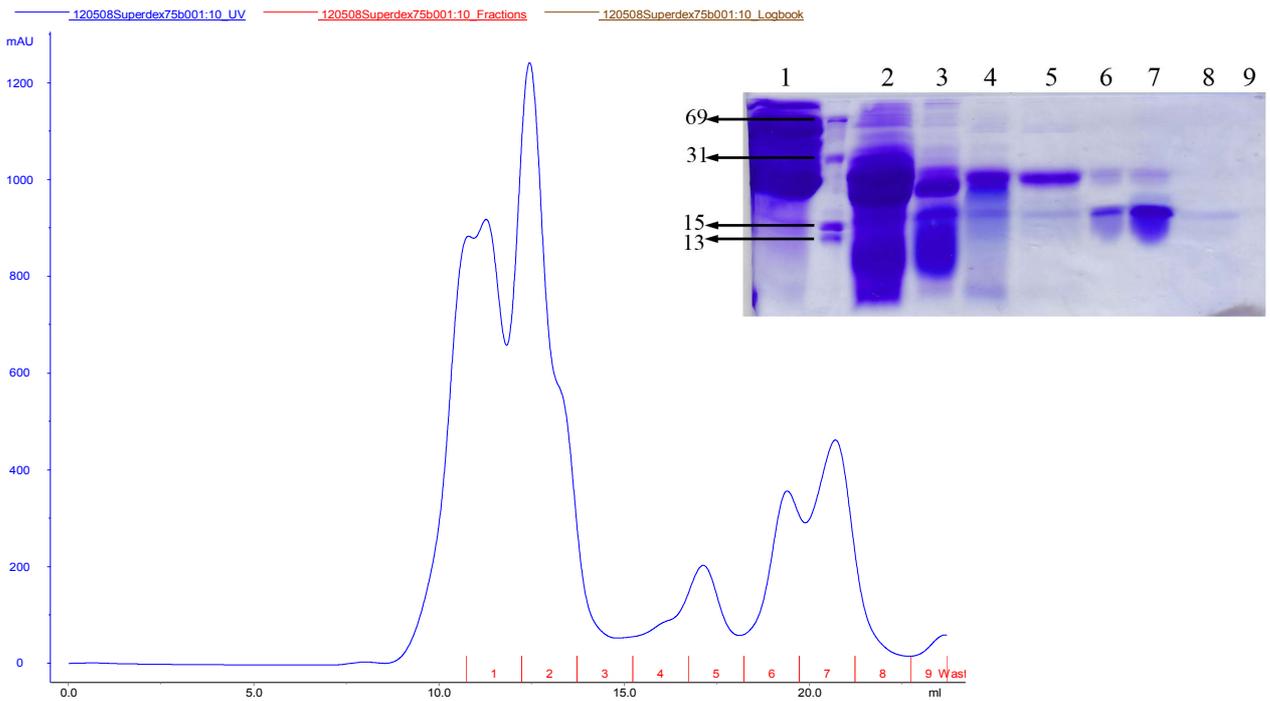
### 3. Exclusión molecular de componentes del veneno

El principio de separación de las columnas de exclusión molecular o filtración por gel, es el tamaño de la partícula (por ejemplo, proteínas) definido como su radio hidrodinámico. A mayor radio hidrodinámico la partícula tiene menor volumen disponible para difundir por la matriz del gel y por lo tanto es eluída a tiempos más cortos que si fuera una partícula de menor radio hidrodinámico.

El protocolo original de (Vidal y col. 1971) consistía en excluir las proteasas de alto peso molecular en un paso de cromatografía de filtración molecular (Sephadex G-50) a pH ácido (4.5), donde la actividad PLA<sub>2</sub> (medida por retardo de coagulación de yema de huevo) se correspondía sólo con un pico de absorbancia (280 nm). El segundo paso era una cromatografía del mismo tipo, con un tamaño de poro menor (Sephadex G25) y a un pH levemente básico (7.6) donde se observaban dos picos con actividad PLA<sub>2</sub>. La capacidad de dimerización diferencial a pH levemente básico parece ser una característica de las fosfolipasas de veneno de crotálicos (Welches y col. 1985). El paso final era un intercambio aniónico. El protocolo usado por Daniele (Daniele y col. 1997; Daniele y col. 1995) fue esencialmente el mismo.

En este trabajo se omitió el pasaje inicial por la primera columna de exclusión molecular. Así, el primer paso fue disolver el veneno en medio ácido (pH=4.5) y aplicarlo directamente a la columna de exclusión molecular a pH=8 (Figura P2.1) . Se recogieron fracciones de 1.5 mL.

A continuación se ensayó cada una de las fracciones en placas de agar / yema de huevo / sangre, incubando a 37 °C por varias horas. No se observó halo indicativo de actividad fosfolipasa para muestras del volumen anterior a la fracción 1. Sí se observó halo tenue en la fracciones 1 y 2, y halos de mayor diámetro (3 a 4 veces mayor) para fracciones 3, 4 y 5. Finalmente, para las demás fracciones también se observó un halo pero de menor diámetro. Este paso fue un primer análisis ya que se pudo hacer en sólo unas horas. Luego se llevó a cabo el análisis en monocapas, que requirió más tiempo (4 días).



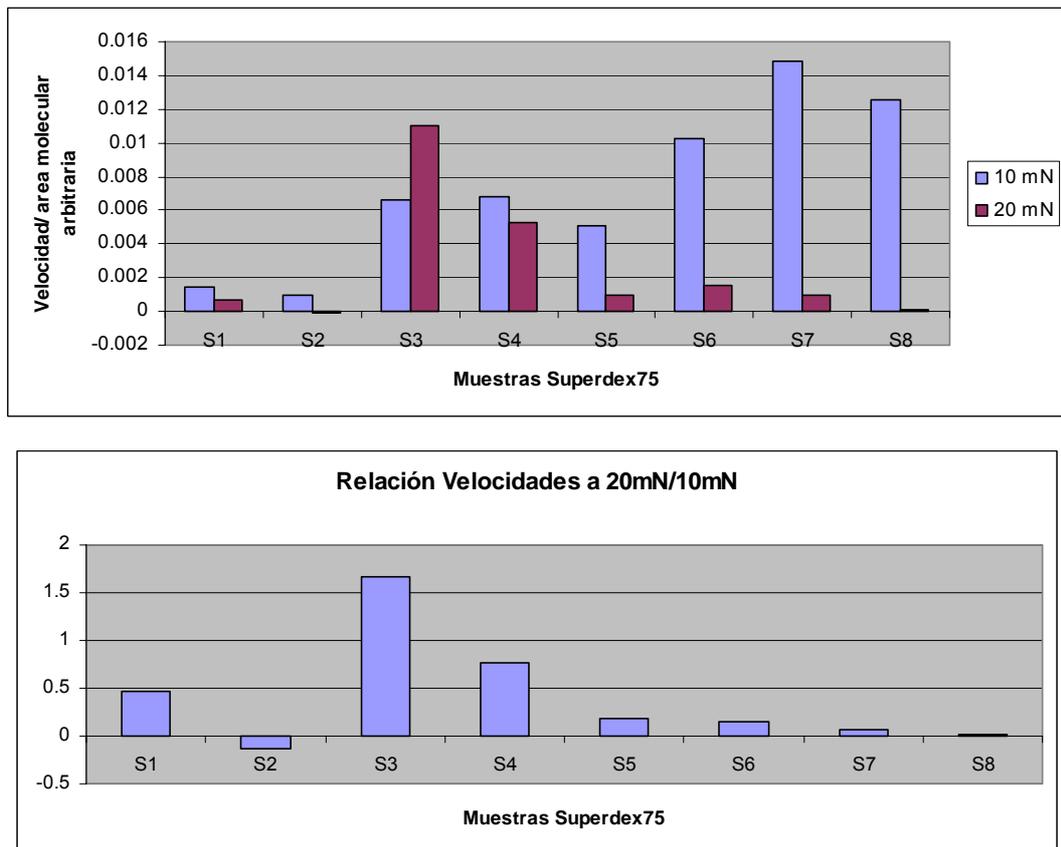
**Figura P2.1. Cromatograma de exclusión molecular de veneno total.** 400  $\mu$ L de veneno 20mg/mL por Superdex 75, a 0.4 mL/min. Las fracciones colectadas (1.5 mL cada una) se indican con números sucesivos en la parte inferior. La imagen de gel teñido con Azul Brillante de Coomassie corresponde a SDS-PAGE sin reductor de las 9 muestras concentradas. Las flechas indican los pesos esperados en kDa de las bandas del marcador molecular.

Las fracciones 2 y 3 presentaron bandas proteicas que migraron como con un tamaño menor al esperado por su posición en el cromatograma en geles SDS-PAGE. Esto es un indicio de asociación intermolecular no covalente o un volumen hidrodinámico mayor debido a otra causa. Por bibliografía y el pH al cual se corrió, se asume que son sPLA<sub>2</sub> en estado dimérico (Vidal y Stoppani 1971; Welches y col. 1985). El SDS en el gel podría ser el motivo por el cual se observan por separado estos componentes de bajo peso molecular en fracciones tempranas (2 y 3).

Las bandas mayoritarias de las fracciones 6 y 7 se asignan a fosfolipasa, y podría presumirse que las bandas con la misma migración que se ven en las otras fracciones podrían estar principalmente compuestas por fosfolipasa. Esto se apoya en el tamaño esperado de las sPLA<sub>2</sub> desnaturalizadas tipo II y también en medidas de actividad.

#### 4. Análisis de actividad por monocapas de todo el cromatograma

Sembrando el mismo volumen para cada fracción, se midió su actividad sobre monocapas de DLPC con el método del barostato a dos presiones laterales, 10 mN/m y 20 mN/m. La actividad a 10 mN/m tiene una relación directa con la cantidad de proteína en la banda de 14 kDa (donde se esperan las fosfolipasas)



**Figura P2.2. Superior: velocidad de hidrólisis a dos presiones laterales para las fracciones de veneno por exclusión molecular.** Velocidades en unidades de área arbitraria/segundo de hidrólisis de monocapas de DLPC a 10 mN/m o 20 mN/m. 1 unidad de área: 34 cm<sup>2</sup>. La velocidad a 10 mN/m tiene una buena correlación con la cantidad de enzima cuantificada por densitometría de banda de 14 kDa en gel SDS-PAGE teñido con Coomassie (estándar de albúmina sérica bovina). **Inferior: relación de velocidad a 20 mN/m respecto de velocidad de hidrólisis a 10 mN/m para cada fracción.** Se observa que la fracción S3 contiene la mayor actividad relativa a 20 mN del cromatograma. S2 da valor negativo debido a leves diferencias de líneas de base pre inyección (no hay actividad).

En vista de la Figura P2.2, se define como actividad fosfolipasa de “alta presión” a la preparación que presenta hidrólisis de DLPC en monocapas con un cociente entre velocidades de hidrólisis de 20 mN/m y 10 mN/m igual o mayor a uno.

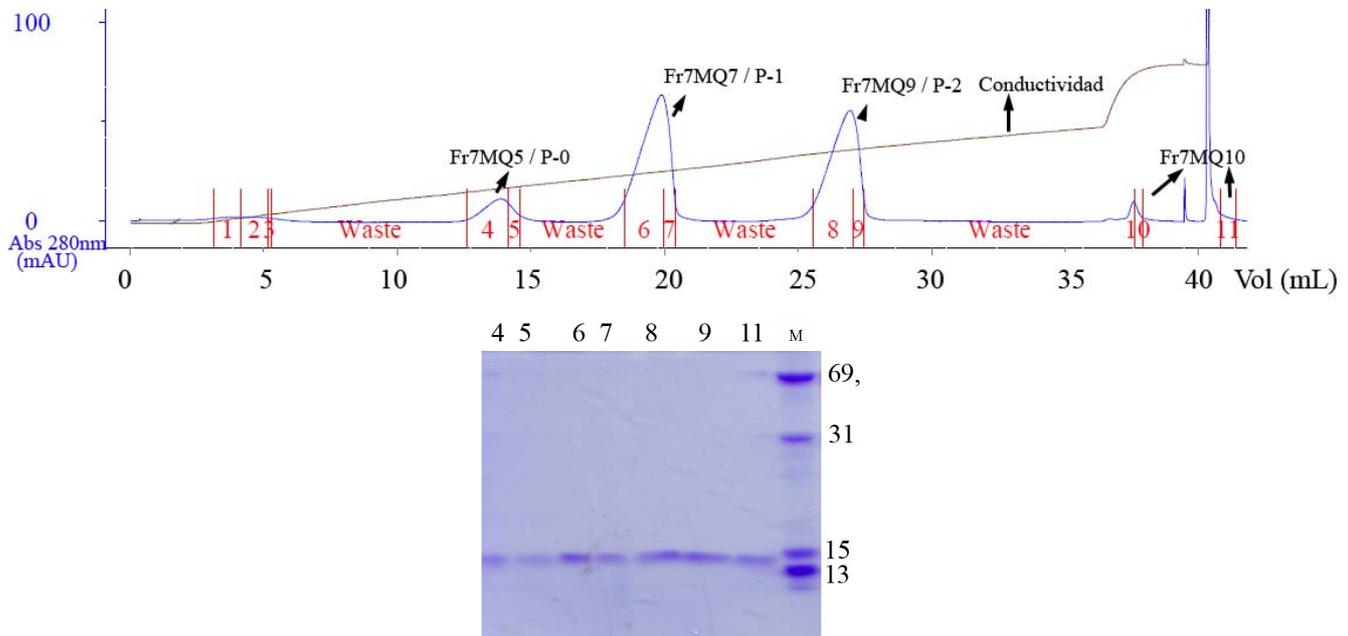
$$\frac{V_{20mN/m}}{V_{10mN/m}} \geq 1 \quad \text{Actividad de alta presión}$$

Por extensión, aquí se denomina PLA<sub>2</sub> de “**alta presión**” a aquellas enzimas presentes en la fracción S3 y análogamente como de “**baja presión**” a aquellas fosfolipasas halladas en la fracción S7 (post Superdex 75) de veneno total, fracción que junto a S8 presentaron la menor relación de hidrólisis a 20 mN/m y 10 mN/m (Figura P2.2, panel superior). Se insiste en el uso de comillas para estos términos como recordatorio que es una denominación no estricta, y acotada a las observaciones con este sustrato en particular, DLPC, presentado en forma de monocapas.

A partir de estos resultados se decidió trabajar con las fracciones S3 y S7 y tratar de obtener mayor pureza de su componente fosfolipasa. Para esto se procedió a intercambio aniónico por una columna Mono Q como en el protocolo previamente usado en el laboratorio (Daniele y col. 1997; Daniele y col. 1995).

### 5. Aislamiento de isoformas “baja presión”

Tras una cromatografía de intercambio aniónico, se obtuvieron picos bien separados y definidos (Figura P2.3, superior).

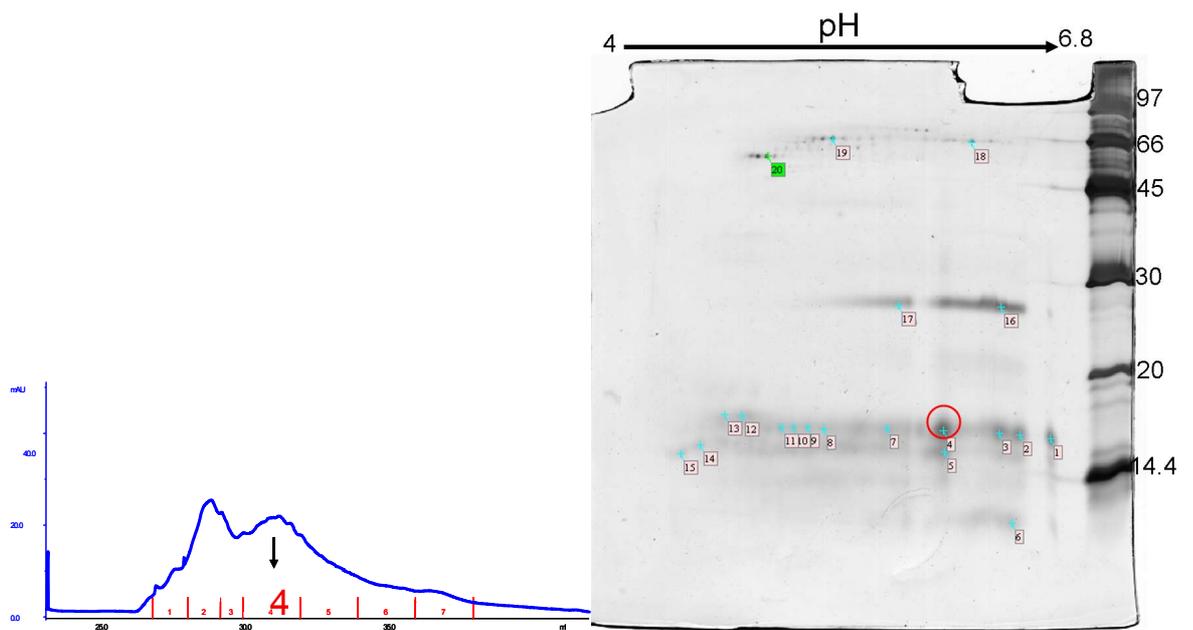


**Figura P2.3. Panel superior: cromatograma de intercambio aniónico de fracción 7 proveniente de exclusión molecular (PLA<sub>2</sub> baja presión). Los números entre barras verticales indican las fracciones recogidas, La flecha indica el nombre de las fracciones analizadas por espectrometría de masa. Panel inferior: Gel SDS-PAGE sin reductor de muestras post intercambio aniónico de fracción 7 (baja presión).**

Estas fracciones fueron sembradas sin reductor en un gel SDS-PAGE. Se observa un peso molecular aparente próximo a 15 kDa para todas las fracciones con muy buen grado de pureza, coherente con lo esperado para sPLA<sub>2</sub> monoméricas del tipo II. Las fracciones impares fueron sujetas a tripsinización y espectrometría de masas MALDI-TOF TOF.

## 6. Aislamiento de isoformas “alta presión”

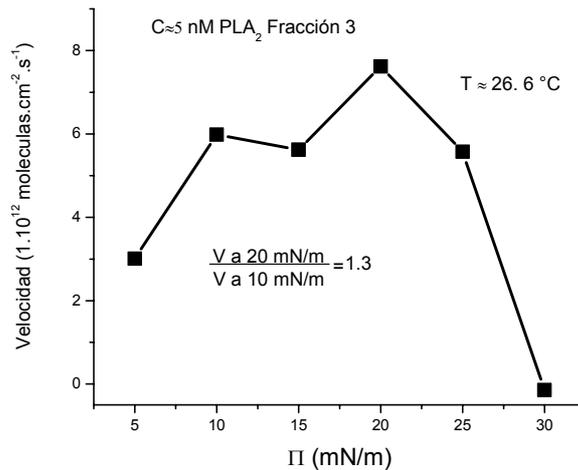
Para el caso de sPLA<sub>2</sub> de la fracción S3 (zona dimérica, actividad a “alta presión”), existió variabilidad en la definición de los picos, observándose en algunos casos gran cantidad y en otros (otro lote de veneno) una zona sin picos bien definidos, pero con gran actividad a alta presión. Para este último caso, se optó por añadir una dimensión más de separación, el punto isoelectrico, previo a separación por tamaño (SDS-PAGE). Por esto se hizo un gel 2D con la fracción 4, que mayor actividad presentaba (Figura P2.4)



**Figura P2.4.** Izquierda. Cromatograma de intercambio aniónico de muestra S3. La fracción 4 presentó actividad a alta presión (20 mN/m). Derecha. Gel 2D de muestra 4. Tinción de plata. Se observa gran cantidad de puntos. La mayoría de éstos fueron tratados para analizar su contenido proteico por espectrometría de MALDI-TOF TOF, siendo el marcado con un círculo el que presentó mejor fragmentación y características de secuencia de sPLA<sub>2</sub>. La zona de movilidad mayor a 45 kDa es keratina humana, se observó en otros gels 2D.

### 6.1 Perfil hidrolítico de una nueva PLA<sub>2</sub> en fracción de alta presión

Se construyó el perfil hidrolítico de esta fracción S3 (Figura P2.5), confirmando que es de alta presión. Sin embargo el óptimo no está localizado en 27 mN/m, sino en 20 mN/m. Esto puede ser porque se trate de otra enzima, o bien porque los lípidos usados en el estudio original no hayan sido lo suficientemente puros (posiblemente por hidrólisis, la presencia de ácido graso, por su carga negativa, aumenta tanto el valor óptimo de  $\Pi$  como el valor máximo donde hay hidrólisis).



**Figura P2.5. Perfil de velocidad en función de  $\Pi$  de muestra de fracción S3.** Se observa que no se corresponde con P-3 reportado por Daniele (1997, Figura I.1, ver Introducción), sin embargo sí es una PLA<sub>2</sub> de alta presión

### 7. Análisis de secuencia por espectrometría de masas

El equipo utilizado en este trabajo fue un MALDI-TOF-TOF (Figura I.12). Las muestras fueron reducidas y desnaturalizadas, para posteriormente bloquear sus cisteínas por alquilación con iodoacetamida (IAA, Figura P2.6) para evitar su re-oxidación a puentes disulfuros. Este proceso permitió obtener mayor cantidad de péptidos al desnaturalizar la proteína de tal forma que la tripsina tiene los sitios de corte más accesibles. Además la alquilación con IAA añade 57 Da de masa, lo que también contribuye a la asignación. Esto se tradujo en una cobertura de secuencia del 100% de las isoformas clonadas. Alternativamente se procedió a incubar de la misma manera las bandas extraídas del gel luego de la corrida electroforética. Además, en algunos casos al incubar con exceso de iodoacetamida, reactivo usualmente específico para cisteínas, se modificaron también los aminos libres, como en el N-terminal y el de la cadena lateral de lisina, y las metioninas

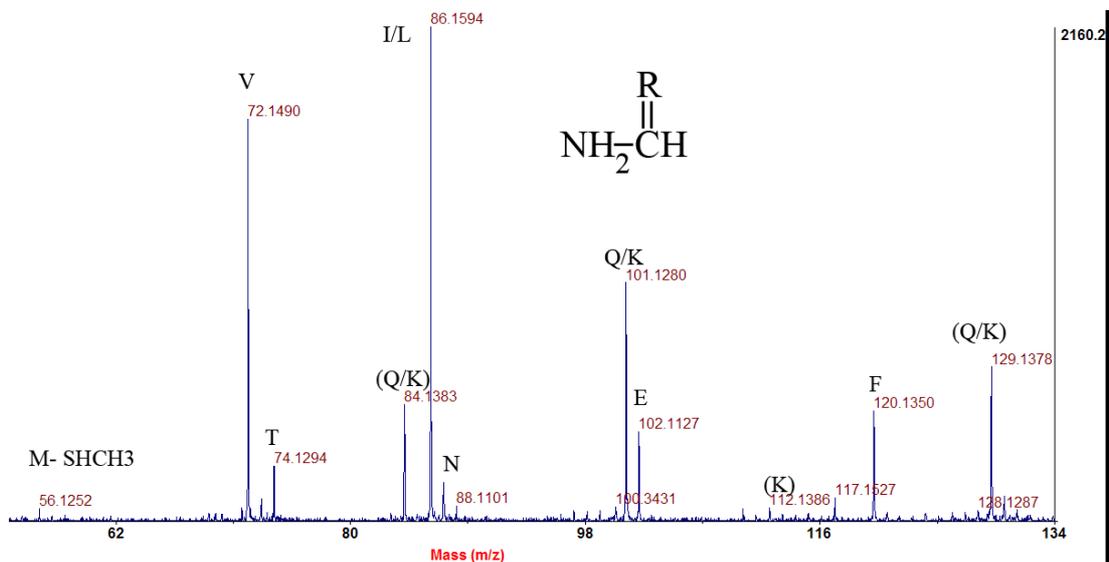


conserva ni el N-terminal como en los b, ni el C-terminal como en los y), pudiéndose así explicar la mayoría de las masas observadas.

Los **residuos isobáricos** (misma masa molecular) leucina (L) e isoleucina (I), no pueden ser distinguidos por la técnica empleada. De la misma forma, la diferencia que existe entre glutamina (Q) y lisina (K), al ser de 0.05 Da, está en el límite de sensibilidad del equipo y es arriesgado asignar una u otra. En estos casos, para asignar L o I se recurrió a búsqueda en base de datos de proteínas (NCBI nr), tanto con el servidor BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) o el servidor MS-BLAST (<http://genetics.bwh.harvard.edu/msblast/>). Este último hace una búsqueda contra la base de datos de NCBI pero considerando los residuos isobáricos como idénticos, lo que permite obtener mejores detecciones.

Para los péptidos con muy buenas fragmentaciones, se hizo búsqueda MS/MS en servidor Mascot, aumentando la posibilidad de fallos de corte de tripsina hasta 2. A su vez, se analizó manualmente la secuencia.

El corte óptimo de la tripsina se da del lado carboxilo de la arginina (R), excepto cuando está precedida por prolina (P). Con menor eficiencia corta también lisinas (K)..



**Figura P2.7. Ampliación de la zona de baja relación masa/carga de la fragmentación del péptido 1287.8.** Se observan los iones imonio y su asignación característica. Entre paréntesis se muestran iones derivados. En la parte superior, en mayor tamaño de letra se indica la estructura genérica de un ión amonio.

A partir de la lista de masas de fragmentos post incubado con tripsina (Tabla P2.1) y su correspondiente fragmentación se ordenaron los péptidos secuenciados confiablemente usando como modelo las secuencias deducidas de los clones A su vez, se encontraron otros péptidos que no dieron buena fragmentación, pero podrían corresponder a ciertas porciones de secuencia primaria donde no hubo cortes por tripsina (Tabla P2.2). Se encontraron también péptidos correspondientes a la auto lisis de tripsina, que fueron excluidos (los que dieron buena fragmentación, se secuenciaron también para confirmar que se tratara de tripsina).

La identificación de pares de iones que difieren en +57 o múltiplos de +57, fue un indicio de modificación por IAA. Usualmente, las fragmentaciones fueron casi idénticas (con excepción de la diferencia +57 en el caso de C). Esto facilitó la asignación por comparación. En algunos casos se hallaron residuos con el extremo N-terminal modificado por IAA. Esto se dio sólo en aquellas fracciones donde se usó un exceso de IAA al alquilar. A continuación se presentan las tablas con la secuencia asignada y la relación masa/carga de cada ión molecular peptídico (carga +1).

|         |                    |                           |                       |
|---------|--------------------|---------------------------|-----------------------|
| 794.42  | AAAVCFR            | Manual                    | Alta presión          |
| 824.4.4 | VAATCFR            | <b>Mascot</b>             | MQ5, MQ7, MQ9         |
| 881.4   | VAATCFR            | Manual+57                 | MQ7, MQ9              |
| 920.50  | NLWQFGR            | Mascot y Manual           | Alta presión          |
| 958.5-  | YWFFPAK            | <b>Mascot</b>             | MQ5, MQ7, MQ9, Alta p |
| 980.41- | QICECDR            | <b>Mascot</b>             | MQ5, MQ7, MQ9, Alta p |
| 1015.5  | YWFFPAK            | Manual +57                |                       |
| 1020    | VTDCDPKAD          | Mascot, 1 salto           | MQ7, MQ9              |
| 1037.4  | QICECDR            | Manual +57                | MQ5, MQ7, MQ9         |
| 1048.4  | MPYTYSR            | Manual                    | Alta presión          |
| 1064.4  | M(D/N) (I/L) YTYSR | Manual, CAF (+136)        | Alta presión          |
| 1112.5  | DNKDTYDNK          | <b>Mascot</b> , 1 salto   | MQ5, MQ7, MQ9         |
| 1239.6  | MVYPDVL            | Manual                    | Alta presión          |
| 1287.8  | NLVQFETLIMK        | Manual                    | MQ5, MQ7, Alta p      |
| 1308.7  | SLVQFETLIMK        | Manual                    | MQ9                   |
| 1324.7  | SLQVFETLIMK        | <b>Mascot</b> y Manual+16 |                       |
| 1344.8  | NLVQFETLIMK        | Manual, +57               | MQ5, MQ7              |
| 1335.7  | NLVQFETLIMK        | <b>Mascot</b> y manual    | MQ5, MQ7 Alta p       |

Parte 2. Análisis a partir de veneno

|         |                             |                             |                      |
|---------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------|
| 1351.4  | NLVQFETLIMK                 | Manual+16                   | MQ5                  |
| 1365.7  | SLVQFETLIMK                 | <b>Mascot</b> +57           | MQ9                  |
| 1392.7  | NLVQFETLIMK                 | Mascot y manual +57         | Alta presión         |
| 1415.5  | FRDNKDTYDNK                 | <b>Mascot, 1 salto</b>      | <b>MQ5, MQ7, MQ9</b> |
| 1431.5  | CCFVHDCCYGK                 | <b>Mascot, -17</b>          | MQ5, MQ7, MQ9        |
| 1448.5- | CCFVHDCCYGK                 | Mascot y manual             | MQ5, MQ7, MQ9        |
| 1488.6  | CCFVHDCCYGK                 | <b>Mascot</b> y manual -17  | MQ5, MQ7, MQ9        |
| 1505.5  | CCFVHDCCYGK                 | <b>Mascot</b>               | MQ5, MQ7, MQ9 Alta p |
| 1545.6  | CCFVHDCCYGK                 | <b>Mascot, -17+57</b>       | MQ5, MQ7, MQ9        |
| 1562.5  | CCFVHDCCYGK                 | <b>Mascot</b> y Manual, +57 | MQ7, MQ9, Alta p     |
| 1619    | TCFRDNKDTYDNK               | <b>Mascot, 2 saltos</b>     | <b>MQ7, MQ9</b>      |
| 1694.8  | DTYDNKYWFFPAK               | <b>Mascot, 1 salto</b>      | MQ5, MQ7, MQ9        |
| 1733.0  | NLVQFETLIMKIAGR             | <b>Mascot, 1 salto</b>      | MQ5                  |
| 1763.0  | SLVQFETLIMKIAGR             | <b>Mascot, +57, 1 salto</b> | MQ9                  |
| 1785.8  | QICECDRVAATCFR              | <b>Mascot, 1 salto</b>      | MQ9                  |
| 2051.9  | DNKDTYDNKYWFFPAK -          | <b>Mascot, 2 saltos</b>     | MQ5, MQ7, MQ9        |
| 2109.0  | DNKDTYDNKYWFFPAK            | Manual, 2 saltos+57         | MQ7, MQ9             |
| 2166.0  | DNKDTYDNKYWFFPAK            | Manual, 2 saltos +57+57     | MQ5, MQ7, MQ9        |
| 2220.9  | SGVWYYGSYGCYCGSGGQGR        | <b>Mascot</b>               | MQ5, MQ7, MQ9        |
| 2436.1  | DTYTYSEENGVVVCGDDPCKK       | Mascot                      | MQ5, MQ7             |
| 2562.0  | ADVITYSEENGVVVCGDDPCKK      | <b>Mascot, 1 corte</b>      | MQ9                  |
| 2564.0  | ADTYTYSEENGVVVCGDDPCKK      | <b>Mascot, 1 salto</b>      | MQ5, MQ7             |
| 2874.1  | GSGGQGRPQDASDRCCFVHDCCYGK   | Mascot, 1 salto             | MQ7, MQ9             |
| 2990.2  | SGVWYYGSYGCYCGSGGQGRPQDASDR | <b>Mascot</b> y manual      | MQ5, MQ7, MQ9        |

**Tabla P2.1. Valores de masas observadas y su secuencia asignada.** Cada péptido indicado fue fragmentado y analizado ya sea por servidor Mascot o bien por secuenciación manual *de novo* en caso de resultados estadísticamente no significativos. Todos se encontraron en más de una muestra de gel de proteína. Los indicados por Mascot significativo, su fragmentación MS/MS se correspondió en forma estadísticamente significativa ( $p < 0.5$ ) con un péptido de la base de datos NCBI nr, subconjunto vertebrados óseos. Las letras subrayadas (C, M o inicial) indican residuo modificado. +57 debido a alquilación por IAA para C, +16 para M debido a oxidación. En algunas preparaciones se utilizó exceso de IAA lo que conllevó a modificación también del N-terminal de péptidos (iones serie b con aumento +57) que proveyó una corroboración de la secuencia asignada. -17 indica pérdida de amoníaco (usualmente en C-terminal, por ciclación). Isoleucina y Leucina son indistinguibles por la técnica empleada, se anota la secuencia que más se asemeje a las PLA<sub>2</sub> clonadas en ese

## Parte 2. Análisis a partir de veneno

caso. M en negrita indica la pérdida del grupo S-CH<sub>3</sub> de la metionina debido a alquilación sobre este cuando se usa exceso de IAA. Mascot (en negrita) indica que para las fragmentaciones de ese péptido en particular se asignó en forma estadísticamente significativa la identidad con la secuencia indicada. Mascot sin negrita indica homología estadísticamente significativa. En los casos que se chequeó manualmente las fragmentaciones se indica en la misma celda. Con \* se indican los iones de los péptidos que diferenciarían las secuencias de las sPLA<sub>2</sub> entre sí. Algunos de estos péptidos no se observaron cuando se utilizó exceso de reductor (por ejemplo, los que tienen M oxidada).

|         |                        |                       |          |
|---------|------------------------|-----------------------|----------|
| 775.4*  | VTGCNPK                | Mascot                |          |
| 834.4*  | VTDCDPK                | Mascot                | MQ9      |
| 1108    |                        |                       |          |
| 1260.7  |                        |                       | MQ5, MQ9 |
| 1527.55 | CECDRVAATCFR           | -17                   | MQ5      |
| 1584.59 | CECDRVAATCFR           | Mascot, un salto, -17 | MQ7      |
| 1602    | -                      | -                     | MQ7      |
| 1625.6  |                        |                       | MQ5      |
| 1658.0  |                        |                       | MQ9      |
| 1676.6  |                        |                       | MQ7      |
| 1685.04 | -                      |                       | MQ5      |
| 1706.0  | SLVQFETLIMKIAGR        | Mascot                | MQ9      |
| 1715.0  | -                      |                       | MQ9      |
| 1751.8  | DTYDNKY <b>WFF</b> PAK | Manual, 1 salto,+57   | MQ7      |
| 1765.8  |                        |                       | MQ5      |
| 1772.05 | -                      |                       | MQ9      |
| 1794.9  |                        |                       | MQ5      |
| 1799.0  | -                      |                       | MQ7      |
| 1806.0  | -                      |                       | MQ9      |
| 1810.8  | -                      |                       | Alta     |
| 1820    | -                      |                       | MQ9      |
| 1829.0  | <b>SLVQFET-</b>        | Manual                | MQ9      |
| 1839.0  | -                      |                       | MQ5      |
| 1842.8  |                        |                       | MQ9      |
| 1856.0  | <b>-TLIA-</b>          | Manual                | MQ7      |
| 1877.1  |                        |                       |          |

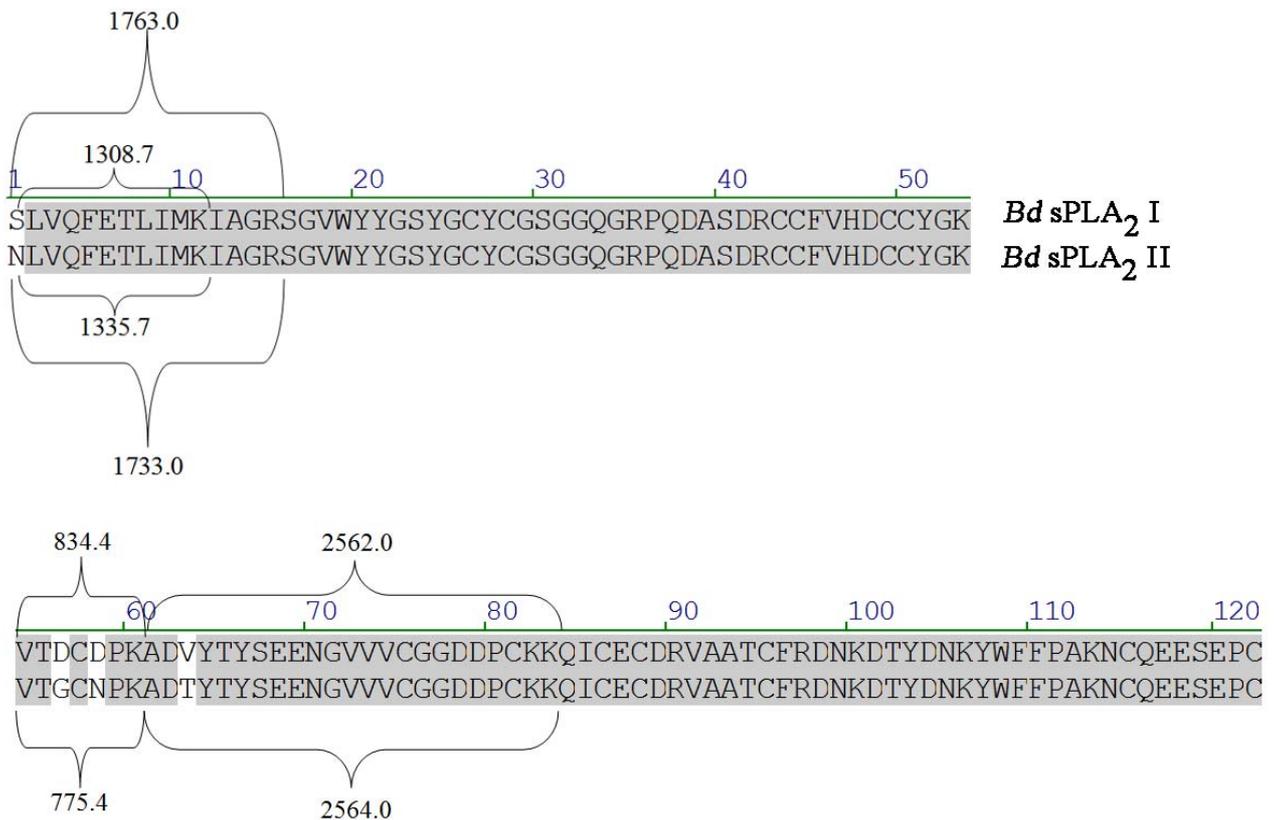
|         |   |                         |                  |
|---------|---|-------------------------|------------------|
| 2220.9  | SGVWYYGSYGCYCGSGGQGR                          |                         | MQ5              |
| 2034.9  | YWFFPAKNCQEESEPC                              |                         | MQ9              |
| 2437.0  |   |                         | MQ5, MQ7,<br>MQ9 |
| 2063.0  |   |                         | MQ5              |
| 2277.93 | SGVWYYGSYGCYCGSGGQGR                          | Manual+57               | MQ7              |
| 2113.9  | - <b>FFWYKN</b> -                             | Manual                  | MQ5              |
| 2619.7  |   |                         | MQ9              |
| 2621.7  |   |                         | MQ7              |
| 2679.2  |   |                         | MQ7              |
| 2817.1  |   |                         | MQ5              |
| 2857    |   |                         | MQ9              |
| 2972.2  |   |                         | MQ5, MQ7,<br>MQ9 |
| 963.4   | VTDCDPKAD                                     | Mascot 1 salto          | MQ9              |
| 3007    | VTDCDPKADVITYSEENGVVVCGDDPC                   | Mascot 1 salto          |                  |
| 3029.4  | -   |                         | MQ7, MQ9         |
| 3047.4  | SGVWYYGSYGCYCGSGGQGRPQDASDR                   | Manual +57              | MQ7, MQ9         |
| 3052    | -   |                         | MQ7              |
| 3435.7  | -   |                         | MQ9              |
| 4480.0  | SLVQFETLIMKIAGRSGVWYYGSY<br>GCYCGSGGQGRPQDASD | Mascot 1 salto, +57 +16 | MQ9              |

**Tabla P2.2. Péptidos intensos (relación señal:ruido >50) sin fragmentación adecuada.** No fue posible su identificación estadísticamente significativa con Mascot, la secuenciación manual solo dio porciones de secuencia en algunos casos (residuos en negrita).

Al alquilar con exceso de IAA se observó la modificación inespecífica del N-terminal y metionina, siendo esta última vista como una pérdida de masa de -48 Da. Esto es así porque luego de la alquilación (formación de S-carbamidometil metionina) y en el proceso de ionización se rompe el enlace con el azufre, lo que equivaldría a la pérdida del grupo SH-CH<sub>3</sub> (48 Da) de la cadena lateral de la metionina (Kruger y col. 2005). Se observaron otros péptidos también que no se fragmentaron, pero que coinciden con la digestión teórica con tripsina de las proteínas clonadas.

Un análisis cuidadoso de las masas revela la potencia de la técnica. Por ejemplo los péptidos 2562 y 2564 difieren solo en 2 Da, lo que refleja la mínima diferencia en la secuencia, un cambio de un residuo de valina (99 Da) por treonina (101 Da) y sirve como otro péptido más que evidencia la diferencia entre esas fosfolipasas.

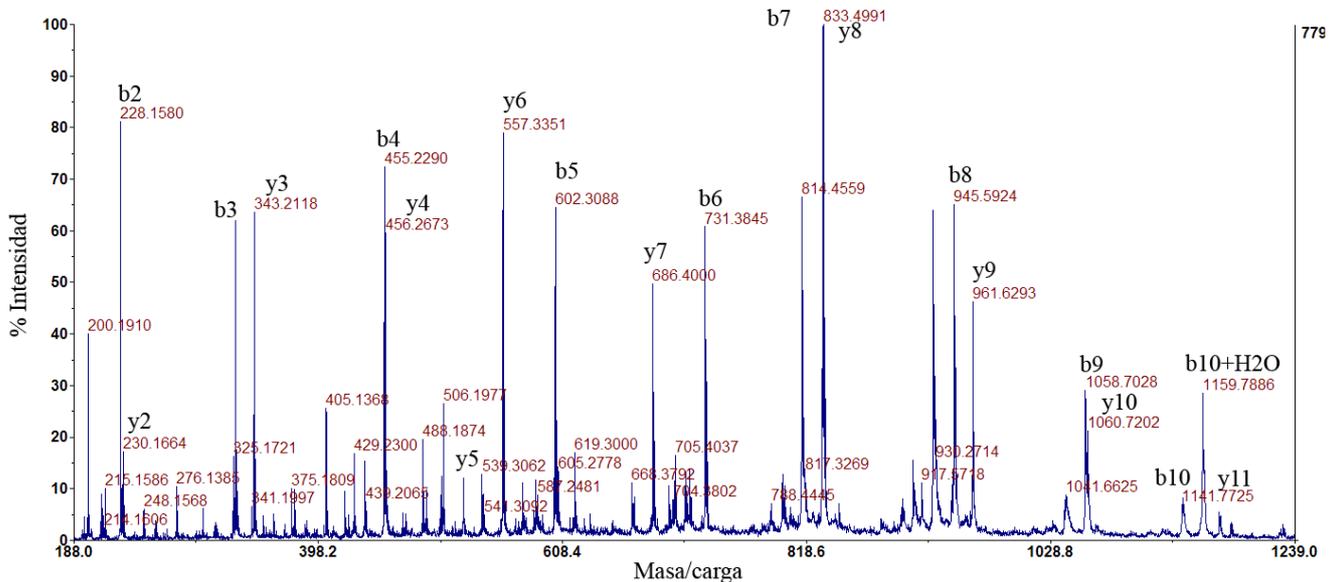
Se obtuvo una cobertura del 100% de las dos secuencias de sPLA<sub>2</sub> a partir de los péptidos obtenidos (Figura P2. 8).



**Figura P2. 8 Cobertura de secuencia y péptidos indicativos de isoformas.** El orden de los péptidos se hizo tomando como referencia las secuencias clonadas. En el alineamiento se marcan con llaves los péptidos diferenciales observados por espectrometría de masas. De esta forma, es confiable asignar la secuencia de *Bd sPLA<sub>2</sub>-I* (clonada) con la del pico 2 de la cromatografía de intercambio aniónico, mientras que la de *Bd sPLA<sub>2</sub>-II* coincide con la del pico 1 (Figura P2.3). Ninguna de las secuencias N-terminales coincide con las reportadas (Daniele y col. 1997) para enzimas de “baja presión”. *Bd sPLA<sub>2</sub>-I* coincidiría con P-3 que hidroliza a “alta presión” (óptimo a 25 mN/m).

Es necesario aclarar que el método de espectrometría de masas usado no permite asignar unívocamente una sola secuencia a algunos péptidos. Por ejemplo, en el caso del péptido de 1287.7 Da, se pueden asignar dos secuencias equivalentes: QTPETEFQPMK, y QVVQFETLIMK, ya que los iones imonio son básicamente los mismos que la que se toma como primera opción con otras

evidencias (clonación, y péptido con metionina no modificada 1335.8 Da). Se observaron iones imonio correspondientes a todos esos aminoácidos menos para prolina (P, ion 70 de Da), sin embargo. La única señal que diferenciaría a la secuencia propuesta es la señal a 87 Da del imonio de la asparragina (N).



**Figura P2.9. Ejemplo de asignación de iones *b* e *y*.** El precursor fue el ion de 1287.8 de relación carga masa. Este es el *y*12, mientras que *y*1 es el de 147.1 Da (fuera del rango mostrado). Otros picos intensos, como el 405.136, 506.197, 619.30, corresponden a fragmentos internos, como QFE+1, QFET+1, QFETL+1, respectivamente. Existen además, los fragmentos iónicos correspondientes a la pérdida del grupo NH<sub>2</sub> que resulta en un pico a -18 Da del ión precursor, como se ve para *b*8, y a su vez el pico en *b*10 +18 usual en los penúltimos aminoácidos adyacentes a uno básico C-terminal (en este caso, lisina).

Las secuencias informadas obtenidas a partir de degradación de Edman no fueron en su totalidad confirmadas por este trabajo de espectrometría de masas. P1 y P2 y sus posibles variantes no fueron halladas, analizando los N-terminal secuenciados, mientras que P3 si tuvo péptidos N-terminal que le corresponderían a la secuencia informada previamente (Tabla P2.3).

Es de notar que se observó el ión correspondiente al péptido NLVQFETLIMK también en la zona monomérica, esperado sólo en PLA<sub>2</sub> de la fracción S3 (zona dimérica del cromatograma). Este péptido coincide con el reportado por Daniele como secuencia N-terminal de P3. También pertenece a las proteínas clonadas, cuya secuencia tuvo un 100% de cobertura compatible con los péptidos observados para fosfolipasas de baja presión (zona monomérica). Por esto es que esta región *per se*, parece poco probable de ser responsable de proveer la característica de “alta presión”

a las fosfolipasas. Quizás una homo o hetero-dimerización podría influir en la capacidad de hidrolizar a alta presión lateral, pero no se puede descartar contaminación con cantidades pequeñas de otra fosfolipasa distinta. En la próxima sección se describe una nueva sPLA<sub>2</sub> candidata.

| Nombre                          | Secuencia N-terminal sPLA <sub>2</sub> | Masa Teórica  | Observada |
|---------------------------------|--|---------------|-----------|
| P-1                             | NLVQFETLIMMIAGR                        | 1735.9        | No        |
|                                 | NLVQFETLIMR-IAGR                       | 1363.7-1761.0 | No        |
|                                 | NLVQFETLIMYIAGR                        | 1767.9        | No        |
| P-2                             | SLVQFETLIMMIAGR                        | 1708.9        | No        |
|                                 | SLVQFETLIMR-IAGR                       | 1336.7-1733.9 | No        |
|                                 | SLVQFETLIMYIAGR                        | 1740.9        | No        |
| P-3                             | NLVQFETLIMK-IAGR                       | 1335.7-1733.0 | Sí        |
| <i>Bd</i> sPLA <sub>2</sub> -I  | SLVQFETLIMK-IAGR                       | 1308.7-1705.9 | Sí        |
| <i>Bd</i> sPLA <sub>2</sub> -II | NLVQFETLIMK-IAGR                       | 1335.7-1733.0 | Sí        |

**Tabla P2.3.** Secuencias N-terminales de fosfolipasas de *Bothrops diporus* y masas monoisotópicas informadas por otros métodos. P-1,P-2,P-3 fueron obtenidas por degradación de Edman (Daniele 1997). La asignación de la última metionina es ambigua, se colocaron también las posibles secuencias con R y Y. *Bd* sPLA<sub>2</sub>-I y *Bd* sPLA<sub>2</sub>-II (Yunes et al 2012) fueron deducidas a partir de clonado en este trabajo. Se reportan las masas alternativas n caso que la tripsina haya saltado un corte.

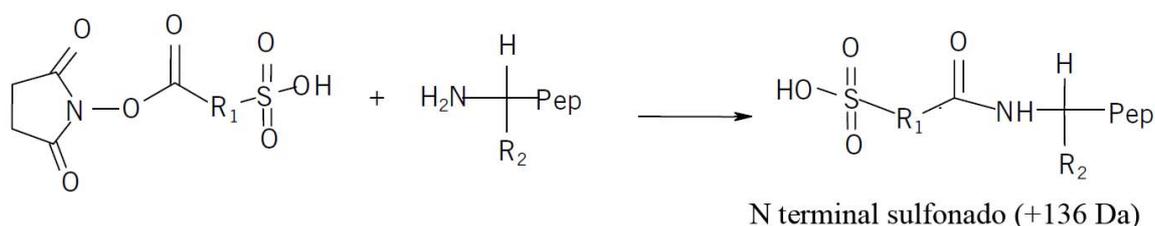
Finalmente, en cuanto a la identidad de la fracción Fr7 MQ 5, se está trabajando para analizar los péptidos diferenciales, aunque es claro que se observaron péptidos correspondientes a Fr7-MQ7 y Fr7-MQ9, siendo estas en sí mismas, muy similares. Esta fracción, posiblemente tenga algún cambio mínimo, ya sea genético, o bien post-traducciona, como un deamidación de algún residuo glutamina.

## 8. Nueva iso especie de alta presión

La muestra de alta presión (S3, de superdex 75), pasada por columna de intercambio aniónico no tuvo una buena resolución de pico (Figura P2.4), por lo que se hizo un gel 2D para separar las posibles isoformas que co-eluyeron y se trató el punto 4 (círculo, en panel derecho de la Figura P2.4).

El ión de fragmento tríptico más intenso fue el de masa 920.4 Da, el cual se fragmentó y se obtuvieron secuencias posibles. Para mejorar la identificación, se procedió a modificarlo químicamente, usando lo que se conoce como fragmentación químicamente asistida o CAF.

Esta técnica consiste en introducir un grupo sulfónico en grupos amino libres del péptido de tal manera de generar una protón resonante que mejora la fragmentación con fuentes de ionización MALDI e incrementa la masa en 136 Da (Figura P2.10). Además, al modificarse el N-terminal, se obtiene una ventaja fundamental, el grupo sulfónico neutraliza la carga positiva de los fragmentos de la serie b (Figura I.14) haciéndolos indetectables en el modo reflectrón, lo que simplifica el espectro obtenido notablemente (se observa claramente la serie y) y permite una secuenciación *de novo* con menos variables.

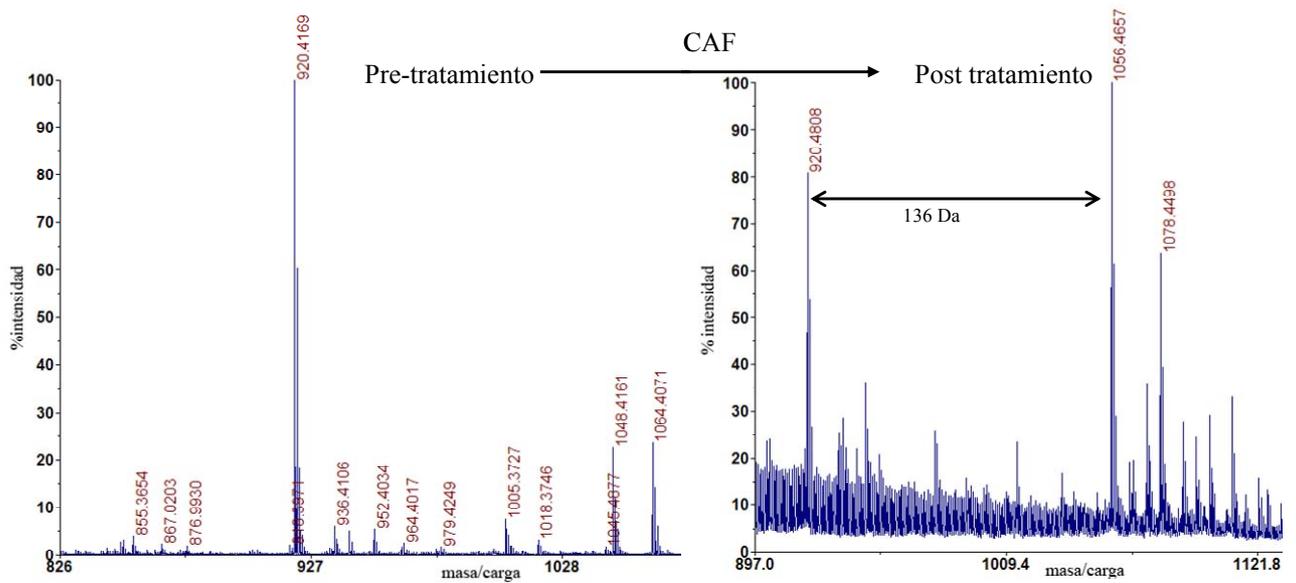


**Figura P2.10. Modificación química para una fragmentación mejorada (CAF).** Proceso de modificación de aminos primarios, ejemplificado con el N-terminal. En este trabajo no se realizó la protección de lisinas (panel izquierdo), extraído y modificado de manual del producto (CAF-MALDI Sequencing Kit, Ettan).

Se buscó péptidos modificados por 136 Da o bien sus múltiplos (Figura P2.11). De esta forma se confirmó la secuencia NLWQFGR por la fragmentación del péptido modificado de 1056.4 Da (Figura P2.12) para el N-terminal de la muestra.

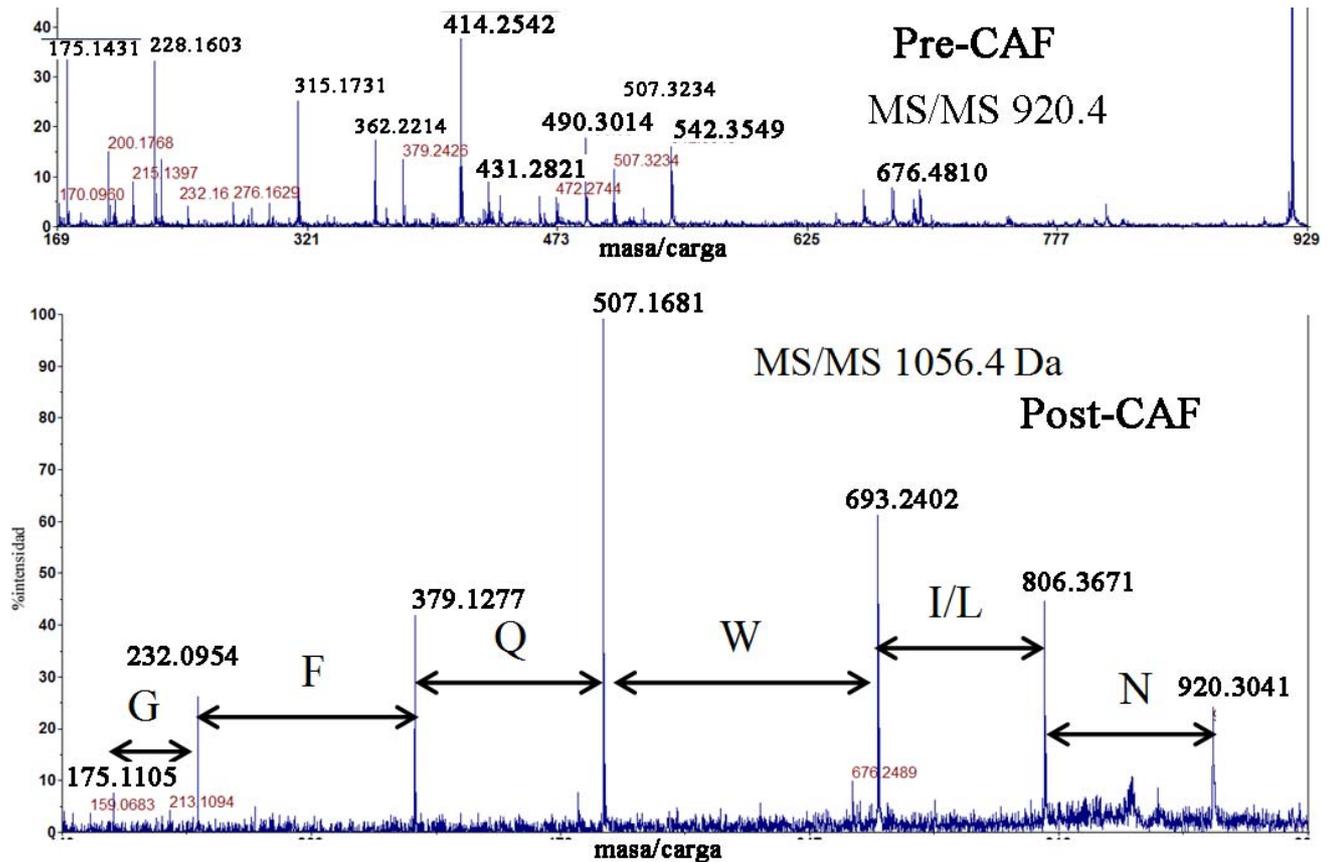
|         |  |                    |
|---------|--|--------------------|
| 920.4   | <b>NLWQFGR</b>   | Manual             |
| 1048    | <b>MDIYTYSR</b>  | Manual             |
| 1064    | <b>MDIYTYSR</b>  | Manual +16         |
| 1200    | <b>MDIYTYSR</b>  | Manual+16+CAF(136) |
| 1072.46 | <b>G<u>CY</u><u>CG</u>WGGR</b>   | Manual             |
| 2176.03 | <b><u>NAFKNYGFY</u><u>G</u><u>CY</u><u>CG</u>WGGR</b><br><b><u>TTTYG</u><u>CY</u><u>CG</u>WGGR</b> | / Mascot.          |

**Tabla P2.4. Péptidos exclusivos de la fosfolipasa de alta presión del punto 4 de gel 2D.** En negrita se indican los residuos claramente identificados en forma manual. El péptido de mayor tamaño con buena fragmentación fue asignado por Mascot a la secuencia indicada (masa 2176.03), aunque manualmente solo se pudo secuenciar con confianza lo indicado en negrita.



**Figura P2.11. Porción de huella peptídica de muestra de gel 2D de alta presión.** Izquierda, se observa el ión 920.4, correspondiente a N-terminal de una sPLA<sub>2</sub>. Derecha: misma muestra con péptidos modificados con reactivo de sulfonación de aminos libres, produce un aumento de masa de 136 Da.

Por similitud respecto a fosfolipasas de base de datos se determinó que el ión 920.4 correspondería al N-terminal de la proteína. Además, se distinguió también Gln (Q) en lugar Lys (K), en virtud de la ausencia de modificación. De haber estado presente K, se debería haber modificado por el reactivo sulfonante.



**Figura P2.12. Fragmentación del precursor 920.4 y su modificado 1056.4.** En el panel superior se presenta la fragmentación del péptido no modificado (920.4 Da), evidenciándose el patrón usual con iones de la serie **b**, **y** e incluso **a** (-28Da del ión **b**). Se omitió la zona de bajo peso molecular (imónicos). En el panel inferior se muestra la fragmentación del ión del péptido modificado (1056.4 Da), mostrando nítidamente la serie **y**, lo que permite asignar con mayor certeza la secuencia correspondiente de aminoácidos así como la presencia de glutamina (Q) en vez del residuo casi isobárico lisina (K).

En otros lotes de veneno se observó en la fracción 3 post superdex (S3, relacionada a actividad a alta presión) péptidos correspondientes a los N-terminales descritos para la fracción 7 de superdex 75. Se ve también el péptido 920.4Da, por lo que se puede suponer que la gran actividad a alta presión sea debido a la sPLA<sub>2</sub> que posee tal N-terminal, más que a la dimerización de las de baja presión

## 9. Discusión

Utilizando muestras de veneno, se encontraron al menos 4 fracciones distintas en pasajes cromatográficos, con clara actividad fosfolipasa, lo que podría representar 4 isoformas. De estas, 2 de ellas se identificaron con gran confianza gracias a la combinación de espectrometría de masas y el conocimiento previo de su secuencia deducida. Es decir, se identificaron a nivel de proteína en veneno las mismas sPLA<sub>2</sub>s clonadas a partir de ADNc de glándula. Además, se las encontró tanto en la zona monomérica como dimérica luego de cromatografía de exclusión molecular. Esta última zona (fracción 3 del cromatograma con Superdex 75, fig. P2. 13) es la que consistentemente presentó actividad a presiones laterales altas (20 mN/m). En esta zona también se encontró en algunas purificaciones una nueva sPLA<sub>2</sub> con secuencia N-terminal que no corresponde a ninguna de las PLA<sub>2</sub> reportadas (NLWQFGR).

Una de las dos sPLA<sub>2</sub> clonadas, denominada *Bd* sPLA<sub>2</sub>-I posee un extremo N-terminal que coincide 100% con el de la iso especie P-3 reportada (Daniele y col. 1997) como enzima de “alta presión” (óptimo a 25 mN/m). Sin embargo, la presencia de este extremo N-terminal se halló en fosfolipasas tanto de “baja presión” como de “alta presión”. Además, el óptimo de actividad en monocapas no fue de 25 mN/m sino de 20 mN/m.

Asumiendo la hipótesis que la mayor actividad se debe a la proteína en sí y no a contaminantes de esa fracción que aumenten el óptimo de actividad en monocapas, una posible explicación para la actividad a 20 mN/m de las proteínas con misma secuencia que las recombinantes, es una presencia en menor cantidad de una sPLA<sub>2</sub> muy activa a altas presiones, por ejemplo, aquella con secuencia inicial NLWQFGR. Es decir, una pequeña cantidad de sPLA<sub>2</sub> de “alta presión” modificaría la interfase lipídica generando productos de reacción que activarían las de baja presión (óptimo desplazado hacia mayores valores de  $\Pi$ ), como fue reportado por (Cajal & Jain). Para esto se realizarán ensayos de mezclas midiendo en la zona de  $\Pi$  de corte (*cut-off*), donde ya no presentan actividad las de baja presión. Además, si es un efecto no debido a catálisis, podría anularse la actividad de las proteínas de alta presión con BPB y realizar la mezcla con las de baja presión. Si el efecto no es mediado por catálisis, debería verse también un aumento del óptimo.

Como se mencionó en la Parte 1 (Discusión), en la literatura no parece estar presente el estudio de desnaturalización y renaturalización de alguna enzima de alta presión, ni tampoco se informa una sPLA<sub>2</sub> recombinante de alta presión que se le haya verificado el óptimo en monocapas. Éste es un control que intentamos llevar a cabo con una sPLA<sub>2</sub> de cobra de Mosambique (*Naja mossambica mossambica*) de origen comercial. En estudios preliminares observamos que luego de

la desnaturalización completa y su renaturalización, no se recupera el mismo óptimo. Sin embargo, esto podría ser por tener una cantidad muy baja de enzima activa ya que está lejos de ser óptimo el protocolo de renaturalización usado para esta enzima en particular. Este trabajo se está continuando en el momento. Otra medida que se considera a llevar a cabo en breve es conseguir veneno de PLA<sub>2</sub> de un solo individuo para simplificar la cantidad de isoformas y llevar a cabo la separación e identificación de las proteínas PLA<sub>2</sub> presentes, así como sus óptimos.

La disponibilidad reciente de un equipo de HPLC permitiría mejorar la purificación de isoformas. Estas enzimas son muy resistentes a las condiciones de solvente usuales de HPLC (acetonitrilo hasta 30 o 40% y ácido trifluoroacético al 1%).

Para finalizar, cabe mencionar que estudios sobre la fracción 5 (Figura P2.1, pág. 71) mostraron que la banda predominante próxima a 31 kDa es una lectina hetero-dimérica por puente disulfuro, habiéndose mapeado la región con cisteína involucrada en el dímero. En la región de la fracción 3 también se detectaron por espectrometría de masas metaloproteasas tipo I (tamaño próximo a 20 kDa). Los detalles de estos datos son omitidos en este escrito por simplicidad de presentación.

## **Parte 3. Estructura y energía de unión a membrana. Interacción teórica de sPLA<sub>2</sub> con membranas neutras y su relación con el óptimo de hidrólisis experimental.**

### **1. Objetivo**

Estudios de relación de unión a interfase lipídica de sPLA<sub>2</sub> con óptimo de hidrólisis de DLPC, enfocados en estructura primaria y terciaria

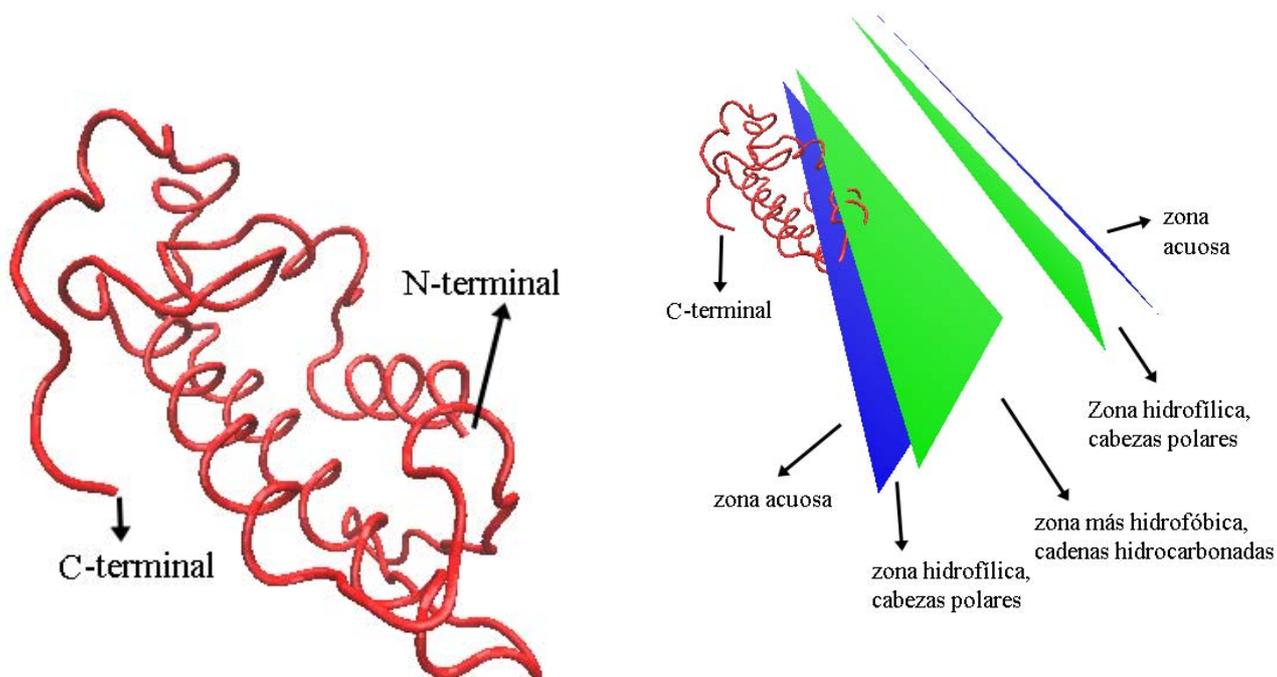
### **2. Resumen**

A partir de simulaciones de dinámica molecular discreta con representaciones en grano grueso de proteína y membrana bicapa modelada como un continuo, se estableció una relación directa entre el valor calculado de la energía libre de unión  $\Delta G$  de sPLA<sub>2</sub> a interfase y la presión lateral  $\Pi$  óptima de hidrólisis de presión lateral de monocapas obtenido experimentalmente. A mayor valor absoluto de energía de unión simulada, mayor  $\Pi$  óptima de hidrólisis de DLPC para una dada.

### **3. Método y resultados**

La información de las estructuras proteicas (coordenadas atómicas) de las enzimas se buscó en base de datos Protein Data Bank ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) o se modelaron por servidor (ver Métodos). Las estructuras utilizadas fueron de enzimas que se conocía su  $P$  óptima por haberse medido en este trabajo: las dos isoformas recombinantes de yarará chica (*Bothropoides diporus*) expresadas y clonadas en este trabajo, la de páncreas porcino (*Sus scrofa*), la de cobra india (*Naja naja*), la de cobra china (*Naja atra*), la de abeja (*Apis mellifera*), la bacteriana (*Streptomyces violaceoruber*, ver Parte 4). Además, se incluyeron en el cálculo las estructuras diméricas tanto del zimógeno como de la forma madura de la sPLA<sub>2</sub> de páncreas porcino. Estas coordenadas se convirtieron a un modelo de grano grueso que sólo consiste en representaciones de aminoácidos como unidades de interacción (no describe átomos particulares) y se calculó su energía libre de unión a un modelo

simplificado de membrana neutra (ver Métodos), consistente en 5 regiones, zona acuosa, zona de las cabezas polares, zona cadena hidrocarbonada, y nuevamente, cabezas polares y zona acuosa (Figura P3.1, derecha).



**Figura P3.1. Izquierda:** ejemplo de estructura simulada para *Bd* sPLA<sub>2</sub> I (servidor Swiss Model)

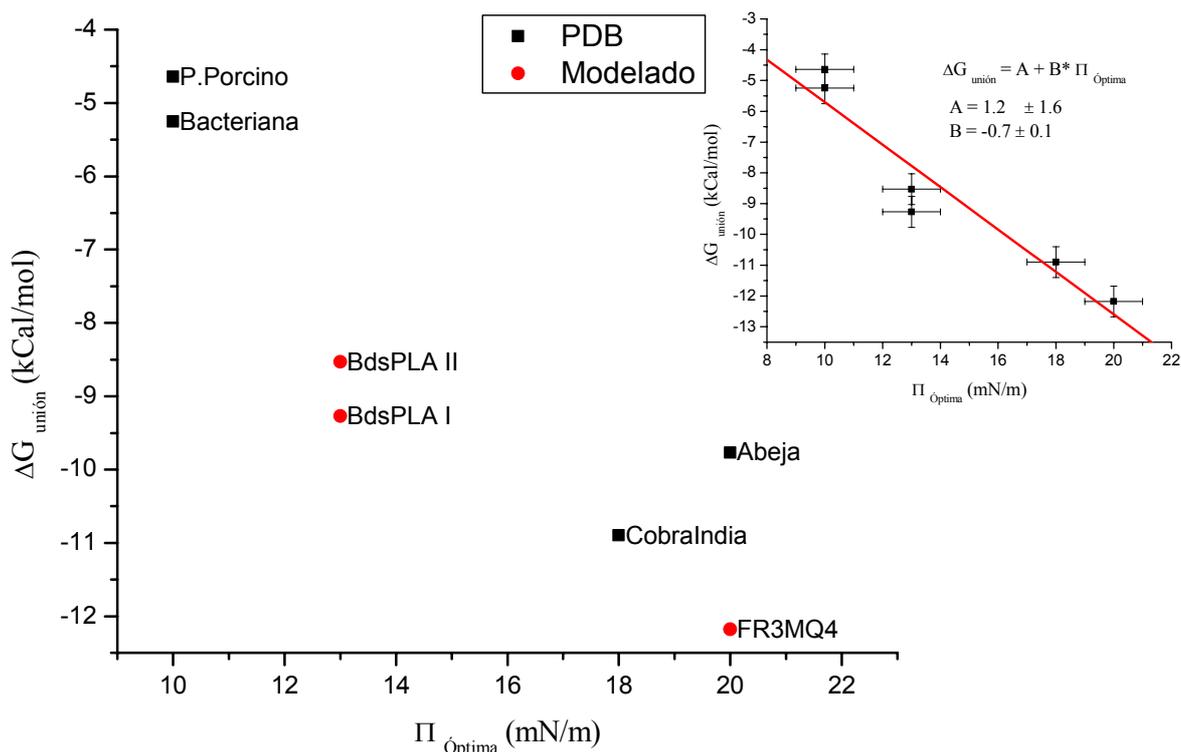
**Derecha:** Representación gráfica de la orientación teórica final de sPLA<sub>2</sub> de páncreas porcino respecto a la membrana simulada luego de una dinámica molecular discreta. Se muestran secciones de los 5 planos que definen los límites de cambio de hidrofobicidad de la bicapa. La región N-terminal se encuentra inserta en la región de las cabezas polares.

Se encontró que existe una relación directa entre las energías de unión simuladas y los óptimos de  $\Pi$  experimentales de hidrólisis de DLPC en monocapas (Figura P3.2). A mayor valor absoluto de energía de unión simulada, mayor  $\Pi$  óptima de hidrólisis de DLPC para una dada

La correlación cae un poco en su linealidad para el caso de la enzima tipo III probada, la de abeja. La relación que se da entre energía de unión calculadas, por ejemplo, entre la media de las de alta presión y las de baja presión óptima es de  $12/6=2$ , que en constantes de equilibrio sería equivalente a  $e^2 \approx 7.4$ . Es decir, es 7 veces mayor la cantidad de moléculas de proteína de alta presión unidas a la membrana respecto al seno de solución que para el caso de una proteína de baja presión.

| <b>A</b>   |      |                 |                        |              |
|--|------|-----------------|------------------------|--------------|
| Descripción  | PDB  | Π óp.<br>(mN/m) | ΔG unión<br>(kCal/mol) |              |
|  |      |                 | <b>144</b>             | <b>100-5</b> |
| Abeja  | 1POC | 18              | -9.77                  | -12.43       |
| Pancreática porcina  | 1PIR | 10              | -4.64                  | -7.08        |
| Cobra india ( <i>Naja naja</i> )                           | 1PSH | 18              | -10.90                 | -13.08       |
| Bacteriana +Ca <sup>2+</sup> ( <i>S.violaceoruber</i> )    | 1KP4 | 9               | -5.26                  | -7.45        |
| Bacteriana ( <i>S.violaceoruber</i> )                      | 1LWB | -               | -4.95                  | -7.51        |
| <i>Bd</i> sPLA <sub>2</sub> II modelada                    | -    | 13              | -8.53                  | -12.15       |
| <i>Bd</i> sPLA <sub>2</sub> -I modelada                    | -    | 13              | -9.27                  | -13.20       |
|  |      |                 |                        |              |
| <b>B</b>   |      |                 |                        |              |
| <i>Bd</i> sPLA <sub>2</sub> II+Fr3MQ4 modelada             | -    | 19              | -12.34                 | -15.87       |
| P. porcina dím.+inhibidor+PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>    | 1FXF | 12              | -7.15                  | -8.99        |
| P. porcina dím.+inhibidor+SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>    | 1FX9 | 12              | -7.07                  | -9.06        |
| P. pro-porcina.dím+inhibidor+SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> | 1HN4 | 7               | -4.01                  | -5.50        |
| P. porcina sin bucle                                       | 3P2P | 11              | -6.79                  | -7.81        |
| P. bovina  | 1BP2 | 17              | -10.76                 | -11.97       |
| P. bovina 0.97 Å   | 1G4I | 16              | -10.55                 | -11.54       |
| P. pro-bovina modelado                                     | 4BP2 | 8               | -4.50                  | -6.23        |
| Cobra china ( <i>Naja atra</i> )                           | 1POA | 18              | -11.56                 | -13.88       |
| Cascabel diamante ( <i>C. atrox</i> )                      | 1PP2 | 18              | -11.72                 | -17.02       |
| Exudado inflamatorio humano                                | 1POD | 11              | -6.66                  | -8.46        |

**Tabla P3.1. A. Valores de ΔG de unión a membrana calculados para distintas sPLA<sub>2</sub> y Π óptimas de hidrólisis experimentales.** El error en la determinación de Π es  $\approx \pm 1$  mN/m, el error en ΔG es  $\pm 0.5$  kCal/mol. **A:** valores de Π óptima medida y energía de unión a la membrana simulada usando estructuras cristalográficas depositadas en el Protein Data Bank (PDB, [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)), o bien modeladas por servidor. **B.** estructuras disponibles para las cuales no se encontró valor de literatura de Π óptima, estimándose esta a partir de ajuste lineal (inserto Figura P3.2), en algunas se tuvo que modelar bucles ausentes de la estructura cristalina reportada o extremos N terminal.



**Figura P3.2. Energía de unión a membrana simulada vs. óptimo de hidrólisis de DLPC.** Se tomó uno de los conjuntos de parámetros posibles (144, ver Tabla P3.1). En cuadrados se indican los valores con estructura PDB depositada para los cuales se dispuso de la proteína y se construyó su perfil. Los círculos corresponden valores obtenidos con estructuras modeladas para las enzimas de baja presión y la de alta presión (FR3MQ4) de *B. diporus*. Los errores esperados son los mismos que se indican en tabla. En el inserto superior derecho se muestra una recta tentativa de ajuste para todas las enzimas del grupo I o II, excluyéndose la del abeja (grupo III).

En los cálculos se incluyeron las estructuras disponibles de las formas maduras y zimógeno de las enzimas de páncreas porcino, verificándose un mayor valor absoluto de energía para la forma madura ( $\approx -7$  kCal/mol o  $\approx -9$  kCal/mol, dependiendo del conjunto de parámetros de la simulación, ver Tabla P3.1. B) respecto de la enzima con su pro-péptido ( $\approx -4$  kCal/mol o  $\approx -5.5$  kCal/mol), lo cual es otra evidencia de validación del método propuesto, puesto que la actividad del zimógeno es mínima frente a sustrato agregado (Verheij y col. 1981), ver pág. 26). Por otro lado, la ubicación relativa de las estructuras proteicas respecto de la membrana, obtenida por simulación computacional es coincidente con datos experimentales publicados para este tipo de enzimas. Por ejemplo, para el caso de la PLA2 de cobra cristalizada con un análogo del estado de transición, las tres cadenas laterales de los residuos hidrofóbicos (L2, F5, I9) contribuirían a la unión al sustrato mediante el contacto de su superficie hidrofóbica con las cadenas de ácido graso del sustrato (Scott y col. 1990).

Es de notar, que una proteína quimérica, *in silico*, consistente en la secuencia de la enzima *Bd* sPLA<sub>2</sub>-II con las modificaciones de secuencia coincidentes con lo obtenido para FR3MQ4 por espectrometría de masa (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), aumenta la interacción teórica con la membrana de -8.5 a -12.3 kCal/mol (*Bd* sPLA<sub>2</sub> II + FR3MQ4, ver Tabla P3.1. B).

|  |  |
|--|--|
| <i>Bd</i> sPLA <sub>2</sub> -II          | NLVQFETLIMKIAGRSGVWYYGSYGCYCGSGGQGRPQDASDRCCFVHDCCYGKVTGCNPK     |
| <i>Bd</i> sPLA <sub>2</sub> -II + Fr3MQ4 | NLWQFGRLIMKIAGRSGVWYYGSYGCYCGWGGRGRPQDASDRCCFVHDCCYGKVTGCNPK     |
| <i>Bd</i> sPLA <sub>2</sub> -II          | ADTYTYSEENGVVVCGGDDPCKKQICECDRVAATCFRDNKDITYDNKYWFFPAKNCQEESEPC  |
| <i>Bd</i> sPLA <sub>2</sub> -II + Fr3MQ4 | MDIYTYSRRENGVVVCGGDDPCKKQICECDRVAATCFRDNKDITYDNKYWFFPAKNCQEESEPC |

**Secuencias alineadas de *Bd* sPLA<sub>2</sub> II junto con la secuencia modificada usando la información de iso especie de alta presión lateral.**

Esta diferencia predicha por el modelo, de ser confirmada experimentalmente, sería una evidencia clara de regulación funcional con mínimo cambio estructural. Curiosamente las sustituciones se hallan en zonas que en principio estarían muy próximas a la membrana. Así, V3W, E6G y T7R se hallan en el extremo N-terminal, mientras que S30W y Q33R están en un bucle intermedio. Finalmente, hacia el C terminal, las sustituciones A113M y T115I se hallan también muy próximas a la membrana. Las sustituciones energéticamente más favorables son tres, la V3W, E6G y la S30W, al estimar el cambio de energía libre de unión a membrana considerando la naturaleza de los aminoácidos.

#### 4. Discusión

Los cálculos de dinámica molecular discreta y en particular, la implementación tipo grano grueso para cada aminoácido representado centrado en el carbono  $\alpha$ , junto con la descripción simplificada de un modelo de membrana zwitteriónica seguida de la calibración con constantes conocidas de proteínas con estructura resuelta fueron llevados a cabo por el Dr. Marcos Villarreal (aún no publicado). La membrana modelada se presenta como un continuo por lo que no está definida la densidad molecular de lípido para ésta, sin embargo al haberse hechos pasos de calibración (Dr. Villarreal) con estructura de proteínas y sus valores experimentales de unión a

interfases, se pudo generar esta membrana genérica que en principio describe bien y en forma muy rápida las diferencias de interacción con membrana de proteínas de más o menos el mismo tamaño. Una de las limitaciones para generalizar el estudio con este método es la falta de información de óptimos de actividad en monocapas vs. DLPC. En experiencia del Dr. Villarreal, funcionó apropiadamente para proteínas de menos de 200 a.a., como lo son las del tipo I y II sPLA<sub>2</sub>

Si se asume que la actividad específica de catálisis es aproximadamente la misma para todas las enzimas tipo II, , la resultante final de actividad de hidrólisis total dependerá en forma comparativa sólo de la cantidad de enzima adsorbida o unida a la interfase. Para el conjunto de parámetros 144 (Tabla P3.1) la relación entre la energía libre de unión y la presión lateral óptima que se obtiene es aproximadamente lineal (Figura P3.2). De esta forma, la metodología descrita podría ayudar a estimar la  $\Pi$  óptima de catálisis convirtiéndose en una herramienta sencilla para estimar en forma general el comportamiento de enzimas muy similares estructuralmente y por esto, ayudar en el diseño de secuencia primaria y su influencia en la estructura terciaria.

Se espera ampliar la cantidad de estructuras de fosfolipasas a modelar para seguir probando el método, y a su vez estimar las regiones más críticas para este cambio. Se empezará por el extremo N-terminal debido a evidencias en literatura. De confirmarse la mayor interacción predicha a través de expresión recombinante se estaría en un ejemplo de una regulación fina de la propiedad de unión a la membrana entre dos proteínas de veneno.

## **Parte 4. Efectos de sPLA<sub>2</sub>s sobre mielina.**

### **1. Objetivo**

Analizar suspensiones de mielina incubadas con sPLA<sub>2</sub>, tanto de “alta presión”, como de “baja presión” de hidrólisis de DLPC y establecer si existen diferencias a nivel estructural o de nivel de hidrólisis entre una mezcla u otra.

### **2. Resumen**

La técnica de SAXS (dispersión de rayos X a bajo ángulo o *Small Angle X ray Scattering*) se utilizó para analizar el espaciamiento regular usual de mielina hidratada tratada y no tratada con fosfolipasa en cantidades catalíticas (cantidad de proteína invisible a la técnica). Se encontró que el tratamiento con fosfolipasas sPLA<sub>2</sub> de todos los tipos usados produce hidrólisis tanto en mielina presentada en forma vesicular como en monocapas aire / agua , y en ocasiones por SAXS se detecta una nueva fase, más expandida que la usual junto con ésta, que usualmente se observa a menores temperaturas en mielina no tratada. En monocapas se vio hidrólisis tanto con enzima pancreática porcina como de veneno de cobra (*Naja naja*), hidrólisis que era más notable (seguida por disminución de diferencia de potencial eléctrico,  $\Delta V$ ) cuanto menor fuese la presión lateral. Al contrario que con DLPC como sustrato, no parece haber diferencias drásticas de capacidad de hidrólisis en cuanto a  $\Pi$  de monocapas de mielina entre estas dos enzimas sPLA<sub>2</sub>, y tampoco se encontraron niveles de hidrólisis disímiles cuando la mielina se presenta en forma de suspensión vesicular acuosa.

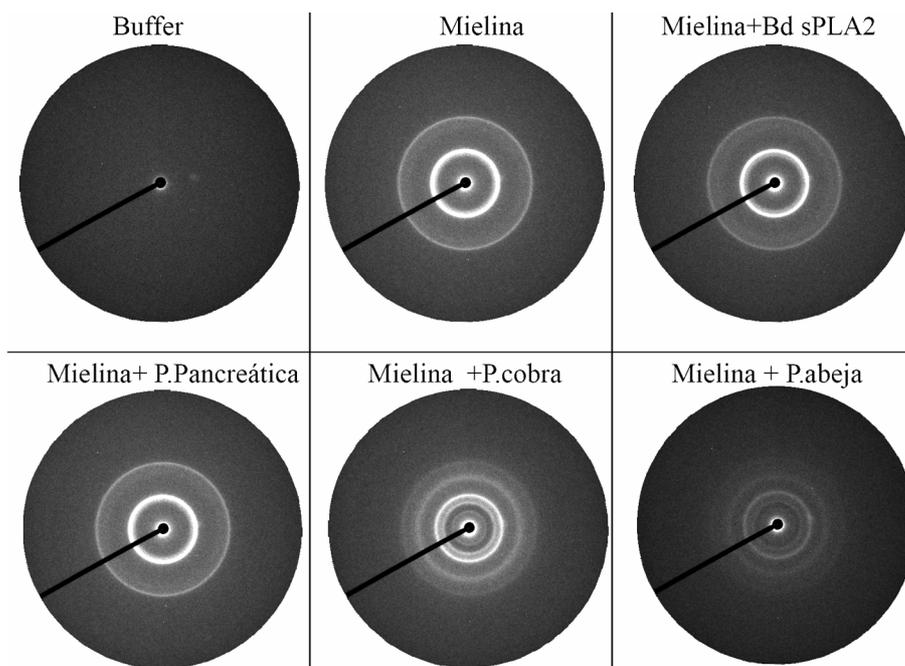
### **3. Estudios estructurales del efecto de sPLA<sub>2</sub> sobre mielina**

Se exploró la posibilidad de detectar cambios estructurales en mielina, por parte de la acción de fosfolipasas secretadas. La mielina es una membrana lípido-proteica que envuelve el axón neuronal en forma de membranas concéntricas (tipo espiral), facilitando la conducción nerviosa, y su inestabilidad está relacionada a varias enfermedades, como la esclerosis múltiple. El 70% del peso seco de la mielina humana es lipídico, y el 30 % proteico. A su vez el 40 % (28 % de masa

total de mielina) de los lípidos corresponden a diversos fosfolípidos, en principio sustratos de fosfolipasas (Morell y col. 1999). Debido a su estructura periódica de multicapas, es una de las membranas naturales que más se han estudiado por técnicas de difracción (Oliveira y col. 2010). Existe bibliografía que muestra un aumento de actividad de sPLA<sub>2</sub> tanto en animales con modelo de esclerosis múltiple humana (llamado Encefalomiелitis autoinmune experimental, o EAE) así como en humanos con la enfermedad (Cunningham y col. 2006). Otro estudio relacionó la actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> con la demielinización del nervio ciático generando regiones hipersensibles (Chen y col. 1997). Además, las cepas virulentas de la ameba *Naegleria fowleri* que produce encefalitis, tienen elevadas actividades lipolíticas sobre mielina humana, incluyendo a la de fosfolipasa secretada (Hysmith y col. 1982). Puesto que estos dos tipos de enzima no se disponían (humana y amebiana), se llevó a cabo el estudio con las fosfolipasas secretadas disponibles, que incluyen la enzima recombinante *Bd* sPLA<sub>2</sub> I, las de veneno de cobra y abeja, y la de páncreas porcino. Por ser una fuente monocromática de alto flujo de fotones, se usó la línea SAXS del sincrotrón LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas, Brasil), bajo la propuesta SAXS1 10716 en el año 2011 y 13462 en 2012.

El experimento inicial consistió en agregar a suspensión de mielina purificada a partir de nervio de médula de vaca (ver Métodos) en *buffer* pH=7.4 con 2 mM CaCl<sub>2</sub> (esencial para este tipo de enzimas) e incubar a 37 °C. Se detectaron notables diferencias entre los difractogramas de muestras control (mielina sin sPLA<sub>2</sub>), y tratadas con sPLA<sub>2</sub> pancreática y recombinante sPLA<sub>2</sub>, respecto de aquellas incubadas con sPLA<sub>2</sub> provenientes de veneno, tanto de cobra como de abeja (Figura P4.1). En este último caso aparecen nuevos anillos de difracción lo que indica una nueva distancia entre estructuras difractantes, sumados a los originales de la mielina no tratada.

La intensidad de la señal de SAXS viene dada por contribuciones de dos factores, el de forma (de la partícula dispersante) y el de estructura (relación geométrica entre estas partículas, es decir, disposición y separación espacial). Este último factor toma el valor de 1 para un sistema suficientemente diluido, se pierde información de disposición espacial entre las partículas dispersantes. En nuestro caso, sin embargo provee información del espaciamiento entre las vesículas multi-lamelares de mielina (posición del picos de difracción). A su vez, se puede obtener el tamaño máximo (longitud en una dirección) de la estructura dispersante considerando en un cálculo el ancho del pico a la mitad del máximo. Con estos dos datos, usando la ecuación de Scherrer, se puede saber cuántas unidades (en nuestro caso vesículas multi-lamelares) hay en la celda unidad que dispersa, dividiendo la longitud sobre el tamaño (espaciamiento). Estos cálculos fueron realizados por el Dr. Rafael Oliveira, y por simplicidad se omiten.



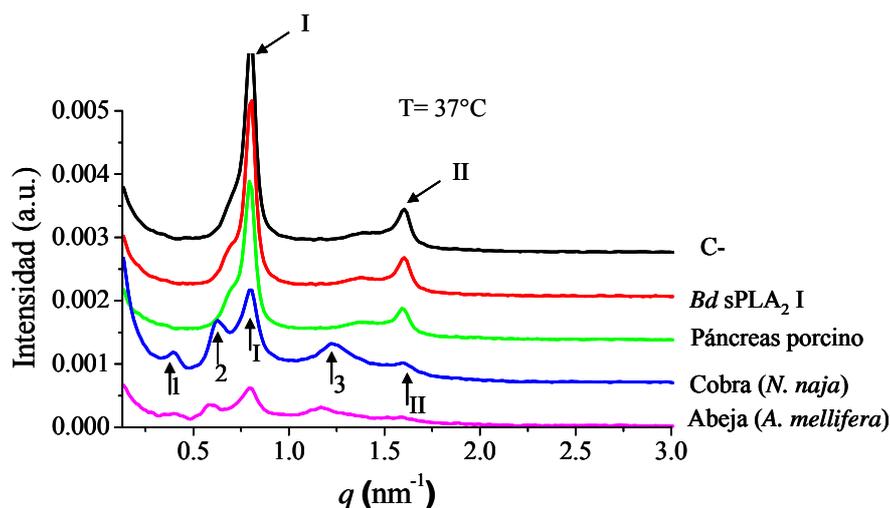
**Figura P4.1** Imágenes de SAXS obtenidas por el detector en muestras de mielina. Cada una de estas imágenes fue integrada con la sustracción del blanco (*buffer*) usando el software Fit2D.

La relación sencilla entre el espacio recíproco (medido en  $\text{nm}^{-1}$ ) y el real (medido en nm) está dada por la siguiente ecuación:

$$q = 2\pi/d \quad (1)$$

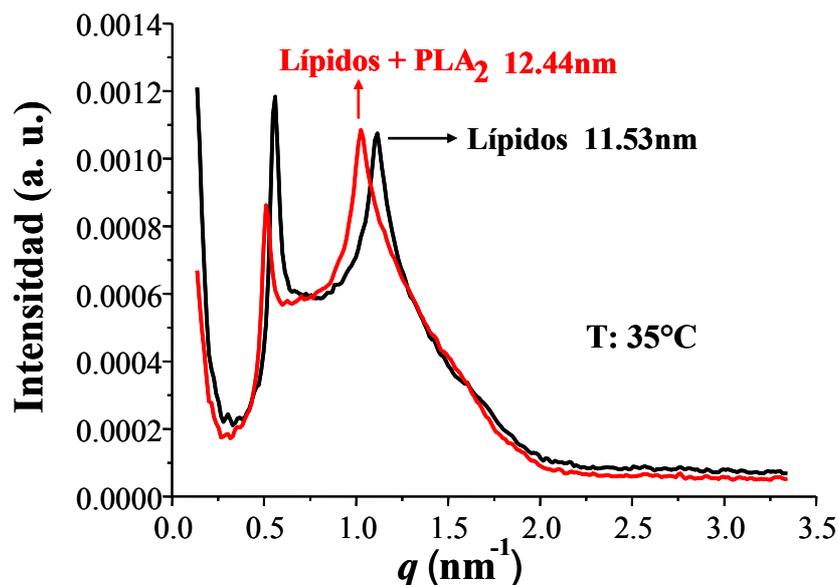
Integrando radialmente los difractogramas de la Figura P4.1 se grafican los picos de intensidad y su correspondiente ángulo del vector de *scatter*  $q$  (Figura P4.2). De este valor, con la ecuación 1 se obtienen los espaciamientos  $d$  entre lamelas. La membrana de mielina nativa (sin sPLA<sub>2</sub>) muestra un espaciamiento de 7.8 nm (usando ecuación 1 con posición de pico I, Figura P4.2) y una unidad coherente de 11 bicapas (ecuación de Scherrer). El pico II es la reflexión de segundo orden, con una  $d = 3.9$  nm ( $q=1.60$   $\text{nm}^{-1}$ ). No se ven cambios importantes ni aparición de nuevos picos al incubarse con enzimas pancreática o recombinante *Bd* sPLA<sub>2</sub> I. En cambio para el caso de sPLA<sub>2</sub> de cobra se mantiene el espaciamiento nativo, aunque con una unidad coherente menor (4 a 5 bicapas) y además aparecen tres nuevos picos (1, 2 y 3 en). De estos, el 1 podría implicar una duplicación de la celda unitaria normal ( $d=15.6$ ,  $q=0.4$   $\text{nm}^{-1}$ ) y el 2 ( $q=0.6$   $\text{nm}^{-1}$ ,  $d=10.5$  nm.), y 3 ( $q=1.2$   $\text{nm}^{-1}$ ,  $d=5.2$  nm) corresponderían a una nueva fase más expandida (mayor  $d$ ). El pico en  $q=0.4$   $\text{nm}^{-1}$ , al tener el doble de espaciamiento que el pico nativo ( $q=0.8$   $\text{nm}^{-1}$ ) podría sugerir una estructura doble bicapa con bicapas asimétricas, ya que coincide con la duplicación de

celda unitaria. Esto podría deberse a la hidrólisis de sólo una capa (la externa, en contacto con la sPLA<sub>2</sub>) de las vesículas de mielina. Este tipo de fenómenos ha sido observado en sistemas de mielina en nervio y cuando hay separación de fases. También ha sido observado en los productos de hidrólisis de fosfolipasas en sistemas mas sencillos (Funari y col. 2009). Los anillos nativos de difracción se siguieron observando incluso luego de 24 hs de incubado con la enzima, lo que indica que se conserva la estructura lamelar (no mostrado).



**Figura P4.2. Integración radial de difractograma de mielina incubada con distintas sPLA<sub>2</sub>s.** Lo picos de difracción nativos de mielina no tratada (C-) se denominan I ( $q=0.80 \text{ nm}^{-1}$ ) y II (armónico  $q=1.60 \text{ nm}^{-1}$ ) y se indican con flecha oblicuas. En las muestras tratadas con sPLA<sub>2</sub> de veneno de abeja y de cobra, se observa la aparición de tres picos indicados con flechas verticales, 1 ( $q=0.4 \text{ nm}^{-1}$ ), 2 ( $q=0.6 \text{ nm}^{-1}$ ) y 3 ( $q = 1.2 \text{ nm}^{-1}$ ), y disminución de la intensidad de los nativos I y II. Los picos 2 y 3 representarían la nueva fase formada, más expandida. El pico 1 podría implicar la duplicación de la celda unitaria. Para la mielina tratada con las enzimas de páncreas porcino y enzima recombinante *Bd sPLA<sub>2</sub> I* no se observan estos nuevos picos.

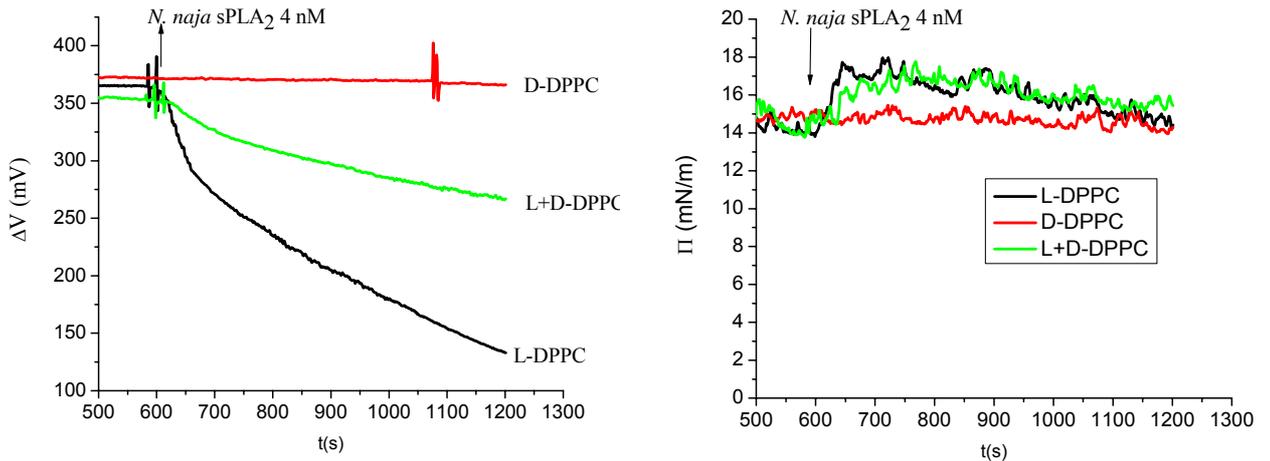
Para simplificar el sistema también se estudió el efecto de sPLA<sub>2</sub> de cobra en lípidos aislados de mielina. La estructura de las membranas es muy dependiente de la fuerza iónica y de  $\text{Ca}^{2+}$  en particular, el cual es indispensable para la actividad sPLA<sub>2</sub>. Bajo las mismas condiciones de fuerza iónica y  $\text{Ca}^{2+}$ , en coincidencia con lo observado en membranas totales, se observa una mayor separación entre las membranas  $\sim 1 \text{ nm}$  (Figura P4.3) luego de ser incubadas con sPLA<sub>2</sub>.



**Figura P4.3. Diffractograma integrado de fracción lipídica de mielina.** Se observa un corrimiento a menores  $q$  luego de incubar con sPLA<sub>2</sub> de *Naja naja*, lo que se traduce en un aumento de 11.53 nm a 12.44 nm en el espaciamiento entre las estructuras repetitivas (multicapas vesiculares).

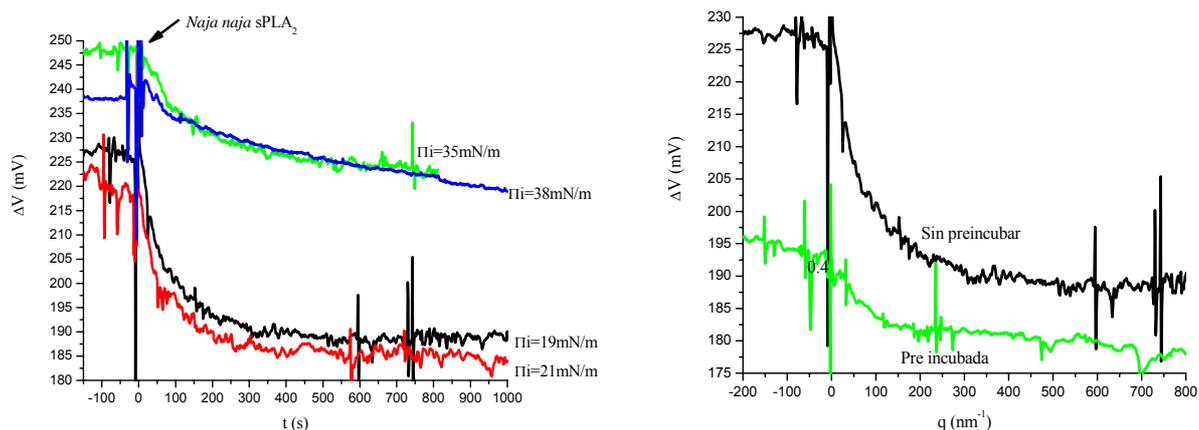
#### 4. Hidrólisis de monocapas de mielina

Cuando se hidroliza un fosfolípido se generan ácidos grasos y lisofosfolípidos que aportan diferente densidad de carga eléctrica, y existe además la posibilidad de mayor desorción de la interfase. Esto resulta en un cambio de potencial dipolar relacionado a la diferencia de potencial global de la superficie, que es lo que se mide. La acción de fosfolipasas sobre fosfolípidos genera un descenso de esta diferencia de potencial eléctrico de superficie (Colacicco y Rapport 1966). En nuestro caso validamos la técnica y la invisibilidad de la contribución directa de la enzima a la concentración usada, utilizando DPPC como sustrato (forma L) y como análogo no hidrolizable (forma D). Los productos de reacción del primero se desorben muy lentamente, lo que mantiene prácticamente constante la  $\Pi$ . Así, se sigue la evolución de la reacción por  $\Delta V$ . Como se esperaba, se observó una disminución de diferencia de potencial ( $\Delta V$ ) al incubar monocapas del enantiómero hidrolizable (L-DPPC) con enzima de *Naja naja* y no se vio cambio cuando se usó el no hidrolizable (D-DPPC), lo que indica que no se detecta la presencia de la enzima a estas concentraciones en forma directa (Figura P4.4). La mezcla racémica presenta un valor intermedio de caída de  $\Delta V$ , lo que refleja la hidrólisis del 50% de la monocapa. Los errores de esta técnica en la determinación de  $\Delta V$  están alrededor de  $\pm 30$  mV (diferencia de posición del cero, antes de sembrar la monocapa), por lo que lo crítico es la diferencia de este  $\Delta V$  en la reacción ( $\Delta\Delta V$ ).



**Figura P4.4. Validación de potencial de superficie como indicador de hidrólisis.** Las monocapas de L-DPPC presentan hidrólisis evidenciada por la caída de potencial ( $\Delta\Delta V \approx 200$  mV), panel izquierdo. El enantiómero D-DPPC no es sustrato y no se ve efecto de la enzima a estas concentraciones. La mezcla racémica (LD-DPPC) presenta una caída intermedia a los 20 minutos ( $\Delta\Delta V \approx 100$  mV). La presión lateral ( $\Pi$ ) no disminuye a valores menores que la inicial hasta lo 30 minutos de medida. El incremento en  $\Pi$  para los casos de la mezcla racémica y del L-DPPC de  $\approx 2$  mN no se observa en el lípido no sustrato (D-DPPC).

Para el caso de mielina se obtuvo algo similar (Figura P4.5, panel izquierdo). Manteniendo el área constante, la  $\Pi$  sólo tuvo un leve descenso de 1 a 2 mN/m en los 15 minutos de medida, y se vio un descenso de  $\Delta V$  mucho más marcado a  $\Pi_i$  (momento de siembra) moderadas (18 a 20 mN/m) y más tenue a  $\Pi_i$  altas ( $>35$  mN/m).



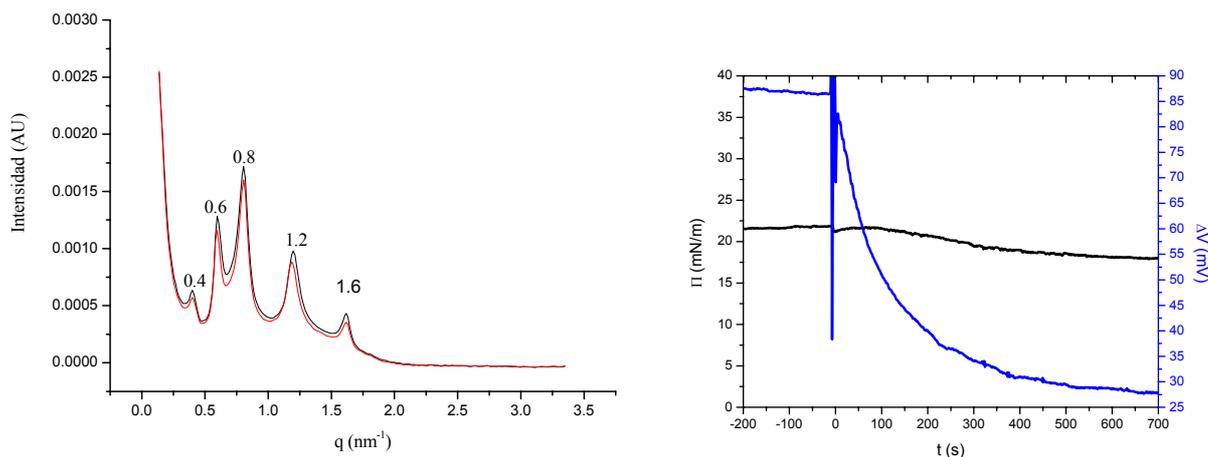
**Figura P4.5. Hidrólisis de monocapas de mielina seguida por diferencia de potencial eléctrico.**

sPLA<sub>2</sub> de *Naja naja* total  $\approx 6$  nM, T 24-26°C. **Izquierda:** seguimiento de la hidrólisis por  $\Delta V$  de superficie,  $\Pi_i$  es el valor al inyectar la enzima en subfase,  $t=0$ s. Se observa menor caída a mayor  $\Pi_i$ . **Derecha:** La pre-digestión de suspensión de mielina con la enzima reduce la caída de  $\Delta V$ . La curva Pre incubada corresponde a mielina previamente incubada con exceso de sPLA<sub>2</sub> (860 nM). La muestra sin preincubar muestra un descenso de  $\approx 40$  mV en 600 s, mientras que la muestra pre-incubada antes de sembrar muestra  $\approx 15$  mV.

A su vez, la mielina incubada primero con sPLA<sub>2</sub> y luego sembrada en monocapas, mostró aproximadamente un 40% del descenso de potencial, lo que sería coherente con la interpretación que sólo una hemicapa de las vesículas está expuesta a la hidrólisis con sPLA<sub>2</sub> (Figura P4.5 panel derecho). Tanto sPLA<sub>2</sub> de *Naja naja* como la de origen páncreas porcino presentaron esencialmente el mismo efecto. Hay que resaltar que la suspensión pre-incubada fue disuelta en cloroformo :metanol 2:1 en exceso antes de sembrar en monocapas, lo que anuló la actividad sPLA<sub>2</sub> por desnaturalización de la enzima.

El cambio de  $\Delta V$  no fue notorio respecto al control a presiones mayores a 40 mN/m.

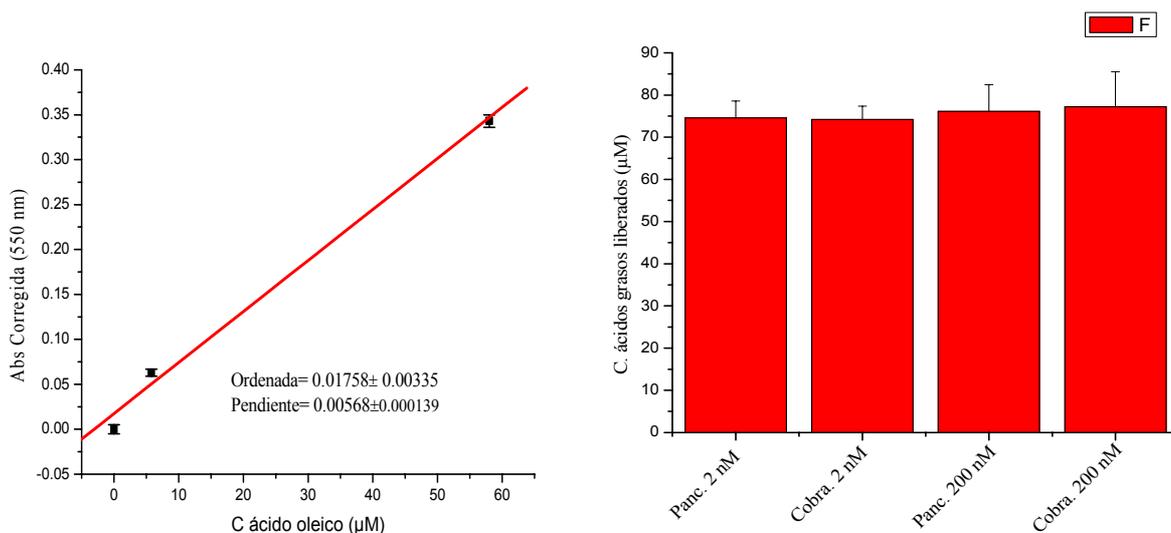
En una segunda etapa de uso de la línea SAXS 2 se pudo verificar que las diferencias entre las distintas fosfolipasas eran mínimas, observándose también para sPLA<sub>2</sub> pancreática el patrón que originalmente se había observado sólo para las de veneno (Figura P4.6).



**Figura P4.6. Efectos de sPLA<sub>2</sub> pancreática porcina sobre mielina.** Izquierda: difractograma integrado, por duplicado. Se observan los mismos picos que para el caso de *Naja n*. Derecha: ensayo con monocapas de mielina, se observa caída similar de potencial al inyectar sPLA<sub>2</sub> pancreática  $\approx 12$  nM, y un leve descenso de  $\Pi$ , también muy similar a sPLA<sub>2</sub> de *Naja N*.

## 5. Cuantificación de hidrólisis

Para relacionar los cambios estructurales observados en mielina con la acción hidrolítica de las sPLA<sub>2</sub>, se realizaron estudios complementarios de cuantificación de ácidos grasos liberados. Como en el caso de diferencia de medidas de caída de  $\Delta V$  en monocapas, no se observó gran diferencia entre las fosfolipasas, siendo, dentro del error experimental, indistinguibles las acciones de la sPLA<sub>2</sub> de veneno de cobra y de páncreas porcino (Figura P4.7). Usando 10 veces menos concentración (2 nM) que la usada en experimentos de SAXS, se observó lo mismo que usando 10 veces más (200 nM).



**Figura P4.7. Cuantificación de ácidos grasos liberados luego de acción de sPLA<sub>2</sub> en suspensión de mielina.** En el panel izquierdo se muestra la calibración con estándar de ácido oleico, y un ajuste lineal con peso usando el error de cada determinación. En el panel derecho se observa medidas por duplicado con propagación de errores luego de incubar mielina con sPLA<sub>2</sub> pancreática (bovina) y cobra (veneno *Naja N.*). Se cuantifican  $\approx 13$  nmoles de ácido graso libre (170 μL volumen reacción) por cada 120 μg de mielina (10 μL 12 μg/μL) peso post liofilización, colorimétricamente utilizando un kit de ensayo enzimático (ver Métodos).

## 5. Discusión

Se evidenció un notable efecto perturbador en la estructura de mielina por parte de sPLA<sub>2</sub>. Se observaron picos de SAXS que indican coexistencia de membrana nativa (7.7-8.0 nm) con una nueva distancia interlamelar ( $\sim 10$  nm) observada a menores temperaturas cuando no se incubaba con sPLA<sub>2</sub>, lo que se corresponde con la formación de una nueva fase “expandida”. Esto contrasta con un estudio similar pero con análisis estructurales por microscopía electrónica (Banik y col. 1976), que reportó que la estructura de mielina incubada con fosfolipasa era indistinguible de la no incubada al analizarla por microscopía electrónica. Esto puede deberse a las condiciones requeridas para el estudio que incluyen centrifugación y tratamiento de pellet de mielina con glutaraldehído y posterior recubrimiento metálico con OsO<sub>4</sub>. En este sentido podría estudiarse con fractura criogénica, como se ha hecho con mielina en otros casos (Martinez y col. 2000). Cuando se incubaba mayor tiempo la mielina, en ocasiones fue difícil reproducir el nuevo patrón de difracción. Se está analizando correlación con factores externos a la medida, como variación de temperatura post-

incubación. Esta ocasional irreproducibilidad explica por qué no se observó en su momento los nuevos anillos en el caso de pancreática y *Bd* sPLA<sub>2</sub>-II, durante la primera visita a la línea SAXS2.

En lípidos de mielina también se observó un alejamiento entre sucesivas superficies, sin evidenciarse separación de fases. La hidrólisis en monocapas en interfase aire/agua genera una disminución del potencial de superficie cuya magnitud depende de la  $\Pi$ . Se observó una disminución de diferencia de potencial eléctrico ( $\Delta V$ ) marcada cuando se trabajó con monocapas a 20 mN siendo menor a mayor  $\Pi$ . La incubación en suspensión hidrolizaría un 60 % del sustrato, quedando el restante porcentaje disponible para una posterior hidrólisis en la monocapa (caída de potencial de superficie: 15 mV). Esto sugiere que la bicapa lipídica sigue siendo una barrera para la enzima para alcanzar la hemicapa interna. Especulamos que, como la hidrólisis opera sólo en la hemicapa externa, esta induciría el incremento de la asimetría observado.

La distinción entre isoformas de “alta presión” (producen hidrólisis notable a 20 mN/m o más de monocapas de DLPC ), o de baja presión (no muestra hidrólisis a 20 mN/m) se pierde en el caso de mielina como sustrato.

Estos resultados son un ejemplo del poder de la técnica de SAXS, que tiene la ventaja particular de obtener información estructural de macromoléculas biológicas en muy diversos ambientes fisiológicos. Incluso en ciertas condiciones de membranas de bacterias vivas (Sekot y col. 2013). Es una técnica de baja resolución comparada con la cristalografía, debido a la promediación espacial obtenida por no estar la muestra en un arreglo regular (cristal), pero permite obtener datos como tamaño, forma y arreglos geométricos de macromoléculas de gran tamaño. Además, no precisa de marcación o tratamiento especial de la muestra como la microscopía electrónica (TEM) que puede inducir artefactos.

Parte de estos resultados fueron presentados en la Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica, en Instituto Leloir de Buenos Aires, 2011. A su vez, también se publicaron en el boletín de actividades del sincrotrón LNLS 2011 (*Myelin structure alteration mediated by pro-inflammatory agents: effects of nitric oxide and secretory phospholipase*. Yunes, P.J., Montich, G.G., and Oliveira, R.G.) y en el mismo del 2012 (*Myelin structural modifications induced by different phospholipases*. Yunes, P.J., Pusterla, J.M., Montich, G.G., and Oliveira, R.G.).

## **Parte 5. Método isocórico. Medidas de actividad fosfolipasa a área constante de monocapa lipídica.**

### **1. Objetivo**

Analizar la posibilidad de obtener información del óptimo de actividad de una sPLA<sub>2</sub> sobre monocapas de DLPC, usando un método a área constante con menores requerimientos técnicos para implementar y en forma más rápida que el método de barostato.

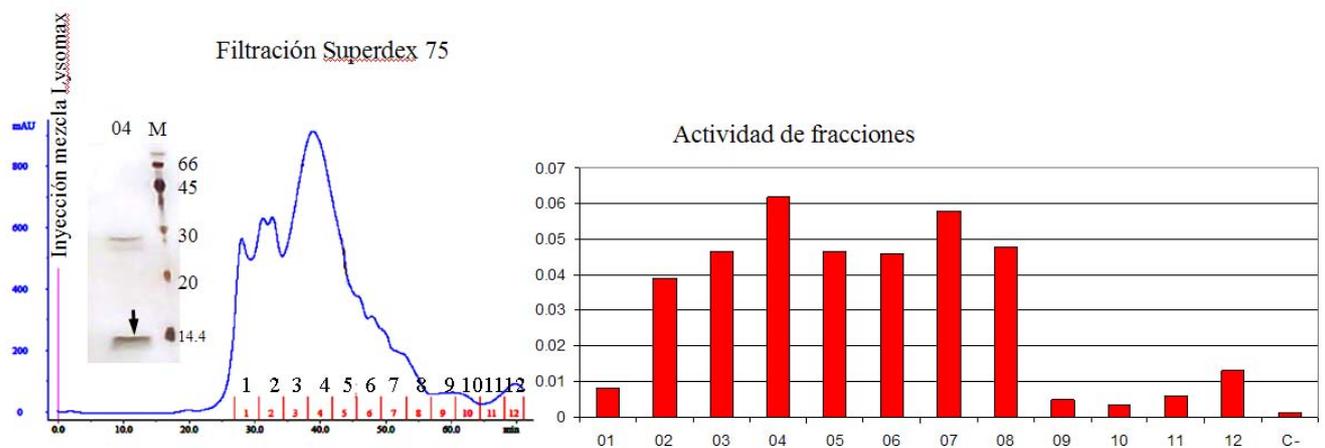
### **2. Resumen**

Se demostró que la información básica para analizar el óptimo de  $\Pi$  para hidrólisis de monocapas de DLPC puede obtenerse de ensayos a área constante (isocóricos), que tienen una gran ventaja de implementación respecto de los de barostato, al no tener la posibilidad de pérdida de lípido a través de la barrera (*leakage*) y poder usar volúmenes pequeños. Además, también puede estimarse la presión límite a la cual presenta hidrólisis. Esto se comprobó con diversas fosfolipasas secretadas ya caracterizadas (de páncreas, de venenos abeja, cobra y yarará chica). Además, se aplica el mismo método con la primera de origen bacteriano descrita (*Streptomyces violaceoruber*), y se coteja con el método usual de barostato.

### **3. Fosfolipasa secretada de origen procariota**

En el 2002 se describió por primera vez una sPLA<sub>2</sub> de origen procariota, perteneciente a *Streptomyces violaceoruber* (Sugiyama y col. 2002). Esta fue caracterizada estructuralmente a partir de trabajos de cristalografía de rayos X y RMN. Sólo posee dos puentes disulfuro y fue clasificada como grupo XV. Hasta la fecha no se encontró reportes donde se informe su presión óptima de actividad en monocapas de DLPC, ni otros estudios de catálisis en interfase agua /aire. Por esto, y por la disponibilidad de una preparación comercial gentilmente donada por el Dr. Ricardo Madoery, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias (UNC, Córdoba), fue elegida para determinar su óptimo de actividad por los dos métodos, el de barostato y el isocórico propuesto en este trabajo. La

preparación comercial (Food Pro™ LysoMax, Danisco) es un extracto enriquecido de cultivo de *Streptomyces violaceoruber*, bacteria no patógena, utilizado en el desgomado de alimentos. En ensayos previos este producto demostró tener actividad interfasial, ya que la inyección de 10 µL de la preparación producía un suave pero notable incremento en  $\Pi$ . Por esto se optó por enriquecer la muestra en sPLA<sub>2</sub> para eliminar compuestos tensioactivos. Para ello se hizo una filtración molecular (Figura P5.1, izquierda), analizando por el método colorimétrico los ácidos grasos liberados al incubar con el mismo sustrato a usar en monocapas (DLPC), pero en condiciones micelares (con triton) para detectar las fracciones con mayor actividad (Figura P5.1, derecha). De esta forma se eligió la fracción 4. Esta no presentó actividad interfasial en la cantidad usada (es decir, luego de la hidrólisis, no se veía un aumento de  $\Pi$  debido a adsorción de compuestos a la interfase).

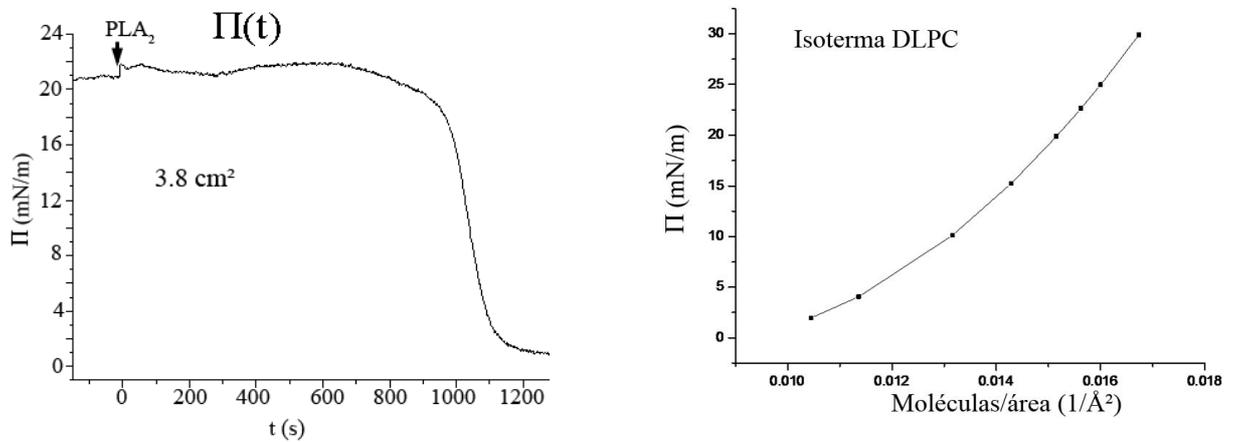


**Figura P5.1. Aislamiento de fracción enriquecida en actividad sPLA<sub>2</sub> de *Streptomyces violaceoruber*.** **Izquierda:** cromatograma de filtración en gel (Superdex 75) en NaCl 0.5M, tris 10 mM pH = 8 de inyección de 500 µL de solución LysoMax post centrifugación. Se indica la muestra de fracción 4 donde se observa mayoritaria banda coherente con peso de proteína en gel SDS-PAGE, tinción de plata (flecha vertical). **Derecha:** Cuantificación de ácidos grasos liberados, para cada fracción post Superdex 75. El DLPC sustrato se presentó en mezcla triton: DLPC 4:1 en *buffer* NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM, tris 10 mM pH=8, idéntico al usado en ensayos de monocapas. Absorbancias a 550 nm corregidas por dispersión luego de 15 minutos de incubado a 37 °C en agitación. Ensayo de ácidos grasos liberados por método colorimétrico enzimático.

#### 4. Descripción del método de detección de $\Pi$ óptima de hidrólisis en forma isocórica

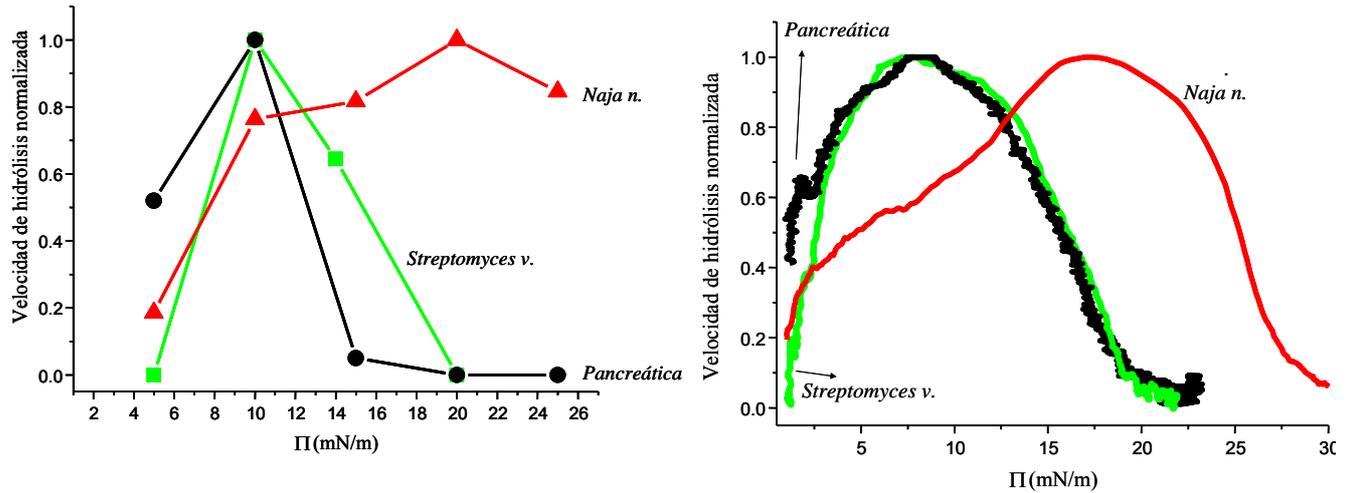
El método a área constante consiste en calcular el punto de inflexión de la curva de  $\Pi$  vs tiempo. Para observarlo, se debe usualmente hacer dos o tres siembras a distintas presiones para asegurarse estar levemente por encima de la presión óptima al sembrar la enzima. Nuestra experiencia indica que tendría que ser entre 12 y 15 mN/m si se sospecha que la enzima es de “baja

presión” (ver Parte 2) o entre 22 y 25 mN/m si se sospecha que es de “alta presión”. Al obtener una curva tipo sigmoidea (Figura P5.2, izquierda), puede convertirse de  $\Pi$  vs.  $t$  a  $\text{moléculas}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  vs.  $t$  usando una isoterma (que también puede hacerse puntual, es decir, sin compresión, por sembrado sucesivo de lípido, Figura P5.2, derecha). A partir de este gráfico se calcula el punto de inflexión por diferenciación numérica. El tiempo al cual ocurre indica la  $\Pi$  óptima en el gráfico  $\Pi$  vs  $t$  donde es mayor la velocidad de hidrólisis. Puesto que el DLPC tiene un comportamiento casi lineal entre las presiones usuales donde se encuentra este óptimo (entre 8 y 20 mN), en general el tiempo del punto de inflexión de la curva  $\Pi$  vs.  $t$  coincide con el de la curva  $\text{Moléculas s}^{-1} \text{cm}^{-2}$  vs.  $t$ , siendo la forma de la curva hasta los 2 mN/m muy similar a la de  $\Pi$  vs  $t$  (fig. ,izquierda).



**Figura P5.2. Izquierda.** Descenso de  $\Pi$  a área constante por acción de sPLA2 de *Naja naja*. **Derecha:** isoterma a área constante, por adición de lípido (DLPC), a partir de la cual se calcula la cantidad de moléculas que ocupan una dada área. Usando esta isoterma, se ajusta a una función y con esta se transforma la curva de la izquierda en  $\text{moléculas s}^{-1}\text{cm}^{-2}$  vs.  $t$ . Medidas a T ambiente y con misma subfase, en agitación continua. El valor de la función que relaciona  $\Pi$  vs moléculas/área se calcula a partir de varias isotermas.

Al calcular la derivada de la curva de Moléculas vs.  $t$ , y se grafica su valor absoluto reemplazando la coordenada de tiempo por  $\Pi$ , se obtiene un gráfico del mismo tipo que los perfiles de actividad usuales, es decir, velocidad de hidrólisis vs.  $\Pi$  (Figura P5.3). El máximo corresponde al óptimo, y se da al tiempo donde ocurre el punto de inflexión en curva Moléculas vs.  $t$ . Al comparar los valores de las tres enzimas entre los dos métodos, se observa una muy buena correspondencia, donde se mantienen las diferencias relativas. En estos casos estudiados se observa que la fracción obtenida de *Streptomyces v.* se comporta en forma similar a la pancreática, es decir, sería de alta presión.



**Figura P5.3. Comparación métodos barostato y área constante.** Se observa que la técnica de a área constante (derecha) en una sola medida permite reproducir en principio, la forma de curva obtenida con la técnica del barostato (izquierda). Los errores relativos (omitidos), están en general dentro del 10 a 15% , aunque la forma de la curva es sumamente reproducible cuando se normaliza, si la dilución de lípido se prepara fresca.

## 5. Discusión

Se caracterizó el comportamiento de hidrólisis en monocapas DLPC en agua/aire de una enzima de origen procariota, y a su vez, se propuso y demostró un método más simple y rápido para determinar los óptimos de presión lateral. Esto constituye un criterio más de comparación entre preparaciones enzimáticas y sugiere un criterio de clasificación de acuerdo al valor de  $\Pi$  de hidrólisis de DLPC óptima y de corte (cuando ya no se observa descenso de  $\Pi$ ). Este método permitiría trabajar en forma más rápida y requeriría menos equipamiento especializado al evitar el uso de barreras móviles y cubas con diseño especial para éstas.

## Conclusión

En este trabajo se logró obtener la secuencia completa de dos isoenzimas de fosfolipasas secretadas (sPLA<sub>2</sub>) de Yará Chica (*Bothrops diporus*) a partir de clonado de su secuencia codificante de ADN. También se corroboró su existencia a nivel de veneno mediante espectrometría de masas. Además, se expresaron ambas enzimas en *E. coli*, logrando su renaturalización, lo que permitió construir el perfil hidrolítico de cada una con la ventaja de evitar la posible contaminación con otra isoespecie o componentes del veneno. Ambas presentaron esencialmente el mismo comportamiento, teniendo escasa actividad sobre DLPC a 20 mN/m.

Por otra parte, se consiguió obtener secuencia proteica parcial de una nueva isoforma cuyo perfil de hidrólisis de monocapas de DLPC es diferente a las dos ya clonadas, presentando notable actividad a 20 mN/m. Esta información de secuencia, obtenida por espectrometría de masas, permitió compararla con las isoespecies clonadas.

Con el apoyo de simulación computacional, se logró establecer un vínculo entre estructura proteica de las fosfolipasa secretadas en general y óptimo de hidrólisis de DLPC en monocapas. Esto permitió, en el caso de estructuras modeladas a partir de información de secuencia primaria producida en este trabajo, hipotetizar los aminoácidos con mayor participación en la interacción con membranas lipídicas neutras. Así se postuló que la sustitución de 3 aminoácidos con mayor carácter hidrofóbico explicaría la diferencia entre las isoespecies clonadas de “baja presión” y la nueva isoenzima de “alta presión” identificada en este trabajo, siendo una isoenzima de “alta presión” aquella con los aminoácidos predichos más hidrofóbicos. Estos residuos aminoacídicos, ubicados en el extremo N-terminal y en un bucle interno, se hallan en regiones de íntima cercanía a la membrana, desde el lado de las cabezas polares del lípido. Un paso esencial a realizar es la corroboración *in vitro* de que efectivamente al mutar los aminoácidos por los residuos hidrofóbicos hallados, las proteínas recombinantes se conviertan en enzimas de alta presión (gran actividad a 20 mN/m).

Consideramos que el parámetro de óptimo de presión para hidrólisis de DLPC es un criterio más que puede servir a la clasificación de este tipo de enzimas, y remarcamos que las diferencias en dicho óptimo no son extrapolables a otros sustratos, como lo evidenció el estudio de la acción de enzimas proveniente de venenos y de páncreas sobre mielina.

Por último, se propuso un método isocórico (de área constante) para estimar el óptimo de hidrólisis en DLPC de forma más rápida y simple que el método usual de barostato. Este método se

validó con enzimas cuyo perfil hidrolítico de DLPC en monocapas era conocido, y también con enzimas que no tenían descrito tal perfil en literatura.

## Métodos

A continuación se describen los métodos usados para cada parte de esta tesis, en forma consecutiva. Los detalles de marcas de materiales, equipamiento y software utilizado están listados en la sección Materiales, donde se indica el o los proveedores, fabricantes o vendedores según la información disponible.

### Parte 1

#### P1.1. Homogeneización de glándulas

Las glándulas de veneno se obtuvieron de la cabeza de ejemplares de yarará chica a los que se les había extraído el veneno dos a tres días antes. Apenas se decapitaron, las cabezas se enfriaron en hielo por 15-30 minutos, se extrajo tejido de glándula de veneno y se pesó. Este se mezcló con 5 mL de solución desnaturante por cada gramo de glándula. La solución fue comercial, RNAagents denaturing solution conteniendo citrato de sodio 26 mM pH 4.0, N-lauril sarcosina 0.5%,  $\beta$  mercaptoetanol 0.125 M y tiocianato de guanidinio 4 M. El protocolo que se siguió fue muy similar al indicado en el manual de ese producto, que se basa, a su vez en el de (Chomczynski y col. 1987). La mezcla de glándulas con la solución desnaturante se homogeneizó con un equipo Ultraturax. Se alicuotó esa mezcla (1 mL por fracción) en microtubos plásticos y se congeló a  $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$  o se usó en el paso siguiente.

#### P1.2. Extracción ARN

Todos los tubos y puntas de pipetas automáticas que se usaron fueron previamente incubados con agua conteniendo DEPC (para inactivar ARNasas), autoclavados (para inactivar DEPC) y secados. Se trabajó con guantes, y en lo posible, sobre hielo. El protocolo general se basó en el indicado por el folleto de la solución desnaturante RNAagents (Promega).

Por cada volumen de mezcla homogeneizada de glándula con solución desnaturante, se añadió 0.1 vol de *buffer* acetato de sodio 2M pH=4 o lo mismo de solución de calibración de pH metro. Esto último disminuyó muchísimo la degradación. Por lo general, para distintos ensayos, la mezcla se alicuotó en 100  $\mu\text{L}$  por tubo (1 volumen), por lo que se agregó 10  $\mu\text{L}$  del *buffer* a pH=4.

Luego de equilibrar por inversión varias veces, se agregó un volumen (100  $\mu\text{L}$ ) de fase inferior, orgánica, de la mezcla de fenol : cloroformo : alcohol isoamílico 125 : 24 : 1 pH=4.7. Se homogeneizó por

agitación. Se dejó en hielo 15 minutos y luego se centrifugó a 10 000xg por 20 min a 4°C. Finalmente, la fase superior acuosa (contendría ARN) se extrajo a parcialmente a otro tubo, para evitar tomar interfase (contendría el ADN)

La fase superior acuosa aprox. 80 µL se suplementó con el mismo volumen de isopropanol a -20°C y se incubó 30 minutos a -20 °C. Luego se centrifugó a 10 000xg por 10 minutos, y se removió la mayor parte del líquido por volcado. Luego se agregó 1 mL por microtubo de Etanol 70% a -20 °C (para lavado), se centrifugó a 10 000xg por 10 minutos y se extrajo nuevamente el líquido por volcado. Se secó lo restante por incubado a 40 °C en bloque sólido, tubos abiertos, y todo el equipo tapado.

Finalmente se resuspendió en agua y se usó como molde de transcripción reversa, o bien, se controló por gel de agarosa y por absorbancia (relaciones de absorbancias a longitudes de onda 260/230 y 260/280

### **P1.3. Transcripción reversa**

El protocolo general está basado en el que figura en el manual de la enzima transcriptasa reversa MMLV de Promega. El siguiente es el esquema general para una reacción.

A 12 µL de la solución de ARN se le suplementó con 1.5 µL de oligo dT<sub>15</sub> 100 µM. Esta mezcla se incubó a 70 °C por 5 minutos. Luego, se agregó 5 µL del *buffer* de la enzima y 1.5 µL de dNTPs (10 mM cada uno), 17.5 µL de agua y 1 µL de transcriptasa reversa MMLV (200 unidades) y se incubó a 37 °C por 1 h. Esta mezcla es la denominada -RQ .

A otros 12 µL de solución de ARN se les agregó 1 µL RNasin (inhibidor de ARNAsas tipo A) y 1 µL (1000 unidades) de ADNasa RQ1 con 1.5 µL de su *buffer*. Esto se incubó por 30 minutos a 37 °C. Luego se agregó 1 µL de la solución stop y finalmente se inactivo la ADNasa a 65 °C por 10 min. 3.5 µL de esta solución fueron suplementados con 1.5 µL de oligo dT<sub>15</sub> 100 µM, y 10 µL de agua. Esta mezcla es la denominada +RQ. Estas soluciones se usaron a continuación para PCR o bien se congelaron a -20 °C.

### **P1.4. Diseño de oligonucleótidos iniciadores (*primers*)**

Utilizando como consulta cada secuencia aminoacídica obtenida por degradación de Edman a partir de isoformas de PLA<sub>2</sub> de veneno de yarará (Daniele y col. 1997), se hizo una búsqueda en base de datos de proteína. Se utilizó el servidor en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> con el programa provisto *on-line* Blast-p (Altschul y col. 1997), con ajustes automáticos para búsqueda de correspondencias cortas y casi exactas. Los resultados más similares se analizaron y usaron para ampliar la búsqueda en base de datos de ADN, para las secuencias codificantes de ARN (CDS) o genes. Así, como se describió previamente (ver Parte 1) se diseñaron los oligos a usar como iniciadores de PCR usando como molde genes de PLA<sub>2</sub> de víboras

asiáticas. Las secuencias de los oligos se muestran en la Tabla M.1. Utilizando el software NTI Vector se calcularon la temperatura de fusión de dímeros de oligo ( $T_m$ ) y su probabilidad de formar bucles sobre sí mismos (*hairpins*) y homodímeros.

Para el diseño de iniciadores de PCR para sub-clonar en el sistema de expresión, se excluyó el péptido señal. Para el caso del sub-clonado en el vector de pET15b+Ubiquitina, se agregó un sitio *Sac* II en el 5', y un sitio *Hind* III en el 3', junto con la cantidad de bases extra recomendadas por el fabricante de la enzima para lograr un corte de un fragmento de PCR con estos sitios en sus extremos.

| Nombre                             | Sentido | Secuencia (5' → 3')                     |
|------------------------------------|---------|---|
| Oligo 1 <sup>a</sup>               | F       | GGTCTGGATTTCGGGAGGATGAGG                |
| Oligo degenerado <sup>a</sup>      | F       | TGAGRRCTCTCTGGATAVTGGCCGT               |
| Oligo 2 <sup>a</sup>               | F       | CCGCTGCTGCTTTGTGCACGACTG                |
| Oligo 4 <sup>a</sup>               | R       | GCACCTGTTTATTACTCAGTATTGCATTC           |
| Oligo <i>Sac</i> II <sup>b</sup>   | F       | TCCCCGCGGTGGTARCCCTGGTGCAATTTGAGACGTTGA |
| Oligo <i>Hind</i> III <sup>b</sup> | R       | CCCAAGCTTCTGCAGAGACTTAGCATGG            |

**Tabla M.1. Oligonucleótidos usados como iniciadores de PCR** (R denota A o G, mientras que V es A, G o C). El oligo sentido (F) *Sac*II se pidió degenerado (mezcla equimolar) en la segunda posición del primer codón de PLA<sub>2</sub> para generar un conjunto de secuencias que codifiquen para proteínas que empiecen ya sea con N o con S. Los sitios de restricción están subrayados. Las bases extras en el extremo 5' se agregaron de acuerdo a las instrucciones del productor de la enzima a ser usada. <sup>a</sup> Oligos usados para amplificar ADNc de PLA<sub>2</sub> por PCR <sup>b</sup> Oligos usados para sub-clonar la porción de PLA<sub>2</sub> madura en el vector pET15b+Ubiquitina.

### P1.5. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La mezcla maestra de PCR fue: 80  $\mu$ L de *buffer* (GoTaq 5X), 8  $\mu$ L de dNTPs (10 mM cada uno), 8  $\mu$ L de oligo 4 antisentido (50  $\mu$ M) y 2  $\mu$ L (10 unidades) de la enzima Taq (GoTaq). A 12.5  $\mu$ L de esta mezcla se le agregó 1  $\mu$ L de oligo sentido 1 (50  $\mu$ M) o 7.5  $\mu$ L de oligo degenerado (100  $\mu$ M de mezcla de oligos que difieren en dos posiciones) o bien 1  $\mu$ L del oligo sentido 2 (50  $\mu$ M), ver Tabla 1. La solución con el ADNc se agregó de acuerdo a cada caso, 4  $\mu$ L para -RQ y 12  $\mu$ L para +RQ. El volumen final fue de 50 y se llevo añadiendo agua ultra pura estéril. El ciclo de PCR consistió en un primer paso a 95 °C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos de: 94 °C por 45 s, 58 °C por 40 s, y 72 °C por 60 s. El último paso fue de 72 °C por 10 min.

|  | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | C       |
|--|------|------|------|------|------|------|---------|
| H2O ( $\mu\text{L}$ )                                | 18   | 26   | 24.5 | 32.5 | 24.5 | 32.5 | 36      |
| Mezcla maestra ( $\mu\text{L}$ )                     | 12.5 | 12.5 | 12.5 | 12.5 | 12.5 | 12.5 | 12.5    |
| Oligo 1, 50 $\mu\text{M}$ ( $\mu\text{L}$ )          | -    | -    | 1    | -    | 1    | 1    | -       |
| Oligo 2, 50 $\mu\text{M}$ ( $\mu\text{L}$ )          | -    | -    | 1    | 1    | -    | -    | 1       |
| Oligo Degenerado 100 $\mu\text{M}$ ( $\mu\text{L}$ ) | 7.5  | 7.5  | -    | -    | -    | -    | -       |
| Molde RQ+ ( $\mu\text{L}$ )                          | 12   | -    | 12   | -    | 12   | -    | -       |
| Molde RQ- ( $\mu\text{L}$ )                          | -    | 4    | -    | 4    | -    | 4    | -       |
| Molde ADN ( $\mu\text{L}$ )                          | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.5     |
| <b>Fragmento Esperado (pb)</b>                       | 508  | 508  | 339  | 339  | 526  | 526  | 597-600 |

**Tabla M. 2: Mezclas realizadas para amplificación de secuencias de ADNc y control ADN genómico.** Molde RQ+ es aquel ADNc que se obtuvo con agregado previo de ADNasa a la solución de ARN y posterior inactivación. RQ- es la solución de ADNc sin ese tratamiento. Fragmento esperado es el tamaño calculado de acuerdo a los genes de isoformas de *Trimeresurus gramineus*. Para la mezcla T.8 se hay leves diferencias de acuerdo a isoformas en regiones de intrones.

### P1.6. Clonado y secuenciamiento

Los productos de PCR se corrieron en gel de agarosa (electroforesis) con bromuro de etidio. Las bandas se cortaron y se purificaron con kit. Este ADN se ligó con el vector pGEM-T Easy usando ligasa y *bufferes* provistos por el mismo kit, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Finalmente, las soluciones con las ligaciones sirvieron para transformar 60-80  $\mu\text{L}$  de suspensión con D.O $\approx$  40 en glicerol 10% de bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  por electroporación. Finalmente se centrifugó y se plaqueó en LB-agar con ampicilina y mezcla de IPTG-XGal. Esto ultimo para poder detectar las colonias transformadas (blancas) de las no transformadas (azules). Las colonias blancas se enviaron a MacroGen Corp, USA, para hacer minipreparaciones de ADN y secuenciar usando como primer el promotor T7 universal.

### **P1.7. Minipreparaciones de ADN**

Los plásmidos previamente propagados en cultivo bacteriano con selección de antibiótico, se extrajeron usando el método de lisis alcalina de extracción de ADN plasmídico (Xiang y col. 1994) basado en soluciones preparadas en el momento, o bien se utilizaron kits comerciales.

### **P1.8. Preparado de bacterias electrocompetentes y transformación**

Bacterias *E. coli* de la cepa deseada fueron dispersadas en placa de LB agar sin antibióticos e incubadas a 37 °C entre 15 y 18 h. Se picó colonia y se inoculó en 3 mL de LB líquido, dejándose en agitación por un período similar al anterior. Finalmente se inoculó entre 0.1 mL y 1 mL en cultivo más grande (50 a 100 mL), dejándose en agitación a 37 °C, controlando periódicamente la absorbancia aparente a 600 nm. Cuando se encontraba cerca de 0.8, las bacterias se centrifugaron a 3000xg por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Luego se hicieron 4 lavados con glicerol 10% estéril en agua ultra pura, empezando con el mismo volumen de cultivo, centrifugando, y resuspendiendo en la mitad del volumen anterior, en cada lavado. El pellet del último lavado se resuspendió en un volumen para lograr una suspensión entre 60 y 80 µL para electroporar. Esa suspensión tendría una D.O. próxima a 40.

Se usó cubetas de 2 mm lavadas con agua, etanol y agua ultra pura para agregar los 60 µL de la suspensión bacteriana con el plásmido a transformar. El pulso fue de 2.5 kV. Inmediatamente después se agregó 900 µL de LB fresco, estéril inmediatamente después (2 o 3 segundos después). Se resuspendió, y se dejó recuperar a 37 °C entre 15 y 45 minutos según el caso. Se hizo controles de las bacterias dándole el pulso sin agregado de plásmido, y luego plaqueándose en LB-Agar con antibiótico.

### **P1.9. Construcción de plásmidos de expresión**

Para amplificar por PCR las secuencias de interés se usaron iniciadores (primers) sentido y antisentido, conteniendo los sitios de restricción Sac II y Hind III en su secuencia y la polimerasa de alta fidelidad Pfu. Los moldes fueron los plásmidos de los clones deseados, que contenían ya sea la secuencia de *Bd sPLA<sub>2</sub>-I*, o *Bd sPLA<sub>2</sub>-II*. El programa de PCR fue esencialmente como el descrito para la amplificación del ADNc, cambiando la temperatura del paso de 58°C a 60 °C, y el tiempo de 45s a 30s. Esta temperatura fue determinada haciendo previamente un gradiente de temperaturas en ese paso en PCR con polimerasa Taq. Las secuencias de los oligos Sac II y Hind III se indican en la **Tabla M.1**. Los fragmentos amplificados se purificaron usando un kit. Luego fueron digeridos con las enzimas de restricción correspondientes (Hind III y Sac II), nuevamente purificados y finalmente incubados en una reacción con ligasa con el plásmido

(vector de expresión) previamente digerido con las mismas enzimas y purificado de la misma forma. Este plásmido, pHUE, un pET15b modificado con secuencia codificante para ubiquitina (Catanzariti y col. 2004). Luego de la ligación (4 horas a T ambiente), las mezclas se precipitaron con alcohol absoluto y acetato de sodio. Se centrifugó y se lavó con etanol 70% helado. Luego de esto se resuspendió en agua y se usó para transformar bacterias electrocompetentes *E. coli* DH5a.

La elección de los clones para enviar a secuenciar fue hecha por chequeo de banda de expresión proteica. Para esto se picaron varias colonias, se hizo mini preparación manual a partir de cultivos líquidos y se transformaron bacterias BL21 (DE3) inducidas con IPTG. Se chequeó por gel la presencia de la banda esperada. Los clones de los cultivos que producían una banda de 24 kDa en SDS PAGE se enviaron a secuenciar.

### **P1.10. Inducción de síntesis proteica en cultivos bacterianos**

Las cepas de bacterias *E. coli* BL21(DE3) se crecieron rutinariamente en placas de LB agar (Sambrook y col. 1989) a partir de stock (-75 °C en glicerol 10%) transformado con el plásmido de interés o partir de placa primaria luego de transformación. Se picó colonia con palillo o punta plástica y se inoculó en 3 mL por tubo a ensayar y se dejó crecer a por varias horas (15-18hs). Para el caso de tubos en paralelos, el volumen fue mayor y luego se dividió antes de poner a agitar. Se midió la D.O. de este cultivo primario (usualmente cerca de 3) y con éste se inoculó cultivo secundario (entre 50 y 250 mL de LB con ampicilina, poniendo entre 1/50 y 1/100 de cultivo primario). En caso de usar ampicilina como antibiótico, ésta estuvo en una concentración final de 0.1mg/mL, a partir de stock 100 mg/mL en etanol 70% (-20 °C), o bien, a partir de agregado de la droga sólida. La agitación fue orbital y próxima a 250 r.p.m. La inducción se hizo cuando el cultivo llegó a D.O.≈ 1.00. con el agregado de IPTG a concentraciones variables como prueba (desde 1mM hasta 0.01 mM final) así como temperatura variable (18, 30 y 37°C) por 16 a 4 h según la temperatura.

La D.O. final del cultivo con IPTG osciló entre 2 y 3. Para los casos de chequeo de expresión, se centrifugó 1 mL de cultivo de cada condición a 3 900xg por 5 minutos a T ambiente, descartándose el sobrenadante. El pellet se procesó con agregado de 100 µL PBS 1X, seguido de tres ciclos de congelamiento en aire líquido y descongelamiento a 37 °C. Se centrifugó 5 min a 14.100xg y se separó sobrenadante de pellet. Al sobrenadante se le agregó 30 µL de *buffer* de muestra y el pellet se resuspendió en 100 µL de PBS y 30 µL de este mismo *buffer*. Finalmente se corrió cada muestra en un carril de gel de poli(acrilamida) al 15 % (SDS-PAGE). Se sembró la cantidad necesaria para que todos los carriles tengan aproximadamente la misma masa, estimada a partir de la D.O.

También se probó como huésped de expresión la cepa de *E. coli* Origami (DE3), así como la co-expresión de proteínas chaperonas codificadas en un segundo plásmido. Las chaperonas dnaK-dnaJ-grpE se

indujeron con L-arabinosa y/o chaperonas groES-groEL (inducidas con tetraciclina) de acuerdo a las instrucciones del proveedor del plásmido pG-KJE8, TAKARA BIO INC, Japón.

La expresión de la enzima deubiquitinante (el núcleo catalítico USP2cc), se indujo con 0.4 mM IPTG durante 4 horas a 37 °C en *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con plásmido pET15 con la secuencia de la peptidasa, amablemente donado por el laboratorio del Dr. Rowan Baker a través del laboratorio de la Dra. M. Hallak. El protocolo básico se reporta en (Catanzariti y col. 2004) y consiste en un pasaje por columna de afinidad de Ni<sup>2+</sup> de sobrenadante de cultivo bacteriano inducido y homogeneizado. El *buffer* es fosfato pH=7.4 con agente reductor y glicerol 30%.

Cuando se confirmó la expresión en alícuota (1 mL) se llevó a cabo la homogeneización del total del cultivo bacteriano. El lavado y la solubilización de los cuerpos de inclusión se hizo tomando como punto de partida protocolos de renaturalización de enzima de *Naja naja* recombinante (Bianco y col. 1995; Kelley y col. 1992).

El pellet bacteriano centrifugado se resuspendió en 1/100 del volumen original, en sacarosa 25% P/V, tris 50 mM pH 7.4 (25 °C). La homogeneización se inició al agregar lisozima de huevo 0.2 mg/ml, EDTA 10 mM, NaCl 100 mM y β-ME 10 mM, incubándose la mezcla en hielo por 1 h, se verificó que la solución se tornase viscosa (liberación ADN). Después se hizo tres ciclos de congelado descongelado en aire líquido y baño de agua a 37 °C. Luego se agregó tanto ADNasa I como ARNasa A a una concentración final de 5 µg/mL, junto con MgCl<sub>2</sub> 5 mM. Se incubó a T ambiente hasta que la viscosidad de la mezcla se redujo marcadamente (30 a 60 minutos). A continuación se centrifugó a 12,000xg por 10 min, y se separó el sobrenadante. El pellet se lavó con tris 50 mM, 1 mM EDTA, 10 mM β-ME pH 8, y luego con el mismo *buffer* conteniendo urea 2M y triton X-100 2% v/v. El pellet restante (con cuerpos de inclusión proteicos) luego de centrifugar se continuó procesando para solubilizar la proteína o se guardó a -20 °C. .

### **P1.11. Solubilización, renaturalización y corte con peptidasa específica de ubiquitina**

Los cuerpos de inclusión lavados se disolvieron con Gdn.HCl 6M, tris 50 mM pH 8 y DTT 10 mM (alternativamente se usó β-ME 100 mM). Luego de disolución se centrifugó a 14,100xg por 10 min, se separó el sobrenadante y se filtró por una membrana de 100 kDa (Amicon 100K). La dilución del agente reductor se hizo por dia-filtración a través de un filtro de 10K. El volumen original se redujo un 90% y se restauró agregando solución de lavado sin reductor (Gdn.HCl 6M, tris 50 mM pH=8.5). Este proceso se repitió tres veces. Se ajustó el volumen de solución desnaturante en el último paso para lograr una concentración inferior a 0.2 mg/mL de proteína. Finalmente la solución se dializó por dos días contra un *buffer* de oxidación, conteniendo urea 2M, PEG 3350 0.2 g/L, EDTA 1 mM, L cisteína 10 mM, Tris 50 mM pH 8.5 en un vaso de vidrio destapado, a 4°C o temperatura ambiente, para promover re-oxidación (formación de disulfuros y re-naturalización). Se usó membranas de diálisis de 10 kDa.

Alternativamente se utilizó en el paso de solubilización un protocolo de sulfitólisis (añadiendo sulfito de sodio 0.3 M en vez de DTT), y posterior sulfonación con nitro tio sulfo benzoato (NTSB) que reacciona con tioles libres sulfonándolos, de acuerdo a los protocolos de (Thannhauser y col. 1987).

La preparación de NTSB se hizo de acuerdo al protocolo de (Petruccelli y col. 1995). Se pesó la cantidad necesaria de DTNB (reactivo de Ellman, ditionitrobenzoato) para lograr una solución 25 mM en  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  0.3M, chequeando que tenga pH=9. Tomó un color rojo intenso, se añadió  $\text{CuSO}_4$  0.1M en hidróxido de amonio de acuerdo a (Petruccelli y Añón 1995) como catalizador de oxidación, y se dejó en tubo tapado con algodón en agitación a 37 °C por varias horas. La coloración de la solución fue tenuemente amarillenta al final del proceso. Se congeló a -20 °C o se usó para sulfonar tioles libres.

El corte del extremo N-terminal con motivo ubiquitina se hizo al incubar la solución de la proteína de fusión con la peptidasa 6xH-USP2-cc en tris 50 mM pH 7 o 8.5 a 4°C, 25°C o 37 °C. La relación molar peptidasa : proteína de fusión varió entre 1:100 a 1:20. La presencia o ausencia del agente desnaturizante (urea hasta 2 M, o Gdn.HCl hasta 0.6 M) se probó. El tiempo de incubación varió entre 3 h y 2 días. La eficiencia del corte se estimó por densitometría de bandas de gel SDS-PAGE (banda 6xH-Ub 10,7 kDa).

### **P1.12. Análisis de geles de electroforesis en poliacrilamida - SDS-PAGE**

Luego de la corrida electroforética y la tinción, los geles teñidos con Azul Brillante de Coomassie se escanearon. Utilizando la banda de albúmina del marcador preparado en el laboratorio (se sembró de tres a cuatro carriles con cantidades crecientes de este marcador), se hizo un análisis digital para cuantificar por densitometría en relación a la banda de albúmina las proteínas presentes. De esta forma se estimó el rendimiento de expresión, de corte por peptidasa y de renaturalización

### **P1.13. Cromatografía de afinidad por níquel**

La remoción de las proteínas marcadas con tándem de histidinas (6xH-Ub, 6xH-USP2-cc y lo no cortado de 6xH-U-SPLA2) se hizo por IMAC, tanto en condiciones sin agente caotrópico como con guanidinio 6M, eluyendo con concentraciones creciente de imidazol o por descenso de pH. Para el caso de la peptidasa 6xH-USP2-cc, la purificación se llevó acabo esencialmente como se describió en (Catanzariti y col. 2004), probándose la variante en columna en vez de discontinuo en tubo (*batch*).  $\beta$ -ME se agregó hasta una concentración final de 20 mM, y las alícuotas se conservaron a -20 °C, minimizando los ciclos de congelado descongelado a dos para cada una.

### P1.14. Ensayos de actividad fosfolipasa

La actividad PLA<sub>2</sub> se chequeó por tres métodos. El indirecto de hemólisis indirecta de glóbulos rojos en agar / yema de huevo, el usado en monocapas en sus dos variantes (área constante y barostato), y el de cuantificación de ácidos grasos liberados mediante el método discontinuo, enzimático (ver introducción para detalles).

Como análisis de bajo costo y gran simplicidad para detectar actividad PLA<sub>2</sub> en varias muestras en paralelo, se utilizó el método de hemólisis indirecta de eritrocitos en agar : yema de huevo, en forma similar a como se describe en (Gutierrez y col. 1988; Habermann y Hardt 1972). El volumen por pocillo fue de 15  $\mu$ L, agregándose siempre como control positivo una solución de 1 $\mu$ g/ $\mu$ L de PLA<sub>2</sub> de páncreas porcino en PBS, y como control negativo, PBS. Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C. Cuando se observó halos se asoció a actividad fosfolipasa

En el caso del método de monocapa, se siguió la actividad de la muestra de interés siguiendo el descenso de área de una monocapa de dilauril sn2 fosfatidilcolina (L-DLPC) en una interfase agua:*buffer* acuoso (tris 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM, NaCl 105 mM, pH=8.0 a 25°C), manteniendo la presión lateral constante en forma automática por compresión de una barrera superficial en contacto con la interfase (barostato de superficie) esencialmente como se describe en (Bianco y col. 1989; Bianco y col. 1990; Bianco y col. 1991; Daniele y col. 1995; Verger y De Haas 1973). También se siguió sin utilizar barreras, manteniendo el área constante, verificando el descenso de (II).

Las monocapas del lípido se formaron al dispersar entre 15 y 30  $\mu$ L de una solución en cloroformo : metanol 2:1 (v/v), a partir de una dilución a concentración final 0.50 mM de DLPC. El control de la barrera y la medición de la presión lateral se hizo con un equipo circular armado por el Dr. Maggio o bien con el sistema de KSV-Minitrough system (KSV Instruments Ltd., Finlandia). La temperatura ambiente varió entre 21 y 27 grados, manteniéndose la temperatura de la cuba soporte entre 24.7-25.3 °C, con un recirculador de agua termostatazada y un termómetro digital inmerso en el compartimento de reacción. El compartimento de reacción fue de forma cilíndrica para las medidas en KSV, (ver figura...), 2.2 cm de diámetro y 1 cm de profundidad. La barra magnética, recubierta de plástico, para agitar la subfase fue de 4 mm longitud, 1.5 mm de diámetro, el agitador magnético se puso por debajo de la cuba de teflón, agitando a ~180 r.p.m.). El perímetro de la placa Wilhelmy de platino fue de 3.4 cm. Este compartimento de reacción está conectado a otro, de forma rectangular, que actúa como reservorio de lípido a través de una ranura angosta y poco profunda (1 mm).

El área molecular de DLPC se estimó a partir de la masa depositada, asumiendo que la totalidad de las moléculas quedan en la interfase, y el área total de la interfase. La relación entre la densidad molecular (recíproca del área molecular) respecto a la presión lateral registrada, se hizo registrando isotermas de compresión a la misma temperatura, solución *buffer* en subfase y condiciones de agitación que el experimento de hidrólisis. También, se hizo una isoterma por agregado de masa (lípido), sin utilizar barreras

para comprimir. Con esta información se obtuvo la relación entre  $\Pi$  y la densidad superficial de moléculas. Los cambios de área o  $\Pi$  según sea el caso, se registraron por un mínimo de 10 min previo inyección, para controlar que no existiese un gran cambio (por pérdida de moléculas o *leakage*) o actividad PLA<sub>2</sub> residual de un experimento previo. Para el caso de barostato, los cambios de área se registraron por un mínimo de 10 min. Para el caso de área constante, se registró hasta que la  $\Pi$  llegara próxima a 0 mN/m. En general si el valor absoluto de la pendiente del cambio de área previo a inyección era mayor a 0.001 cm<sup>2</sup>/min, se lavó la cuba nuevamente, y la barrera. El lavado de cuba consistió en incubar con NaOH 2M a 80-85°C por 5 minutos, seguido de recuperación de ese NaOH, y enjuague con agua destilada, etanol, y agua destilada. Cuando se cumplía la condición de no tener una línea de base pronunciada previa inyección, se procedía a agregar la enzima en la subfase con pipeta automática y punta descartable, introduciéndola en un orificio al costado del compartimento de reacción, para lograr inyectar por debajo de la monocapa. La masa de proteína inyectada fue del orden de 0.3 µg, usualmente en un volumen entre 10 y 20 µL para construir los perfiles de actividad

Luego de inyectar se registró el cambio de área con respecto al tiempo. En caso de no haber cambio de área (presiones laterales próximas a la presión de corte de actividad o *cut-off* se esperó un máximo de 30 minutos). El ajuste lineal se hizo por cuadrados mínimos en la porción de los últimos 5 minutos registrados pre inyección y los 5 minutos donde se observaba un comportamiento lineal en la post inyección. El tiempo de latencia o retraso (*lag time*) se calculó como el intervalo entre el momento de inyección y el punto de corte entre las rectas ajustadas post y pre inyección.

En forma alternativa, para cuantificar la cantidad de ácido graso liberado en suspensión, se utilizó el método colorimétrico enzimático (kit NEFA, Wako Chemicals), descrito en la introducción. El sustrato fue presentado en mezcla dlpc: triton 4:1, en mismo *buffer* de ensayo de monocapas. Luego del tiempo deseado de incubado con enzima, a la temperatura deseada, se procedió a agregar el reactivo A. Se incubó 5 minutos a 37 °C, y a continuación se agregó el reactivo B (1/3 de vol. De reactivo A). Luego de 8 min a 37 °C se midió a absorbancia a 550 nm . Se hicieron blancos de reactivo en paralelo sin agregar los reactivos, reemplazando el volumen por H<sub>2</sub>O, para descontar la turbidez.

## **Parte 2: Veneno y espectrometría de masas**

### **P2.1. Cromatografía de exclusión molecular**

El agua y los *bufferes* utilizado se filtraron por 0.22 µm. 20 mg de veneno sólido se disolvieron en 1 mL de formiato de amonio 50 mM pH=4.5 frío (4 °C) en el día, homogeneizando por vórtex por unos minutos. Se conservó en heladera. Antes de inyectar en la columna se centrifugó a 14.100xg por 5 minutos.

El volumen de inyección fue entre 300-400  $\mu$ L. La columna usada fue Superdex 75 HR 30/10, equilibrada con *buffer* de corrida. *Buffer* de corrida: Tris 10 mM, NaCl 0.5M, pH=8.0 (a 25 °C). El volumen de cama asumido fue de 24 mL. El flujo utilizado fue 0.4 a 0.5 mL/min, las fracciones colectadas fueron de 1.5 mL.

### **P2.2. Cromatografía de intercambio aniónico**

La columna utilizada fue Mono Q 5/50 GL, utilizada con un flujo de 1mL/min, lavada con 5 volúmenes de NaCl 2 M, y luego con 10 volúmenes de *buffer* de unión. *Buffer* de unión (Bomba A): Tris 10 mM pH=8.00, conductividad entre 0.5 y 0.8 mS/cm a T ambiente. El agua mono Q presentó una conductividad de 0.02mS/cm aproximadamente. Para evitar aumento de fuerza iónica por ajuste con NaOH o HCl, el *buffer* Tris se agregó en forma sólida en su forma básica y ácida (Tris base y Tris.HCl). *Buffer* de elución (Bomba B): Tris 10 mM, NaCl 0.25 M pH=8.0, con una conductividad cercana a 25 mS/cm. Luego de la inyección de la muestra (entre 1 y 10 mL), se pasó al menos 10 volúmenes hasta que la absorbancia UV (280 nm) y conductividad no cambiaran. Se colectó lo no retenido. A partir de ese momento se inició el gradiente. Usualmente fue de 0% B a 100% B en 30 minutos. Se recogieron fracciones coincidentes con los picos de absorbancia. Para disminuir la mezcla con la fracción previa se colectó dos fracciones por pico en lo posible, analizando la segunda.

### **P2.3. Desalado de muestras**

Para el pasaje por Mono Q, las muestras se desalaron bien por diálisis (3kDa) o bien por diafiltración (Amicon 3 kDa, a 6500xg entre 15 y 25 minutos por pasaje). Siendo esta última técnica la más confiable.

### **P2.4. Reducción, alquilación y tripsinización de muestras**

Las muestras a analizar por MALDI-TOF TOF se incubaron en *buffer* bicarbonato de amonio 50 mM, urea 8M, DTT 10 mM por 1 h a 37 °C, y luego se agregó iodoacetamida a una concentración final de 50 mM. Finalmente se corrió en gel SDS-PAGE la muestra, se tiñó el gel y se recortó la banda de interés con bisturí.

También se hizo reducción y alquilación en el gel en algunos casos, para esto se incubó el gel con 500 mM DTT, Gdn.HCl 6M en *buffer* bicarbonato de amonio 50 mM por 15 minutos a 80

°C. Luego se descartó la solución y se lavó con *buffer* bicarbonato de amonio en agitación por 5 minutos para limpiar restos de Gdn.HCl. A continuación se incubó con iodoacetamida (IAA) 0.7 M por 1 h a T ambiente, protegido de luz.

Las muestras en gel se incubaron con acetonitrilo 100% para deshidratar el trozo de gel, en agitación por 15 minutos. Se extrajo el acetonitrilo y se repitió el proceso. Se dejó secar el gel en el microtubo unos minutos en campana de flujo laminar, con aire filtrado. Finalmente se hidrató con una solución de bicarbonato de amonio 50 mM con tripsina grado espectrometría de masas (2 µg/mL). Alternativamente, la solución contuvo 100 mM DTT. Los péptidos obtenidos post tripsinización se extrajeron con dos lavados sucesivos en acetonitrilo. Se liofilizó ese sobrenadante, y se resuspendió en TFA 0.1%. Se desaló por pasaje por resina C18 (OMIX)

## **P2.5. Geles 2D y estimación punto isoelectrico**

Las instrucciones generales son las que se hallan en el manual del proveedor del kit de limpieza de muestra y tiras de gradiente de pH, *2D Electrophoresis. Principles and Methods*, de GE Healthcare.

La muestra proteica a ser isoelectroenfocada fue limpiada de sales con el kit 2-D Clean Up (GE Healthcare), siguiendo el protocolo A del manual (80-6429-60 AC), apoyando los tubos en hielo y con centrifuga a 4 °C. La proteína final, precipitada y seca, se resuspendió en 146 µL de urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4% P/V, con dilución 1:200 (0.5% V/V) de *buffer* IPG 4-7, DTT 17 mM (agregado sólido en el momento). Luego de media hora de agitación se agregó iodoacetamida sólida para Cf=80 mM, y se dejó agitando por una hora protegida de la luz.

El gel de la primera dimensión (tira de gradiente de pH inmovilizado, o IPG) fue una tira de 7 cm con un gradiente lineal de pH de 4 a 7 (Immobiline DryStrip pH 4-7, 7 cm). Esta se hidrató por inmersión y agitación en un tubo plástico de 15 mL conteniendo 2.5 mL de la misma solución de muestra, exceptuando el DTT: urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4%P/V, *buffer* IPG 4-7 0.5% V/V.

La carga de la muestra en la tira se hizo aplicando con pipeta los  $\approx$  150µL de muestra reducida en el compartimento de la tira ya hidratada, y apoyando ésta sobre la solución.

El isoelectroenfoco (primera dimensión) se llevó a cabo con muestras reducidas y alquiladas. Una vez terminado el programa la tira de gel se colocó sobre un gel SDS-PAGE junto con marcador de peso molecular y se hizo la electroforesis (segunda dimensión). A continuación se describen el protocolo seguido para estos dos pasos.

El isoelectroenfoco se realizó en un equipo Ettan IPG Morph Manifold. El programa consistió en 1 etapa *step and hold* de 30 min a 300 V, una segunda etapa de gradiente creciente de voltaje, por 30 min hasta

llegar a 1000 V, una tercera etapa de gradiente por 90 min hasta 5000 V, y finalmente una cuarta etapa de *step and hold* hasta acumular 2000 Vh.

La segunda dimensión consistió en un gel 15% SDS-PAGE convencional. Para esto se colocó la tira de 7 cm sobre la parte superior, hacia un extremo. En el extremo libre (aprox.1 cm) se colocó un papel de filtro en el que previamente se había embebido el marcador de peso molecular. Finalmente se corrió a corriente constante, un primer paso a 15 mA por media hora, y luego por una hora y media aproximadamente a 30 mA.

El punto isoeléctrico se determinó por ajuste de la posición de la marca de proteína de interés respecto a la distancia a los extremos del gel (distancia de la tira de isoelectroenfoque). Con esta información y la variación de pH de acuerdo a la posición en la tira, provista por el fabricante, se calculó el punto isoeléctrico de la muestra proteica (desnaturalizada).

## **P2.6. Tinción de geles**

Los geles de chequeo fueron teñidos con Azul Brillante de Coomassie R250 0.1%P/V en Etanol 40%, Ác. Acético 10%, con agitación. En los casos que se requería rapidez, se calentó a 80°C por 30 minutos con agitación intermitente. El mejor resultado se observó sin calentar, dejando hasta el día siguiente. La destinción del gel para visualizar las bandas se llevó a cabo con sucesivas incubaciones con Etanol 10%, Acético 5%.

Alternativamente, se utilizó la técnica de tinción de Azul Brillante de Coomassie coloidal. En estos casos, el paso inicial fue fijar el gel con Etanol 40%, Acético 10% por 1 hora. Luego de enjuagar con H<sub>2</sub>O, se agregó la mezcla de Coomassie coloidal: sulfato de amonio 10% P/V, ácido ortofosfórico 1% V/V, Azul Brillante de Coomassie G-250 0.1%, etanol 20% V/V, dejando en agitación hasta el día siguiente. Se enjuagó con agua finalmente para remover el colorante libre.

La técnica de tinción de plata consistió en incubar la proteína con solución fijadora (etanol 50%, acético 10%, formaldehído 0.018% V/V) al menos media hora. Luego se lavó con etanol 50% por 5, 10 y 15' reponiendo el etanol 50% cada vez. Después se sensibilizó el gel con tiosulfato (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0.002% P/V preparado en el momento) por 30 a 60 segundos. Se enjuagó con H<sub>2</sub>O tres veces, 1 minuto cada vez. Se agregó la solución de tinción de nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub> 0.2% P/V) y se dejó en agitación por 20 minutos. Se lavó con H<sub>2</sub>O tres veces. Se incubó con solución de revelado (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 3% P/V, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0.0004% P/V, formaldehído 0.018% V/V) hasta ver las bandas proteicas con la intensidad deseada. Finalmente se detuvo el revelado sumergiendo el gel en ácido acético al 10% V/V.

### **P2.7. Protocolo de destinción de geles teñidos con Azul Brillante de Coomassie .**

Cada trozo de gel conteniendo la banda proteica se trató de la siguiente forma. En microtubos plásticos (tipo *ependorf* ) se cubrieron con *buffer*/acetonitrilo (50%v/v). El *buffer* a utilizar fue 0.2M bicarbonato de amonio ((pH≈8.3, óptimo para la digestión posterior con tripsina). Se agitó por 30 minutos y se descartó el líquido. Se repitió una vez o dos veces hasta tanto la banda perdió su color azulado a simple vista. Se agregó acetonitrilo 100%, agitando por 5-10 minutos y se retiró. Se dejó secar el trozo de gel en flujo laminar, con tubo abierto.

### **P2.8. Protocolo destinción de geles teñidos con plata.**

Cada trozo de gel de interés se cubrió con solución de  $K_3(FeCN_6)$  15 mM y  $Na_2S_2O_3$  50 mM (preparada en el momento). Se agitó 10 min y se descartó el sobrenadante. Se repitió una vez. Luego se lavó dos veces con agua MQ, y se agregó *buffer* bicarbonato de amonio 0.2 M (pH≈8.3). para equilibrar el gel. Se agitó con esta solución por 20 minutos. Luego se descartó el sobrenadante y se agregó acetonitrilo puro, dejándose 5-10 minutos. Finalmente se extrajo y se dejó secar el trozo de gel en flujo laminar con tubo abierto.

### **P2.9. Paso alternativo, alquilación de muestras en gel**

En algunos casos se llevó a cabo la reducción y alquilación de las muestras en bandas de gel. Para esto se agregó 80  $\mu$ L de solución reductora (Gdn.HCl 4 M, DTT 0.5M, AMBIC 40 mM) a cada trozo de gel y se incubó 15' a 80 °C. Se dejó enfriar y se removió el líquido. Se agregó 75  $\mu$ L de solución alquilante (IAA 0.9 M, AMBIC 50 mM preparada en el momento) y se dejó incubando en agitación protegido de la luz a temperatura ambiente por 30-45 min. Finalmente, se extrajo la solución y se enjuagó por 10 min con 100  $\mu$ L de metanol 50% AMBIC 50 mM. Se removió y se deshidrató el gel incubando con 200  $\mu$ L de ACN 100% hasta observar que el gel se pusiera blanco. El último paso consistió en retirar el ACN y dejar secar el gel en campana de aire filtrado, listo para el paso de digestión con tripsina.

### **P2.10. Digestión con tripsina de banda proteica en gel**

La dilución de trabajo de tripsina se preparó diluyendo 2  $\mu$ L de stock (conservado a -20 °C, concentración próxima a 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L) agregando 30  $\mu$ L de *buffer* bicarbonato de amonio 50 mM (pH≈8.3). Se

agregó 10  $\mu\text{L}$  por cada trozo de gel seco previamente desteñado. Luego de unos minutos se agregó más *buffer* para cubrir completamente el gel. Se cerro el tubo y se dejó a 37°C toda la noche, o al menos 4 horas.

### **P2.11. Extracción de los péptidos tripticos.**

Se acidificó por adición de 1% TFA a trozo de gel. Se agitó unos minutos y se tomó sobrenadante guardándolo. Luego se cubrió el trozo de gel con 0.1%TFA / 60% acetonitrilo V/V y se agitó por 1 hora. Se repitió el paso una vez, guardando el sobrenadante. Finalmente, el sobrenadante juntado se secó por evaporación rotatoria por 30 a 50 minutos. En algunos casos, se congeló (observándose separación de fases) previo a evaporación. Se evitó llegar a sequedad.

Esta solución se mezcló con matriz (ácido cinapínico saturante en TFA 0.1%, ACN 60%) o bien se desaló en un paso subsiguiente por pasaje con resina en micropunta de pipeta (OMIX C18y POROS). Para esto, se agregó a la resina en las puntas OMIX C18 entre 2 y 3  $\mu\text{L}$  de una suspensión de resina POROS. Finalmente se lavó la resina con ACNN 60%, TFA 0.1% seguido de un paso de equilibrado con TFA 0.1%. Hecho esto, se succionó y expulsó varias veces la solución con péptidos en TFA 0.1% (entre 15 y 20 veces por muestra) para asegurar la unión de los péptidos a la resina. La elución se hizo agregando 2.5  $\mu\text{L}$  de solución de  $\alpha$ -Ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) saturante en ACN 60%, TFA 0.1% a la parte superior de la micropunta y expulsando sobre la placa de MALDI. Se secó bajo flujo de aire filtrado en campana.

### **P2.12. Modificación de péptidos para fragmentación químicamente asistida (CAF)**

La péptidos extraídos de gel, en TFA 0.1% se cargaron por pipeteo sucesivo, sobre la resina en punta (*tip*) para micropipeta OMIX C18. Luego se lavó esta pasando 15  $\mu\text{L}$  TFA 0.1% y finalmente 15  $\mu\text{L}$  de bicarbonato de sodio 0.25 M pH=9.4. Recién en este momento se disolvió el sólido del reactivo comercial provisto en el kit Ettan CAF-MALDI Sequencing en el *buffer* provisto e inmediatamente se hizo pasar por pipeteo esta solución sobre los péptidos adsorbidos en las puntas con C18 (OMIX). Se hizo este pasaje por pipeteo (succión y expulsión) durante tres minutos. Finalmente, se hizo pasar de la misma forma la solución STOP y se lavó con 0.1% TFA.

La elución sobre la placa de MALDI de los péptidos adsorbidos y modificados se hizo agregando 2.5  $\mu\text{L}$  de CHCA saturante en ACN 60%, TFA 0.1%.

### P2.13. Espectrometría de masas

El primer paso fue calibrar la placa con estándares previamente depositados en mezcla con CHCA. Se utilizó un estándar compuesto por 4 péptidos que cuyas masas ( $M+1H^+$ ) son: 904.468 (des-Arg<sup>1</sup>-bradiquinina), 1296.685 (angiotensina-1), 1570.677 (Glu<sup>1</sup>-fibrinopéptido B), 2093.087 (ACTH 1-17) y 2465.199 (ACTH 18-39). Estos valores sirvieron como calibración externa para las huellas peptídicas (modo reflectrón). A su vez, la fragmentación del 1296.685 sirvió como calibración de los valores de masas obtenidos (MS/MS). Para la calibración del modo lineal se utilizó una mezcla de proteínas cuya masa ( $M+1H^+$ ) son: 5734.59, 44674.48, 16952.56

Para obtener información de tamaño de moléculas enteras se utilizó el modo positivo del equipo. Para obtener huella peptídica y la fragmentación se utilizó el modo reflectrón. No se utilizó la cámara CID (disociación inducida por colisión)

### P2.14. Tratamiento de datos de espectrometría de masas

El software con que controló el equipo y se obtuvieron los datos fue 4000 Series Explorer. El software con que se analizaron y exportaron los datos fue Data Explorer 4.0. El tratamiento para las huellas peptídicas consistió en hacer una corrección automática de línea de base y un suavizado tipo Gaussiano. Se controló la calibración con el valor de péptido auto-lítico de tripsina (2211 Da). Usualmente el error es menor a  $\pm 0.1$  Da. También se observó otro péptido de tripsina en ocasiones, el 1794

Usualmente la relación señal/ruido (S/R) para considerar un pico se fijó en 20. Ocasionalmente, cuando a inspección visual se observaba espectro ruidoso o con baja intensidad, se aumentó la astringencia a  $S/R=30$ . Se consultó también el sitio [www.abrf.org](http://www.abrf.org) en el apartado Delta Mass para localizar las modificaciones usuales.

### P2.15. Búsqueda en bases de datos

Se hizo con el servidor Mascot (<http://www.matrixscience.com>) en forma *on-line*. Se utilizó búsqueda de *Sequence query* ( huella peptídica con información de fragmentación) y búsqueda MS/MS (datos de fragmentación de péptidos con sus intensidades).

Los parámetros de búsqueda se detallan a continuación. La base de datos se eligió NCBIInr, y ocasionalmente se hizo una segunda búsqueda en base de datos EST. En sección taxonomía se redujo la búsqueda a vertebrados óseos (*bony vertebrates*). Se trató la información con digestión teórica de tripsina, tolerando hasta un corte fallido (el fallo es más probable en C-terminal de lisina). Para detectar péptidos en el

N-terminal se probó también con corte semi-tríptico. Las modificaciones a considerar en la búsqueda fueron variables: Oxidación de metioninas, carbaamido metilación de cisteínas (por tratamiento con iodoacetamida) y formación de piro carbamido metil cisteína (ciclación cisteínas carbamidometiladas en N-terminal).

La tolerancia de error en la búsqueda de masas de péptidos fue  $\pm 0.1$  Da, y en masas de fragmentos (MSMS) fue de  $\pm 0.3$  Da. La carga del péptido fue +1, y el equipo usado MALDI-TOF-TOF.

### **Parte 3: Estructura y energía de unión a membrana. Interacción teórica de sPLA<sub>2</sub> con membranas neutras y su relación con el óptimo de hidrólisis experimental**

#### **P3.1. Descripción somera del método computacional**

Para simular la interacción entre proteína y membrana se usaron potenciales basados en estructura de partículas. Los residuos de aminoácidos se representaron como una sola unidad centrada en el carbono alfa ( $\alpha$ ), asignándosele a cada uno un potencial de interacción de acuerdo a seis clases definidos como coeficientes de partición. La bicapa lipídica también se simplificó como 5 zonas discretas correspondientes a zona acuosa, zona de cabeza polar, zona central hidrofóbica, y nuevamente zonas polar y acuosa respectivamente.. Finalmente, la energía de unión entre la interfase y una proteína dada se calculó en una corrida de dinámica molecular discreta usando el potencial de interacción de cada tipo de aminoácido pesado por su área superficial expuesta. La calibración de los parámetros se hizo con datos de unión experimentales de proteínas con estructura resuelta. En la calibración, la afinidad de unión se estimó calculando la función de partición en una aproximación de cuerpo rígido. Este trabajo fue realizado por el Dr. Villarreal, del Departamento de Matemática de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC.

Las enzimas con secuencia conocida, pero cuyas estructuras no estaban depositadas en el Protein Data Bank ([www.rcsb.org/](http://www.rcsb.org/)) se construyeron por homología utilizando servidores *on-line*, i-Tasser (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>) (Zhang 2008) y Swiss Model, <http://swissmodel.expasy.org/> (Bordoli y col. 2009), a partir de secuencia primaria completa, en modo automático en ambos casos

## **Parte 4: Efectos estructurales de sPLA<sub>2</sub>s sobre mielina**

### **Parte 4.1. Purificación de mielina y sus lípidos**

El material de partida utilizado fue médula espinal bovina, y el protocolo general se basó en literatura (Haley y col. 1981) . Consistió en varios *shocks* osmóticos y centrifugaciones en gradiente de densidad (sucrosa). Luego de enjuagues con agua la mielina se liofilizó y se guardó a -70 °C.

### **Parte 4.2. Medidas de dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS)**

Las medidas de SAXS se llevaron a cabo en la línea DO2A:SAXS2 del *Laboratório Nacional de Luz Síncrotron*, Campinas, Brasil. La mielina liofilizada se resuspendió en *buffer* NaCl 145 mM, Hepes 10 mM pH=7.4, 2 mM Ca<sup>2+</sup> a una concentración de 12.5 mg/mL, haciendo ciclo de enfriado (aire líquido) y descongelado a 37 °C para mejorar la hidratación. Ocasionalmente se hizo pasar por aguja (G25) varias veces hasta que a simple vista resultara homogénea la suspensión. Se hizo agregado de sucrosa en algunos casos para mejorar la señal al disminuir la velocidad de precipitación. En los casos que se añadió fosfolipasa a concentración final  $\approx$  20 nM, se incubó con esta temperatura ambiente o a 37 °C por 1h. Los controles fueron hechos en paralelo sin añadir fosfolipasa. En algunos casos se añadió EDTA a Cf 10 mM para parar la reacción, y en los tubos controles. Finalmente, con la ayuda de una jeringa plástica se introdujo la suspensión de mielina en el receptáculo de muestra, conteniendo dos ventanas de mica. La longitud de onda del haz ( $\lambda$ ) incidente fue de 1.488 Å y la distancia al detector fue de 1 m. Se tomó previamente el blanco de *buffer*, y la medida de ruido del detector de la cámara (MarCCD). Con esto, se hizo la integración radial de los difractogramas observados (anillos de Debye-Scherrer). Para esto se utilizó el software libre Fit2D.

### **Parte 4.3. Medidas en monocapas de mielina**

La cuba utilizada fue de teflón, con forma romboidal, con un área de 16 cm<sup>2</sup> y 17 mL de subfase. Luego de cada medida se limpió con NaOH 2 M a 80°C, incubando por 5 a 10 minutos.

La medida de diferencia de potencial eléctrico se hizo mediante un electrodo ionizante de americio puesto a 5 mm de la superficie del líquido. El electrodo de referencia se colocó en un segundo compartimento con el mismo *buffer*, conectado al compartimento de reacción por un puente salino. Luego de unos minutos se llevó a cero la diferencia de potencial. En el mismo compartimento de reacción se midió la

presión lateral por el método de Wilhelmy ya descrito. Se puso una barra magnética para lograr agitación continua.

La siembra de DPPC (enantiómero L, D su mezcla), así como la mielina, se hizo a partir de disoluciones en cloroformo : metanol 2:1. En el caso de la soluciones de mielina se disolvió a partir de sólido dentro de la hora de hacer la medida. La siembra se hizo con jeringa Hamilton, como en los casos anteriores. La enzima se inyectó luego de unos minutos de equilibrado. La limpieza de la cuba se hizo con agua primeramente, y luego incubando con NaOH 4 M caliente (80-85°C), por 5 minutos, y luego lavado con agua destilada. El *buffer* de subfase fue en el caso de mielina Hepes 10 mM, 2 mM CaCl<sub>2</sub> y NaCl 145 mM

Las monocapas se sembraron a partir de soluciones frescas de mielina en cloroformo metanol 2:1. La actividad sPLA<sub>2</sub> fue seguida por el decaimiento en potencial de superficie a área fija registrando la  $\Pi$  y el potencial de superficie en la cuba de Langmuir. El cero de potencial se fijó luego de 10 minutos de colocar el *buffer*. Las medidas se realizaron bajo agitación continua. La misma cantidad de enzima (mismo stock) se inyectó en las distintas condiciones ensayadas (tipo de sustrato, presión inicial) a menos que se aclare.. Las medidas fueron realizadas a 24-26°C.

La incubación pre-mezcla, se hizo con 25  $\mu$ L de suspensión de mielina (aprox. 12.5 mg/mL) en *buffer*, y 0.3  $\mu$ g de enzima (Cf  $\approx$  860 nM), y se incubó 1h a 37 °C. Luego esos 25  $\mu$ L se agregaron a 950  $\mu$ L de C : M 2:1, se homogeneizó bien y se sembró con jeringa hasta la  $\Pi$  deseada (usualmente cerca de 20 mN/m).

#### **Parte 4.4. Medidas liberación de ácidos grasos.**

Se utilizó el kit NEFA de WAKO Chemicals para cuantificar ácidos grasos libres enzimáticamente (Introducción, pág. 32). Se descartó que hubiera un efecto inhibitorio en las enzimas de este ensayo colorimétrico por el EDTA utilizado para detener la reacción. Puesto que las muestras presentaron turbidez, luego de finalizar el agregado de todos los reactivos, se centrifugaron a 14.100xg por 3 minutos y se midió el sobrenadante a dos longitudes de onda, 550 nm (pico) y a 660 nm (usado para descontar dispersión). La curva de trabajo se hizo con diluciones de estándar de ácido oleico sin mielina y con mielina (como estándar interno). Se descontó también el color obtenido por la mielina sin incubado con enzima (ácidos grasos libres provenientes de hidrólisis no enzimática probablemente). Se controló también que las preparaciones enzimáticas no afectaran el ensayo colorimétrico (mezcla solución de enzima a concentración de uso con ácido oleico dio color esperado, y mezcla de solución de enzima sin ácido oleico no dio color) ya sea por inactivación de algunas de las enzimas de los reactivos del kit, o debido al arrastre de ácidos grasos.

El ensayo general consistió en 10  $\mu$ L de mielina 12 mg/mL en mismo *buffer* que ensayos para difracción como sustrato.

Para el caso del tratamiento enzimático, se agregó 1  $\mu\text{L}$  de 0.005 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  o bien 1.7  $\mu\text{L}$  de 0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de sPLA<sub>2</sub> de veneno cobra o pancreática porcina y H<sub>2</sub>O MQ para volumen final 20  $\mu\text{L}$ . Además, se prepararon tubos por duplicados a los cuales no se les agregaría el reactivo A, esto se hizo para descontar la absorbancia aparente a 550 nm por la dispersión de la suspensión de mielina en cada condición.

Para el caso de los tubos con estándar se puso 1 o 10  $\mu\text{L}$  de ácido oleico 1 mM, completando con H<sub>2</sub>O hasta 20  $\mu\text{L}$ . Para descontar la absorción aparente a 550 nm por la dispersión de la suspensión, como en el caso anterior, se preparó un tubo idéntico con volumen de agua en reemplazo del volumen de reactivo de color A.

Se homogeneizó con vortex unos segundos y se dejó a 37 °C por 1h. Luego se agregó 112.5  $\mu\text{L}$  del reactivo A (excepto en los tubos control de dispersión, como se dijo anteriormente) y se incubó 5 minutos a 37°C. Después se añadió 37.5  $\mu\text{L}$  de reactivo B, y se incubó 8 minutos a 37°C. El volumen final fue 170  $\mu\text{L}$  para todos los tubos. Finalmente se midió a 550 nm en alícuotas de 40  $\mu\text{L}$  por triplicado. El reactivo B inhibe la acción del reactivo A (posiblemente la síntesis de acil-coA). Se corrigió la absorbancia a 550 nm restando el valor del tubo sin el reactivo de color para cada caso. Todo el protocolo anterior se repitió dos veces más para ver la dispersión de datos.

## Marcas y Proveedores

El agua de mayor pureza utilizada (aproximadamente 5 ppb de materia orgánica y 18.2 MΩ de conductividad a 25°C se obtuvo con equipo MilliQ, de MilliPore

### Reactivos y enzimas

|  |                  |
|--|------------------|
| Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico            | Sigma C8982      |
| Acrilamida   | BioBasic         |
| Ampicilina   | Sigma            |
| Agarosa  | Biodynamics B030 |
| Bis acrilamida                                     | BioBasic         |
| Bromuro de etidio                                  | Promega H5041    |
| Cisteína (L-cisteína)                              | Sigma            |
| Cloranfenicol                                      | Sigma            |
| Azul Brillante de Coomassie (Coomassie Blue R-250) | BioBasic         |
| Cloruro de calcio                                  | Merck            |
| Cloruro de sodio                                   | Merck/ JT Baker  |
| Cloruro de guanidinio                              | Sigma            |
| DLPC (L- dilauroil-fosfatidil-colina)              | Avanti 850335P   |
| DNTPs  | Biodynamics      |
| Inhibidor recombinante de ARNasas, RNAsin          | Promega N2511    |
| Enzima ADNasa I                                    | SIGMA            |
| Enzima ARNasa A                                    | SIGMA            |
| Enzima T4 ADN ligasa                               | Promega          |
| Enzima M MLV (transcriptasa reversa)               | Promega M1701    |
| Enzima Pfu (polimerasa de ADN)                     | Biodynamics      |
| Enzima GoTaq (polimerasa de ADN)                   | Promega          |
| Enzima transcriptasa reversa MMLV                  | Promega          |
| Enzimas de restricción                             | Promega          |
| Enzima Tripsina, grado espectrometría de masas     | Promega V5111    |
| Etanol anhidro                                     | Merck            |

|  |                     |
|--|---------------------|
| Filtro de PVDF hidrofílico, poro 0.22 µm, 47 mm diámetro, DURAPORE | Millipore GVWP04700 |
| Fenol :cloroformo :isoamílico 125:24:1 pH=4.7                      | Sigma               |
| Glicerol 87%   | Merck               |
| Isopropanol  | Merck               |
| Metanol  | Merck               |
| SDS  |                     |
| Sulfato de níquel  | Tetrahedron         |
| TEMED  |                     |
| Tris base  | Sigma               |
| Tris.HCl   | Sigma               |
| Urea   | Sigma               |

**Insumos y kits**

|   |                          |
|---|--------------------------|
| Filtros AMICON 100 K, 50K, 3K y Filtro 0.22 µm PVDF                           | Millipore                |
| Kit para minipreparaciones plasmídicas  | Axygen                   |
| Kit para fragmentación asistida <i>Ettan CAF-MALDI Sequencing Kit</i>         | Amersham B. 17-6002-97   |
| Kit para minipreparaciones plasmídicas Wizard® Plus SV                        | Promega                  |
| Kit para purificación de ADN :Wizard SV Gel & PCR CleanUP System              | Promega                  |
| Marcador ADN (1KbPlus)  | Invitrogen               |
| Marcador Proteína (Benchmark)   | Invitrogen               |
| Membranas de diálisis 10 kDa y benzoiladas 3kDa                               | Sigma                    |
| Plásmido pG-KJE8  | Takara Bio               |
| Plásmido pGEM-T Easy  | Promega                  |
| Solución desnaturizante para extraer ARN (RNAgents® Denaturing Solution)      | Promega Z5651            |
| Tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG), Immobiline DryStrip pH 4-7, 7 cm | GE Healthcare 17-6001-10 |

**Software**

|   |                    |
|---|--------------------|
| 4000 Series Explorer, manejo de equipo MALDI-TOF-TOF                                    | Applied Biosystems |
| NTI Vector 10. Manejo de secuencias de proteína y ADN, diseño de oligos, y gráficos     | Invitrogen         |
| Word 2003. Procesador de textos   | Microsoft          |
| Powerpoint 2003. Presentación y gráficos  | Microsoft          |
| Inkscape. Dibujos vectoriales.  | Inkscape           |
| Origin 7.0, cálculos y gráficos de datos  | Microcal           |
| Data Explorer 4.9 (Build 115). Procesamiento datos de espectrometría de masa y gráficos | Applied Biosystems |
| Layer Builder. Captura y procesamiento de datos de ensayos de monocapas                 | KSV                |
| Fit 2D, integración radial de difractogramas (experimentos SAXS)                        | Andy Hammersley    |

**Equipos y columnas de cromatografía**

|   |                              |
|---|------------------------------|
| Electroporador Gene Pulser Xcell Microbial System | Biorad, 165-2662             |
| Cubetas para electroporacion 2mm                  | Biorad, 165-2082             |
| Cubetas para UV                                   | Hellma                       |
| Akta Purifier                                     | General Electric             |
| Centrífuga refrigerada                            | Eppendorf                    |
| Centrífuga de mesa Mini Spin Plus                 | Eppendorf                    |
| Columna Superdex 75 HR 10/30                      | Pharmacia                    |
| Columna Mono Q                                    | GE Healthcare                |
| Fuente de electroforesis                          | Biorad                       |
| Espectrofotómetro rango visible MiniSpec Mini     | Amersham                     |
| Espectrofotómetro UV-Visible                      | Shimadzu                     |
| Espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF 4800®        | Ab Sciex                     |
| Homogeneizador de tejido                          | Ultra turrax                 |
| pHmetro   |                              |
| pHmetro - electrodo                               |                              |
| Termocicladores                                   | Biorad, Eppendorf o Biometra |

## **Servicios**

Secuenciación: MacroGen corp. USA y Universidad de Chicago ((**University of Chicago Cancer Research Center-DNA Sequence Facility**))

Síntesis de oligonucleótidos:: Ruralex (Argentina) y SIGMA (Argentina),

## **Cepas de bacterias**

Las cepas *E.coli* BL21 (DE3) y Origami (DE3) fueron de Novagen

## Referencias bibliográficas

- Aird, S. D. (2002). "Ophidian envenomation strategies and the role of purines." *Toxicon* **40**(4): 335-93.
- Aird, S. D. (2005). "Taxonomic distribution and quantitative analysis of free purine and pyrimidine nucleosides in snake venoms." *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **140**(1): 109-26.
- Alape-Giron, A., L. Sanz, J. Escolano, M. Flores-Diaz, M. Madrigal, M. Sasa y J. J. Calvete (2008). "Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations." *J Proteome Res* **7**(8): 3556-71.
- Ali, T., G. Kokotos, V. Magrioti, R. N. Bone, J. A. Mobley, W. Hancock y S. Ramanadham (2013). "Characterization of FKGK18 as inhibitor of group VIA Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2 (iPLA2beta): candidate drug for preventing beta-cell apoptosis and diabetes." *PLoS One* **8**(8): e71748.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller y D. J. Lipman (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res* **25**(17): 3389-402.
- Arni, R. K. y R. J. Ward (1996). "Phospholipase A2--a structural review." *Toxicon* **34**(8): 827-41.
- Banik, N. L., K. Gohil y A. N. Davison (1976). "The action of snake venom, phospholipase A and trypsin on purified myelin in vitro." *Biochem J* **159**(2): 273-7.
- Baynes, J. W. y M. H. Dominiczak (2004). *Medical Biochemistry*, Mosby.
- Bianco, I. D., G. D. Fidelio y B. Maggio (1989). "Modulation of phospholipase A2 activity by neutral and anionic glycosphingolipids in monolayers." *Biochem J* **258**(1): 95-9.
- Bianco, I. D., G. D. Fidelio y B. Maggio (1990). "Effect of sulfatide and gangliosides on phospholipase C and phospholipase A2 activity. A monolayer study." *Biochim Biophys Acta* **1026**(2): 179-85.
- Bianco, I. D., G. D. Fidelio, R. K. Yu y B. Maggio (1991). "Degradation of dilauroylphosphatidylcholine by phospholipase A2 in monolayers containing glycosphingolipids." *Biochemistry* **30**(6): 1709-14.
- Bianco, I. D., M. J. Kelley, R. M. Crowl y E. A. Dennis (1995). "Identification of two specific lysines responsible for the inhibition of phospholipase A2 by manoalide." *Biochim Biophys Acta* **1250**(2): 197-203.
- Bordoli, L., F. Kiefer, K. Arnold, P. Benkert, J. Battey y T. Schwede (2009). "Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace." *Nat Protoc* **4**(1): 1-13.
- Burke, J. E. y E. A. Dennis (2009). "Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling." *J Lipid Res* **50** Suppl: S237-42.
- Bustillo, S., H. Lucero, L. Leiva, O. Acosta, E. Kier Joffé y J. Gorodner (2009). "Cytotoxicity and morphological analysis of cell death induced by *Bothrops* venoms from the northeast of Argentina." *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* **15**(1).
- Cajal, Y., M. A. Alsina, O. G. Otto G. Berg y M. K. Jain (2000). "Product Accumulation during the Lag Phase as the Basis for the Activation of Phospholipase A2 on Monolayers." *Langmuir* **16**: 252-257.
- Carrasco, P., C. Mattoni, G. Leynaud y G. Scrocchi (2012). "Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae)." *Zoologica Scripta* **41**(2): 109-124.
- Catanzariti, A. M., T. A. Soboleva, D. A. Jans, P. G. Board y R. T. Baker (2004). "An efficient system for high-level expression and easy purification of authentic recombinant proteins." *Protein Sci* **13**(5): 1331-9.

- Cintra-Francischinelli, M., P. Caccin, A. Chiavegato, P. Pizzo, G. Carmignoto, Y. Angulo, B. Lomonte, J. M. Gutierrez y C. Montecucco (2010). "Bothrops snake myotoxins induce a large efflux of ATP and potassium with spreading of cell damage and pain." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(32): 14140-5.
- Colacicco, G. y M. M. Rapport (1966). "Lipid monolayers: action of phospholipase A of *Crotalus atrox* and *Naja naja* venoms on phosphatidyl choline and phosphatidal choline." J Lipid Res **7**(2): 258-63.
- Cordella-Miele, E., L. Miele y A. B. Mukherjee (1990). "A novel transglutaminase-mediated post-translational modification of phospholipase A2 dramatically increases its catalytic activity." J Biol Chem **265**(28): 17180-8.
- Cunningham, T. J., L. Yao, M. Oetinger, L. Cort, E. P. Blankenhorn y J. I. Greenstein (2006). "Secreted phospholipase A2 activity in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis." J Neuroinflammation **3**: 26.
- Cura, J. E., D. P. Blanzaco, C. Brisson, M. A. Cura, R. Cabrol, L. Larrateguy, C. Mendez, J. C. Sechi, J. S. Silveira, E. Theiller, A. R. de Roodt y J. C. Vidal (2002). "Phase I and pharmacokinetics study of crotoxin (cytotoxic PLA(2), NSC-624244) in patients with advanced cancer." Clin Cancer Res **8**(4): 1033-41.
- Chen, C., J. M. Cavanaugh, A. C. Ozaktay, S. Kallakuri y A. I. King (1997). "Effects of phospholipase A2 on lumbar nerve root structure and function." Spine (Phila Pa 1976) **22**(10): 1057-64.
- Chiou, Y. L., S. R. Lin y L. S. Chang (2008). "Mutations on N-terminal region of Taiwan cobra phospholipase A(2) result in structurally distorted effects." J Pept Sci **14**(8): 890-7.
- Chomczynski, P. y N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-9.
- Daniele, J. J., I. D. Bianco, C. Delgado, D. B. Carrillo y G. D. Fidelio (1997). "A new phospholipase A2 isoform isolated from *Bothrops neuwiedii* (Yarara chica) venom with novel kinetic and chromatographic properties." Toxicon **35**(8): 1205-15.
- Daniele, J. J., I. D. Bianco y G. D. Fidelio (1995). "Kinetic and pharmacologic characterization of phospholipases A2 from *Bothrops neuwiedii* venom." Arch Biochem Biophys **318**(1): 65-70.
- de Albuquerque Modesto, J. C., P. J. Spencer, M. Fritzen, R. C. Valenca, M. L. Oliva, M. B. da Silva, A. M. Chudzinski-Tavassi y M. C. Guarnieri (2006). "BE-I-PLA2, a novel acidic phospholipase A2 from *Bothrops erythromelas* venom: isolation, cloning and characterization as potent anti-platelet and inductor of prostaglandin I2 release by endothelial cells." Biochem Pharmacol **72**(3): 377-84.
- De Maria, L., J. Vind, K. M. Oxenboll, A. Svendsen y S. Patkar (2007). "Phospholipases and their industrial applications." Appl Microbiol Biotechnol **74**(2): 290-300.
- de Oliveira, V. C., L. C. Lanari, S. E. Hajos y A. R. de Roodt (2011). "Toxicity of *Bothrops neuwiedii* complex ("yarara chica") venom from different regions of Argentina (Serpentes, Viperidae)." Toxicon **57**(5): 680-5.
- Demel, R. A., W. S. Geurts van Kessel, R. F. Zwaal, B. Roelofsen y L. L. van Deenen (1975). "Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers." Biochim Biophys Acta **406**(1): 97-107.
- Dervichian, D. G. (1971). "[A method for studying enzyme reactions on an interface]." Biochimie **53**(1): 25-33.
- Dhananjaya, B. L. y D. S. CJ (2010). "An overview on nucleases (DNase, RNase, and phosphodiesterase) in snake venoms." Biochemistry (Mosc) **75**(1): 1-6.
- Dijkstra, B. W., K. H. Kalk, J. Drenth, G. H. de Haas, M. R. Egmond y A. J. Slotboom (1984). "Role of the N-terminus in the interaction of pancreatic phospholipase A2 with aggregated

- substrates. Properties and crystal structure of transaminated phospholipase A2." *Biochemistry* **23**(12): 2759-66.
- Durban, J., P. Juárez, Y. Angulo, B. Lomonte, M. Flores-Díaz, A. Alape-Giron, M. Sasa, L. Sanz, J. M. Gutiérrez, J. Dopazo, A. Conesa y J. J. Calvete "Profiling the venom gland transcriptomes of Costa Rican snakes by 454 pyrosequencing." *BMC Genomics* **12**: 259.
- Faure, G., V. Choumet, C. Bouchier, L. Camoin, J. L. Guillaume, B. Monegier, M. Vuilhorgne y C. Bon (1994). "The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*." *Eur J Biochem* **223**(1): 161-4.
- Fenwick AM, Gutberlet RL, Evans JA y P. CL. (2009). "Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae)." *Zool J Linn Soc* **156**: 617-40.
- Funari, S. S., G. Rapp y F. Richter (2009). "Double-bilayer: a new phase formed by lysophospholipids and the corresponding fatty acid." *Química Nova* **32**(4).
- García Denegri, M. E., O. C. Acosta, S. Huancahuire-Vega, D. Martins-de-Souza, S. Marangoni, S. L. Marunak, G. P. Teibler, L. C. Leiva y L. A. Ponce-Soto (2010). "Isolation and functional characterization of a new acidic PLA(2) Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina." *Toxicon* **56**(1): 64-74.
- Gelb, M. H., M. K. Jain, A. M. Hanel y O. G. Berg (1995). "Interfacial enzymology of glycerolipid hydrolases: lessons from secreted phospholipases A2." *Annu Rev Biochem* **64**: 653-88.
- Geoghegan, P., Y. Angulo, A. Cangelosi, M. Díaz y B. Lomonte (1999). "Characterization of a basic phospholipase A2-homologue myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops neuwiedii* (yarara chica) from Argentina." *Toxicon* **37**(12): 1735-46.
- Gerding, J. J., A. Koppers, P. Hagel y H. Bloemendal (1971). "Cyanate formation in solutions of urea. II. Effect of urea on the eye lens protein -crystallin." *Biochim Biophys Acta* **243**(3): 375-9.
- Gutiérrez, J. M., C. Avila, E. Rojas y L. Cerdas (1988). "An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica." *Toxicon* **26**(4): 411-3.
- Habermann, E. y K. L. Hardt (1972). "A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases." *Anal Biochem* **50**(1): 163-73.
- Hagel, P., J. J. Gerding, W. Fieggen y H. Bloemendal (1971). "Cyanate formation in solutions of urea. I. Calculation of cyanate concentrations at different temperature and pH." *Biochim Biophys Acta* **243**(3): 366-73.
- Haley, J. E., F. G. Samuels y R. W. Ledeen (1981). "Study of myelin purity in relation to axonal contaminants." *Cell Mol Neurobiol* **1**(2): 175-87.
- Heinrikson, R. L. (1991). "Dissection and sequence analysis of phospholipases A2." *Methods Enzymol* **197**: 201-14.
- Hirel, P. H., M. J. Schmitter, P. Dessen, G. Fayat y S. Blanquet (1989). "Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(21): 8247-51.
- Horchani, H., L. Sabrina, L. Regine, A. Sayari, Y. Gargouri y R. Verger (2010). "Heterologous expression and N-terminal His-tagging processes affect the catalytic properties of staphylococcal lipases: a monolayer study." *J Colloid Interface Sci* **350**(2): 586-94.
- Hysmith, R. M. y R. C. Franson (1982). "Degradation of human myelin phospholipids by phospholipase-enriched culture media of pathogenic *Naegleria fowleri*." *Biochim Biophys Acta* **712**(3): 698-701.
- Jain, M. K. y O. G. Berg (2006). "Coupling of the i-face and the active site of phospholipase A2 for interfacial activation." *Curr Opin Chem Biol* **10**(5): 473-9.
- Kasurinen, J. y T. Vanha-Perttula (1987). "An enzymatic colorimetric assay of calcium-dependent phospholipases A." *Anal Biochem* **164**(1): 96-101.

- Kelley, M. J., R. M. Crowl y E. A. Dennis (1992). "Renaturation of cobra venom phospholipase A2 expressed from a synthetic gene in *Escherichia coli*." Biochim Biophys Acta **1118**(2): 107-15.
- Khan, W. A., G. C. Blobe y Y. A. Hannun (1995). "Arachidonic acid and free fatty acids as second messengers and the role of protein kinase C." Cell Signal **7**(3): 171-84.
- Kini, R. M. (2003). "Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes." Toxicon **42**(8): 827-40.
- Kruger, R., C. W. Hung, M. Edelson-Averbukh y W. D. Lehmann (2005). "Iodoacetamide-alkylated methionine can mimic neutral loss of phosphoric acid from phosphopeptides as exemplified by nano-electrospray ionization quadrupole time-of-flight parent ion scanning." Rapid Commun Mass Spectrom **19**(12): 1709-16.
- Kuby, S. (1990). A Study of Enzymes, Vol. 2 : Mechanism of Enzyme Action, CRC Press.
- Kuipers, O. P., M. M. Thunnissen, P. de Geus, B. W. Dijkstra, J. Drenth, H. M. Verheij y G. H. de Haas (1989). "Enhanced activity and altered specificity of phospholipase A2 by deletion of a surface loop." Science **244**(4900): 82-5.
- Lagocki, J. W., N. M. Boyd, J. H. Law y F. J. Kezdy (1970). "Kinetic analysis of the action of pancreatic lipase on lipid monolayers." J Am Chem Soc **92**(9): 2923-4.
- Lai, C. C. y G. R. Her (2000). "Analysis of phospholipase A2 glycosylation patterns from venom of individual bees by capillary electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry using an ion trap mass spectrometer." Rapid Commun Mass Spectrom **14**(21): 2012-8.
- Larreche, S., G. Mion y M. Goyffon (2008). "[Haemostasis disorders caused by snake venoms]." Ann Fr Anesth Reanim **27**(4): 302-9.
- Liu, X., H. Zhu, B. Huang, J. Rogers, B. Z. Yu, A. Kumar, M. K. Jain, M. Sundaralingam y M. D. Tsai (1995). "Phospholipase A2 engineering. Probing the structural and functional roles of N-terminal residues with site-directed mutagenesis, X-ray, and NMR." Biochemistry **34**(22): 7322-34.
- Lomonte, B., Y. Angulo y L. Calderon (2003). "An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action." Toxicon **42**(8): 885-901.
- Mackessy, S. P. (2010). Handbook of venoms and toxins of reptiles. Boca Raton, Taylor & Francis.
- Marki, F. y V. Hanulak (1993). "Recombinant human synovial fluid phospholipase A2 and N-terminal variant: kinetic parameters and response to inhibitors." J Biochem **113**(6): 734-7.
- Martinez, A. M. y S. Canavaro (2000). "Early myelin breakdown following sural nerve crush: a freeze-fracture study." Braz J Med Biol Res **33**(12): 1477-82.
- Mateos Diaz, J., J. Rodríguez, S. Roussos, Cordova J., Abousalham A., F. Carriere y J. Baratti (2006). "Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures." Enzyme and Microbial Technology **39**: 1042-1050.
- Mateos Diaz, J. C., J. Cordova, J. Baratti, F. Carriere y A. Abousalham (2007). "Effect of nonionic surfactants on *Rhizopus homothallicus* lipase activity: a comparative kinetic study." Mol Biotechnol **35**(3): 205-14.
- Matoba, Y., Y. Katsube y M. Sugiyama (2002). "The crystal structure of prokaryotic phospholipase A2." J Biol Chem **277**(22): 20059-69.
- Mirshafiey, A. (2007). "Venom therapy in multiple sclerosis." Neuropharmacology **53**(3): 353-61.
- Morell, P. y R. Quarles (1999). Characteristic Composition of Myelin. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. A. B. Siegel GJ, Albers RW, et al. Philadelphia, Lippincott-Raven.
- Nakashima, K., I. Nobuhisa, M. Deshimaru, M. Nakai, T. Ogawa, Y. Shimohigashi, Y. Fukumaki, M. Hattori, Y. Sakaki, S. Hattori y et al. (1995). "Accelerated evolution in the protein-

- coding regions is universal in crotalinae snake venom gland phospholipase A2 isozyme genes." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(12): 5605-9.
- Nakashima, K., T. Ogawa, N. Oda, M. Hattori, Y. Sakaki, H. Kihara y M. Ohno (1993). "Accelerated evolution of *Trimeresurus flavoviridis* venom gland phospholipase A2 isozymes." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(13): 5964-8.
- Noel, J. P., C. A. Bingman, T. L. Deng, C. M. Dupureur, K. J. Hamilton, R. T. Jiang, J. G. Kwak, C. Sekharudu, M. Sundaralingam y M. D. Tsai (1991). "Phospholipase A2 engineering. X-ray structural and functional evidence for the interaction of lysine-56 with substrates." Biochemistry **30**(51): 11801-11.
- Ogawa, T., N. Oda, K. Nakashima, H. Sasaki, M. Hattori, Y. Sakaki, H. Kihara y M. Ohno (1992). "Unusually high conservation of untranslated sequences in cDNAs for *Trimeresurus flavoviridis* phospholipase A2 isozymes." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(18): 8557-61.
- Oliveira, R. G., E. Schneck, S. S. Funari, M. Tanaka y B. Maggio (2010). "Equivalent aqueous phase modulation of domain segregation in myelin monolayers and bilayer vesicles." Biophys J **99**(5): 1500-9.
- Ondetti, M. A., N. J. Williams, E. F. Sabo, J. Pluscec, E. R. Weaver y O. Kocy (1971). "Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure, and synthesis." Biochemistry **10**(22): 4033-9.
- Opie, L. H. y H. Kowolik (1995). "The discovery of captopril: from large animals to small molecules." Cardiovasc Res **30**(1): 18-25.
- Ortiz de Montellano, P. R., S. K. David, M. A. Ator y D. Tew (1988). "Mechanism-based inactivation of horseradish peroxidase by sodium azide. Formation of meso-azidoporphyrin IX." Biochemistry **27**(15): 5470-6.
- Othman, R., S. Baker, Y. Li, A. F. Worrall y D. C. Wilton (1996). "Human non-pancreatic (group II) secreted phospholipase A2 expressed from a synthetic gene in *Escherichia coli*: characterisation of N-terminal mutants." Biochim Biophys Acta **1303**(2): 92-102.
- Pattus, F., A. J. Slotboom y G. H. de Haas (1979). "Regulation of phospholipase A2 activity by the lipid-water interface: a monolayer approach." Biochemistry **18**(13): 2691-7.
- Perkins, D. N., D. J. Pappin, D. M. Creasy y J. S. Cottrell (1999). "Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data." Electrophoresis **20**(18): 3551-67.
- Pernas, P., J. L. Olivier, M. D. Legoy y G. Bereziat (1990). "Phospholipid synthesis by extracellular phospholipase A2 in organic solvents." Biochem Biophys Res Commun **168**(2): 644-50.
- Petrucelli, S. y M. C. Añón (1995). "Partial Reduction of Soy Protein Isolate Disulfide Bonds." J. Agric. Food Chem. **43**: 2001-2006.
- Pieterse, W. A., J. J. Volwerk y G. H. de Haas (1974). "Interaction of phospholipase A2 and its zymogen with divalent metal ions." Biochemistry **13**(7): 1439-45.
- Qin, S., A. H. Pande, K. N. Nemeč, X. He y S. A. Tatulian (2005). "Evidence for the regulatory role of the N-terminal helix of secretory phospholipase A(2) from studies on native and chimeric proteins." J Biol Chem **280**(44): 36773-83.
- Randolph, A. y R. L. Henrikson (1982). "*Crotalus atrox* phospholipase A2. Amino acid sequence and studies on the function of the NH2-terminal region." J Biol Chem **257**(5): 2155-61.
- Reynolds, L. J., W. N. Washburn, R. A. Deems y E. A. Dennis (1991). "Assay strategies and methods for phospholipases." Methods Enzymol **197**: 3-23.
- Rodrigues, R. S., J. Boldrini-Franca, F. P. Fonseca, P. de la Torre, F. Henrique-Silva, L. Sanz, J. J. Calvete y V. M. Rodrigues (2012). "Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*." J Proteomics.
- Rodrigues, V. M., S. Marcussi, R. S. Cambraia, A. L. de Araujo, N. R. Malta-Neto, A. Hamaguchi, E. A. Ferro, M. I. Homs-Brandeburgo, J. R. Giglio y A. M. Soares (2004). "Bactericidal

- and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom." Toxicon **44**(3): 305-14.
- Roepstorff, P. y J. Fohlman (1984). "Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides." Biomed Mass Spectrom **11**(11): 601.
- Rouault, M., C. Le Calvez, E. Boilard, F. Surrel, A. Singer, F. Ghomashchi, S. Bezzine, S. Scarzello, J. Bollinger, M. H. Gelb y G. Lambeau (2007). "Recombinant production and properties of binding of the full set of mouse secreted phospholipases A2 to the mouse M-type receptor." Biochemistry **46**(6): 1647-62.
- Sambrook, K. J., E. T. Fritsch y T. Maniatis (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Scott, D. L., S. P. White, Z. Otwinowski, W. Yuan, M. H. Gelb y P. B. Sigler (1990). "Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2." Science **250**(4987): 1541-6.
- Schaloske, R. H. y E. A. Dennis (2006). "The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system." Biochim Biophys Acta **1761**(11): 1246-59.
- Sekot, G., D. Schuster, P. Messner, D. Pum, H. Peterlik y C. Schaffer (2013). "Small-angle X-ray scattering for imaging of surface layers on intact bacteria in the native environment." J Bacteriol **195**(10): 2408-14.
- Seto, M., T. Ogawa, K. Kodama, K. Muramoto, Y. Kanayama, Y. Sakai, T. Chijiwa y M. Ohno (2008). "A novel recombinant system for functional expression of myonecrotic snake phospholipase A(2) in *Escherichia coli* using a new fusion affinity tag." Protein Expr Purif **58**(2): 194-202.
- Six, D. A. y E. A. Dennis (2000). "The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization." Biochim Biophys Acta **1488**(1-2): 1-19.
- Slotboom, A. J., M. C. van Dam-Mieras y G. H. de Haas (1977). "Regulation of phospholipase A2 activity by different lipid-water interfaces." J Biol Chem **252**(9): 2948-51.
- Sugiyama, M., K. Ohtani, M. Izuhara, T. Koike, K. Suzuki, S. Imamura y H. Misaki (2002). "A novel prokaryotic phospholipase A2. Characterization, gene cloning, and solution structure." J Biol Chem **277**(22): 20051-8.
- Svergun, D. I. y M. H. J. Koch (2003). "Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution." Reports on Progress in Physics **66**: 1735-1782.
- Tatulian, S. A. (2001). "Toward understanding interfacial activation of secretory phospholipase A2 (PLA2): membrane surface properties and membrane-induced structural changes in the enzyme contribute synergistically to PLA2 activation." Biophys J **80**(2): 789-800.
- Tawakol, A., P. Singh, J. H. Rudd, J. Soffer, G. Cai, E. Vucic, S. P. Brannan, E. A. Tarka, B. C. Shaddinger, L. Sarov-Blat, P. Matthews, S. Subramanian, M. Farkouh y Z. A. Fayad (2014). "Effect of treatment for 12 weeks with rilapladi, a lipoprotein-associated phospholipase A2 inhibitor, on arterial inflammation as assessed with (18)f-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography imaging." J Am Coll Cardiol **63**(1): 86-8.
- Thannhauser, T. W., Y. Konishi y H. A. Scheraga (1987). "Analysis for disulfide bonds in peptides and proteins." Methods Enzymol **143**: 115-9.
- Thuren, T., A. P. Tulkki, J. A. Virtanen y P. K. Kinnunen (1987). "Triggering of the activity of phospholipase A2 by an electric field." Biochemistry **26**(16): 4907-10.
- Tomasselli, A. G., J. Hui, J. Fisher, H. Zurcher-Neely, I. M. Reardon, E. Oriaku, F. J. Kezdy y R. L. Henrikson (1989). "Dimerization and activation of porcine pancreatic phospholipase A2 via substrate level acylation of lysine 56." J Biol Chem **264**(17): 10041-7.
- Tsai, Y. C., B. Z. Yu, Y. Z. Wang, J. Chen y M. K. Jain (2006). "Desolvation map of the i-face of phospholipase A2." Biochim Biophys Acta **1758**(5): 653-65.
- Valdez-Cruz, N. A., C. V. Batista y L. D. Possani (2004). "Phaiodactylipin, a glycosylated heterodimeric phospholipase A from the venom of the scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*." Eur J Biochem **271**(8): 1453-64.

- van den Berg, B., M. Tessari, G. H. de Haas, H. M. Verheij, R. Boelens y R. Kaptein (1995). "Solution structure of porcine pancreatic phospholipase A2." EMBO J **14**(17): 4123-31.
- Van der Wiele, F. C., W. Atsma, B. Roelofsen, M. van Linde, J. Van Binsbergen, F. Radvanyi, D. Raykova, A. J. Slotboom y G. H. De Haas (1988). "Site-specific epsilon-NH2 monoacylation of pancreatic phospholipase A2. 2. Transformation of soluble phospholipase A2 into a highly penetrating "membrane-bound" form." Biochemistry **27**(5): 1688-94.
- van Scharrenburg, G. J., E. H. Jansen, M. R. Egmond, G. H. de Haas y A. J. Slotboom (1984). "Structural importance of the amino-terminal residue of pancreatic phospholipase A2." Biochemistry **23**(25): 6285-94.
- Verger, R. y G. H. De Haas (1973). "Enzyme reactions in a membrane model. 1. A new technique to study enzyme reactions in monolayers." Chem Phys Lipids **10**(2): 127-36.
- Verger, R., M. C. Mieras y G. H. de Haas (1973). "Action of phospholipase A at interfaces." J Biol Chem **248**(11): 4023-34.
- Verger, R., J. Rietsch, M. C. Van Dam-Mieras y G. H. de Haas (1976). "Comparative studies of lipase and phospholipase A2 acting on substrate monolayers." J Biol Chem **251**(10): 3128-33.
- Verheij, H. M., A. J. Slotboom y G. H. de Haas (1981). "Structure and function of phospholipase A2." Rev Physiol Biochem Pharmacol **91**: 91-203.
- Vidal, J. C. y A. O. Stoppani (1971). "Isolation and purification of two phospholipases A from Bothrops venoms." Arch Biochem Biophys **145**(2): 543-56.
- Welches, W., D. Felsher, W. Landshulz y J. M. Maraganore (1985). "A rapid method for the purification of monomeric and/or dimeric phospholipases A2 in crotalid snake venoms." Toxicon **23**(5): 747-54.
- Xiang, C., H. Wang, P. Shiel, P. Berger y D. J. Guerra (1994). "A modified alkaline lysis miniprep protocol using a single microcentrifuge tube." Biotechniques **17**(1): 30, 32.
- Yang, H. C., M. Mosior, C. A. Johnson, Y. Chen y E. A. Dennis (1999). "Group-specific assays that distinguish between the four major types of mammalian phospholipase A2." Anal Biochem **269**(2): 278-88.
- Yang, W. L., L. S. Peng, X. F. Zhong, J. W. Wei, X. Y. Jiang, L. T. Ye, L. Zou, H. B. Tu, W. Y. Wu y A. L. Xu (2003). "Functional expression and characterization of a recombinant phospholipase A2 from sea snake *Lapemis hardwickii* as a soluble protein in *E. coli*." Toxicon **41**(6): 713-21.
- Yunes Quartino, P. J., J. L. Barra y G. D. Fidelio (2012). "Cloning and functional expression of secreted phospholipases A(2) from *Bothrops diporus* (Yarara Chica)." Biochem Biophys Res Commun **427**(2): 321-5.
- Zhang, Y. (2008). "I-TASSER server for protein 3D structure prediction." BMC Bioinformatics **9**: 40.
- Zografi, G., R. Verger y G. H. de Haas (1971). "Kinetic analysis of the hydrolysis of lecithin monolayers by phospholipase A." Chem Phys Lipids **7**(4): 185-206.
- Zouari-Kessentini, R., J. Luis, A. Karray, O. Kallech-Ziri, N. Srairi-Abid, A. Bazaa, E. Loret, S. Bezzine, M. El Ayeb y N. Marrakchi (2009). "Two purified and characterized phospholipases A2 from *Cerastes cerastes* venom, that inhibit cancerous cell adhesion and migration." Toxicon **53**(4): 444-53.

## Reconocimientos técnicos

La institución y los integrantes del Departamento de Química Biológica - CIQUIBIC, fueron cruciales para el desarrollo de este trabajo de tesis, desde la provisión de espacio físico, reactivos varios, pasando por la facilitación de diversos equipos de uso común y soporte técnico y científico.

Los ejemplares de yarará chica fueron provistos por el Dr. Gerardo Leynaud, del Centro de Zoología Aplicada (Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, UNC). Además, su grupo nos proveyó también de veneno liofilizado.

La estrategia utilizada para amplificar la secuencia codificante de las isoformas de sPLA<sub>2</sub> fue sugerida por el Dr. José Luis Barra, quien diseñó los oligonucleótidos para la amplificación por PCR del ADNc obtenido por retro-transcripción de ARNm.

Los plásmidos de la ubiquitina en marco de expresión y de la construcción de la enzima deubiquitinante (USP2cc) fueron cedidos por el Dr. Rowan Baker a través del laboratorio de la Dra. Marta Hallak.

Tanto el método de la hemólisis indirecta a través de yema de huevo en agar como detalles para su implementación fueron sugeridos por Dra. Emilia García Denegri de la Universidad Nacional del Nordeste.

En el manejo de los equipos con balanza de Langmuir para mediciones de monocapas fue valiosa la ayuda de la Dra. Luisina de Tullio, así como los consejos y asistencia del Dr. Fernando Dupuy. El Ing. Raúl Salazar de la Facultad de Matemática, Astronomía y Física, y el Ing. Marcelo Pino de CIQUIBIC, fueron de crucial ayuda en la reparación de un motor averiado de un equipo para realizar mediciones en monocapas.

El proyecto y el análisis de los resultados de difracción (SAXS) obtenidos en la línea SAXS2 del sincrotrón LNLS, Campinas, Brasil, fueron llevados a cabo por el Dr. Rafael Oliveira. La mielina fue purificada por el Lic. Julio Pusterla.

El desarrollo del método computacional y su calibración, para la estimación de la energía de unión de proteínas con membranas estuvo a cargo del Dr. Villarreal del departamento de Matemática, de la Facultad de Ciencias Químicas.

El trabajo de espectrometría de masas se llevó a cabo durante tres pasantías en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay bajo la gentil guía de la Dra. Rosario Durán, Vet. Madelón Portela y Dra. Analía Lima. Todos los reactivos y equipamiento, fueron provistos por dicha unidad.

## **Financiamiento**

Este trabajo fue realizado con financiamiento del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, Argentina), a través de becas de Doctorado Tipo I y Tipo II, y por la Facultad de Ciencias Químicas en los meses previos y posteriores a la finalización de dichas becas, a través de un cargo docente con dedicación exclusiva. Los insumos, gastos de viajes, presentaciones a congresos y cursos fueron total o parcialmente cubiertos por proyectos financiados por FonCyt, CONICET y Secyt-UNC.