

Iván Felsztyna; María A. Perillo; Eduardo M. Clop

IIBYT (CONICET-UNC). Cát. de Q. Biológica, FCEyN, UNC. Av. V. Sársfield 1611, Cba. Argentina

Introducción

La actividad de enzimas integrales de membranas puede ser modulada por cambios en el entorno molecular, como por ejemplo cambios en la microviscosidad, la curvatura y la organización dipolar. La AEB es una enzima anclada a la membrana plasmática que cataliza la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina, el cual se hidroliza rápidamente en colina y ácido acético. AEB es un dímero cuyas subunidades catalíticas son idénticas, con una masa molecular aparente de 77 kDa (cada monómero), unidas por puentes disulfuro. Ambas subunidades contienen un anclaje hidrofóbico de tipo glicofosfatidilinositol (GPI).

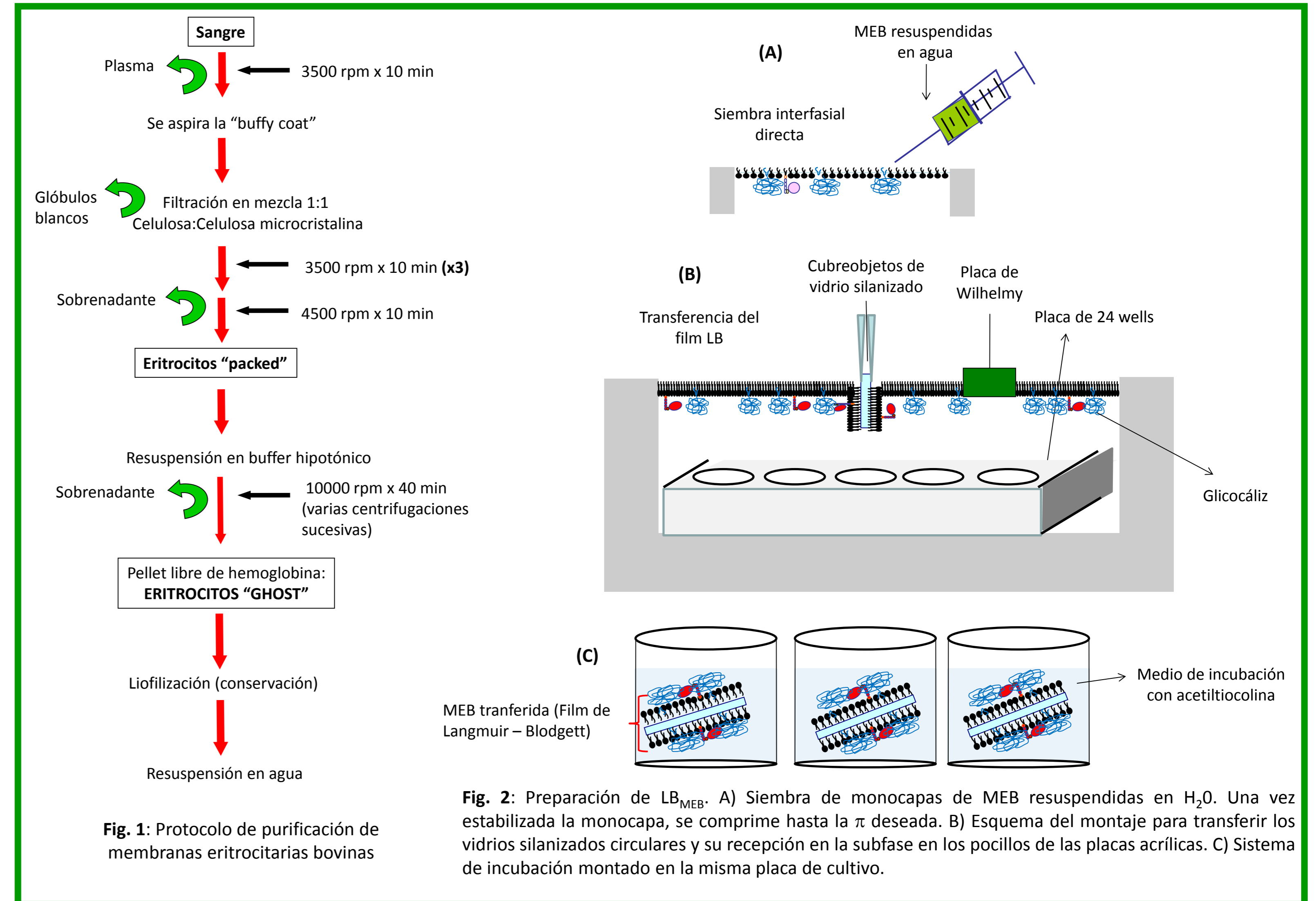
En el presente trabajo, se prepararon capas monomoleculares en la interfase agua-aire a partir de membranas eritrocitarias bovinas purificadas (MEB). La suspensión acuosa de membrana fue dispersada en la interfase aire-agua y se estudiaron las propiedades reológicas de las monocapas obtenidas. Estas monocapas se transfirieron a soportes hidrofóbicos planos (LB_{MEB}) a dos presiones laterales (π), 10 mN/m (LB_{MEB.10}) y 35 mN/m (LB_{MEB.35}), y fueron utilizados como fuente de enzima para estudiar la cinética de hidrólisis del sustrato artificial acetilcolina a 37°C.

El objetivo del proyecto es aplicar los filmes de LB_{MEB} como método de concentración del parásito *Anaplasma marginale*, y estudiar su efecto sobre la actividad catalítica de la AEB, como posible método de diagnóstico de la anaplasmosis en la etapa crónica de la enfermedad.

Referencias:

- Heider et al., (1991) Cellular and molecular neurobiology, 11, (1), 105-118.
 Sussman, J. L., et al., (1991) Science, 253, (5022), 872-879.
 Clop, E. M., & Perillo, M. A. (2010) Cell biochemistry and biophysics, 56 (2-3), 91-107.
 Ellman, G.L., et al., (1961) Biochemical pharmacology, 7 (2), 88-95

Materiales y Métodos



Resultados

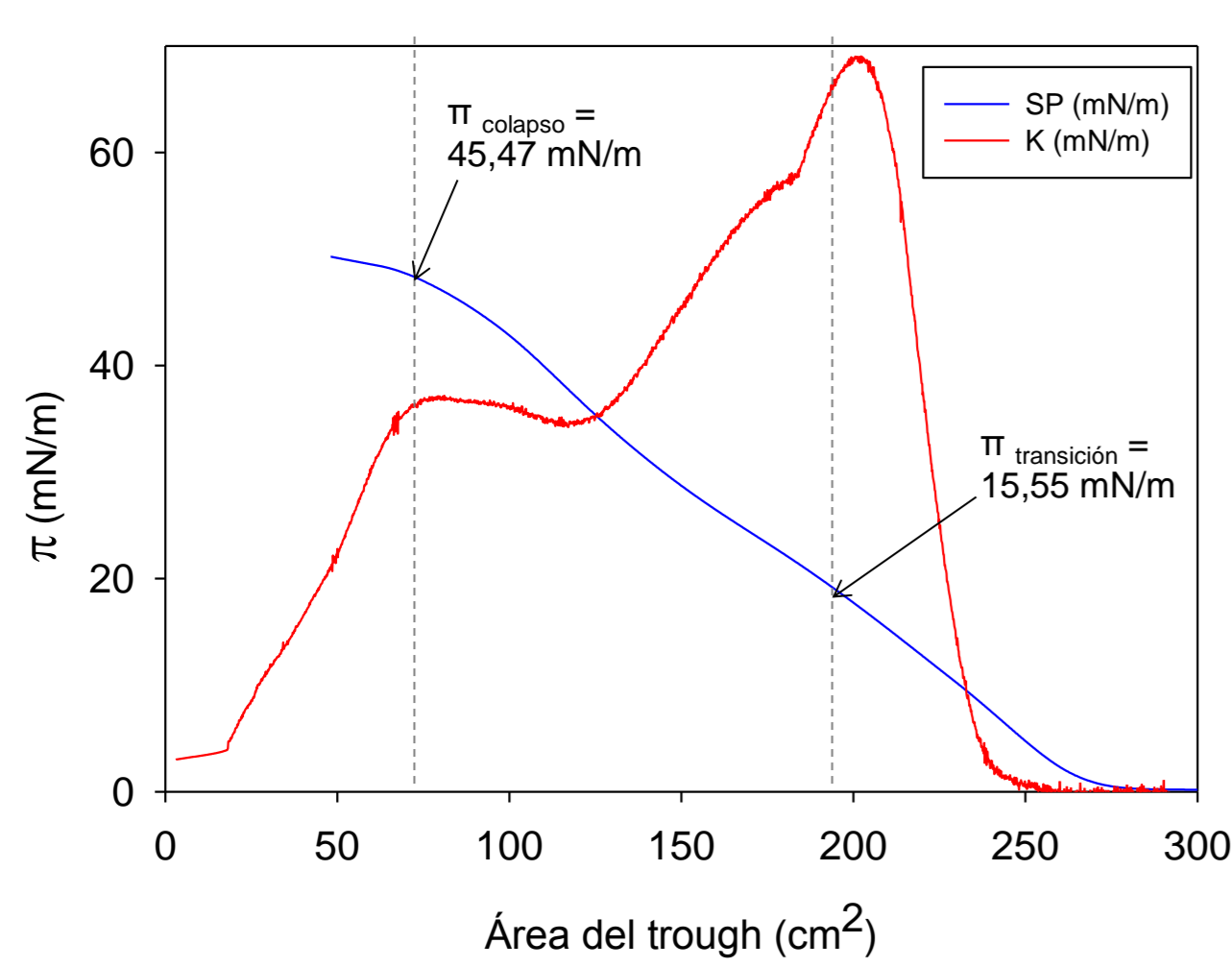


Fig. 3: Isoterma de compresión vs. Área y módulo de compresibilidad (K) vs. Área de MEB en la interfase agua-aire

Tabla 1: Comportamiento interfasial de los filmes de Langmuir de MEB

	$\pi_{colapso}$ (mN/m)	$\pi_{transición}$ (mN/m)	$K_{colapso}$ (mN/m)	$K_{transición}$ (mN/m)
Iso 1	47,63	18,38	36,9	63,52
Iso 2	45,49	14,37	37	68,56
Iso 3	43,3	13,9	34,88	64,3
MEDIA	45,47	15,55	36,6	65,46
DESVIÓ	1,25	1,42	0,7	1,57

Se muestran réplicas de los valores de las presiones laterales de colapso y de transición ($\pi_{colapso}$ y $\pi_{transición}$), con sus respectivos módulos de compresibilidad ($K_{colapso}$ y $K_{transición}$).

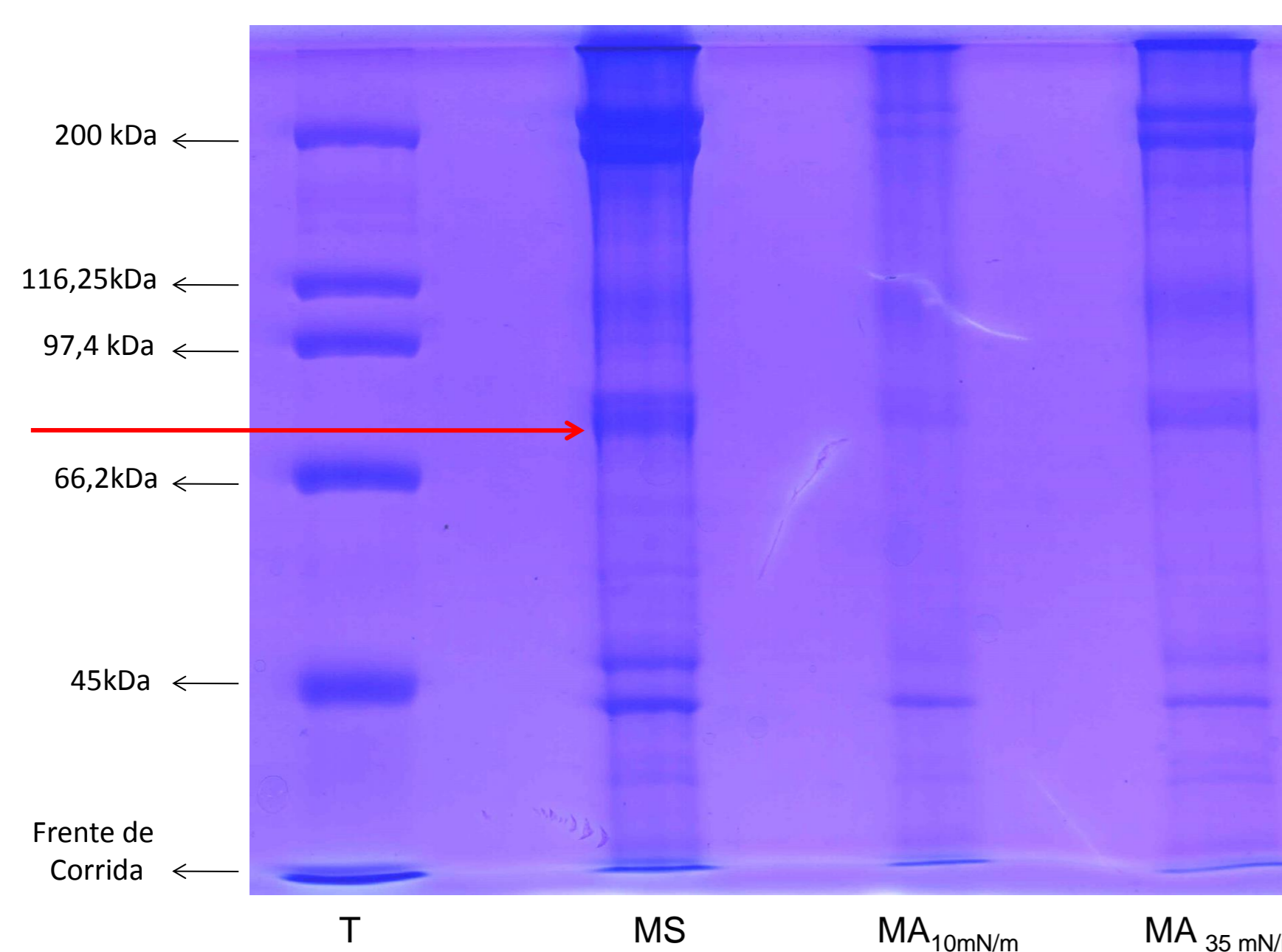


Fig. 6: Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 10%), tinción con Coomassie Blue. T, Testigos de peso molecular; MS, MEB en suspensión; MA10mN/m, MEB aspirada a $\pi = 10$ mN/m; MA35 mN/m, MEB aspirada a $\pi = 35$ mN/m. La flecha roja indica la localización esperada del monómero de AEB.

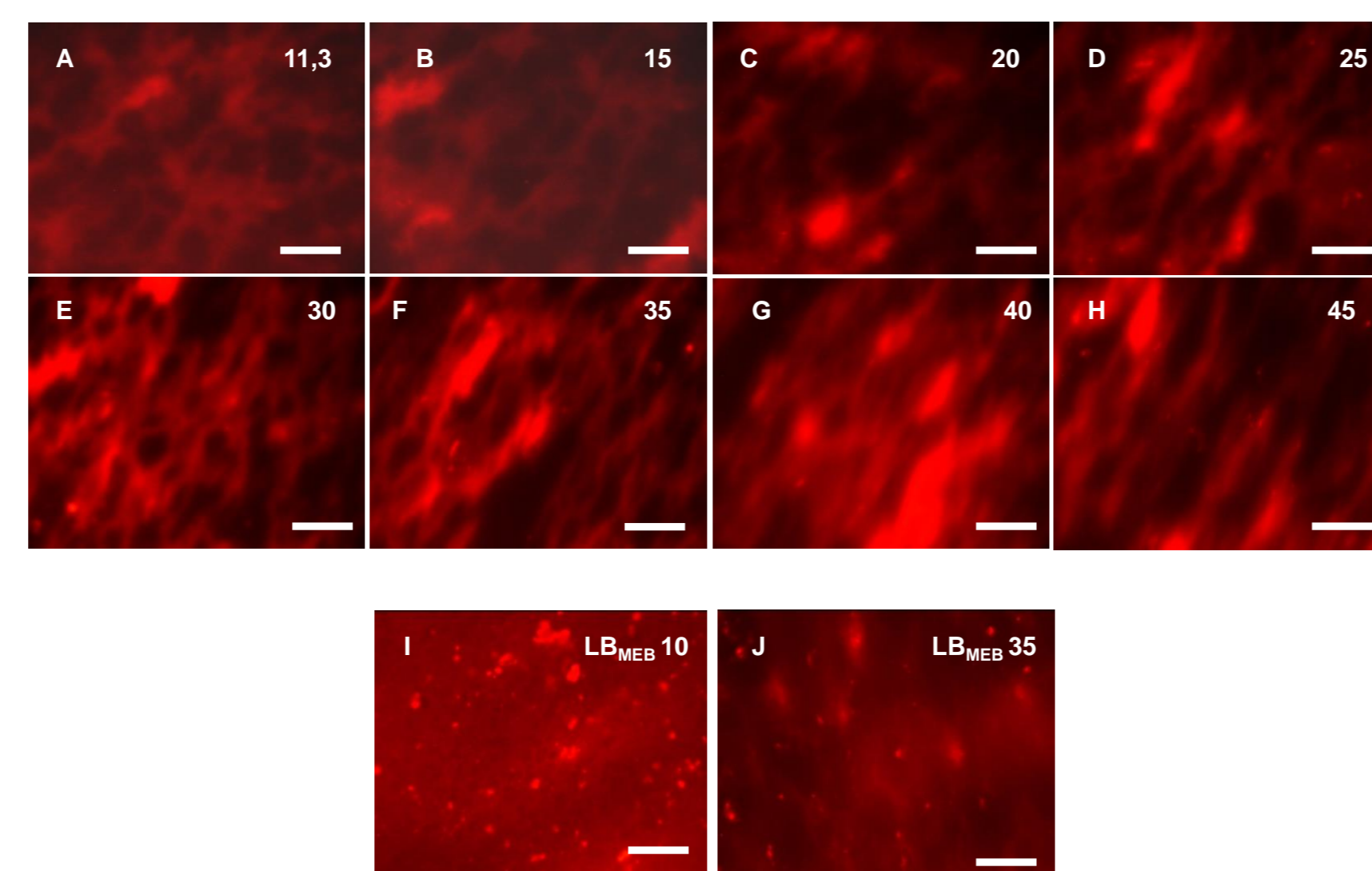


Fig. 4: Microscopías de epifluorescencia (MEF) de filmes de Langmuir (A - H) y Filmes de Langmuir-Blodgett transferidos a 10 mN/m (I) y a 35 mN/m (J). Los valores de π se encuentran representados con números en la esquina superior derecha en unidades de mN/m. El marcador fluorescente DiIc18 para MEF se adicionó a la suspensión de membranas en una relación de 0.5 mol% con respecto a la cantidad de fosfolípidos. Este experimento se repitió dos veces con similares resultados. Las barras blancas representan 100 μ m.

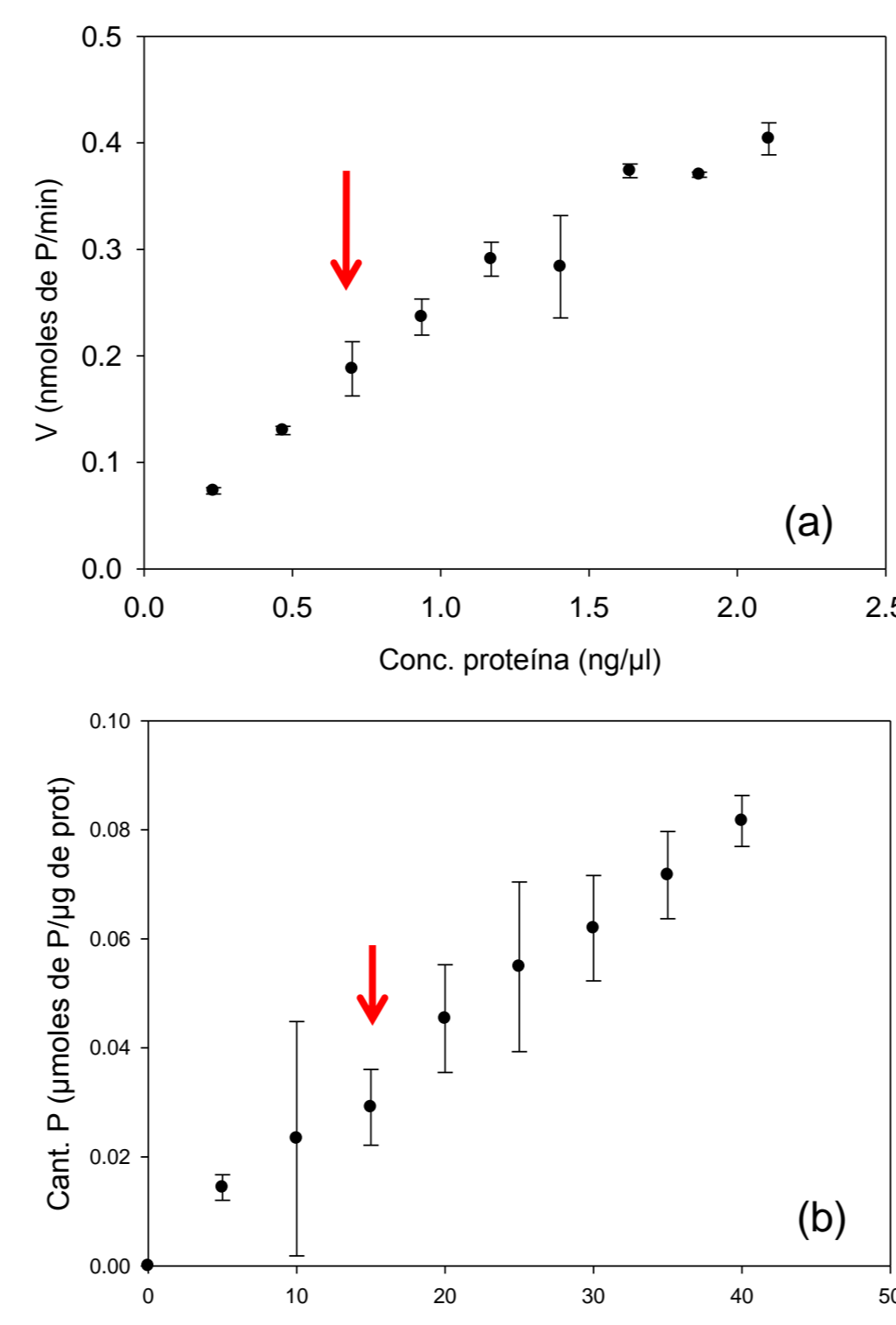


Fig. 7: Determinación de las condiciones experimentales para el cálculo de parámetros cinéticos de la actividad de AEB en membranas en suspensión. En (a) se grafica la actividad catalítica en función de la conc. de proteína, y en (b), en función del tiempo. Las flechas rojas indican las condiciones elegidas para realizar la curva de concentración de sustrato.

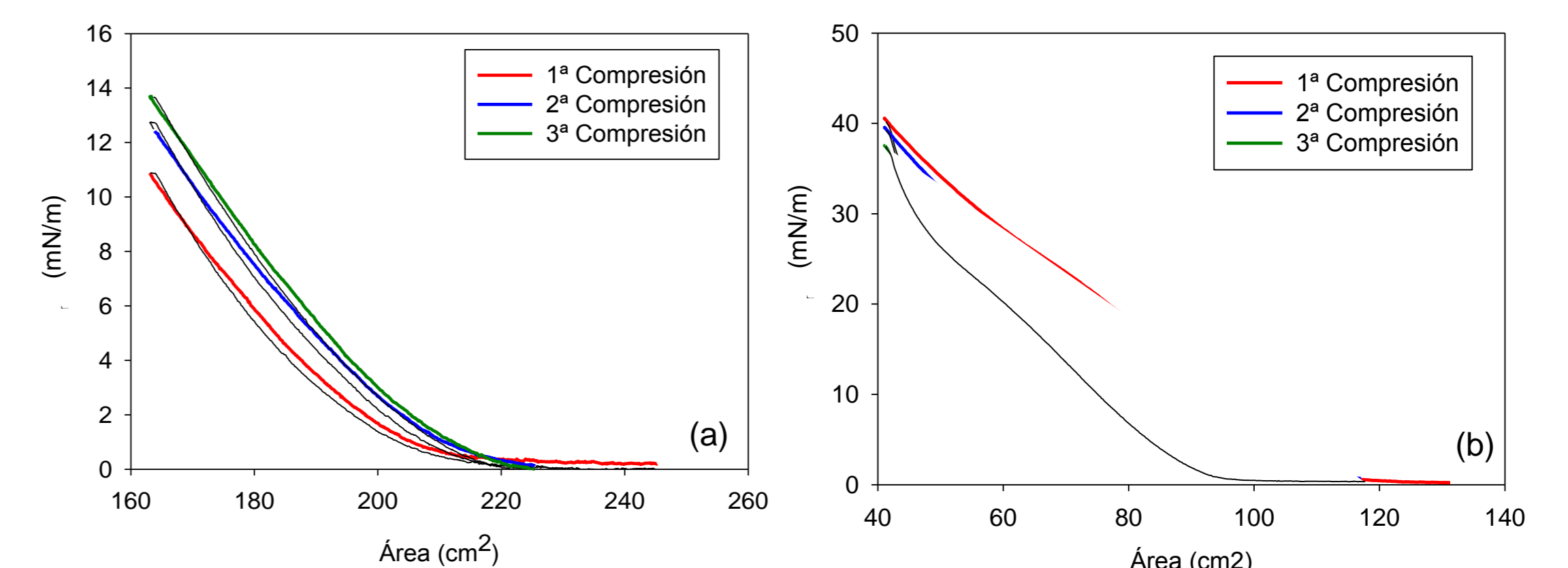


Fig. 5: Ciclos de compresión - descompresión de MEB dispersadas en la interfase agua-aire. En (a) se comprimió hasta 10 mN/m, en (b) se alcanzaron presiones cercanas a la $\pi_{colapso}$. En (a) se observa un aumento del área en los sucesivos ciclos de compresión, lo que sugiere que hay incorporación de material desde la subfase. En (b) se observa que la histéresis aumenta a mayores valores de π .

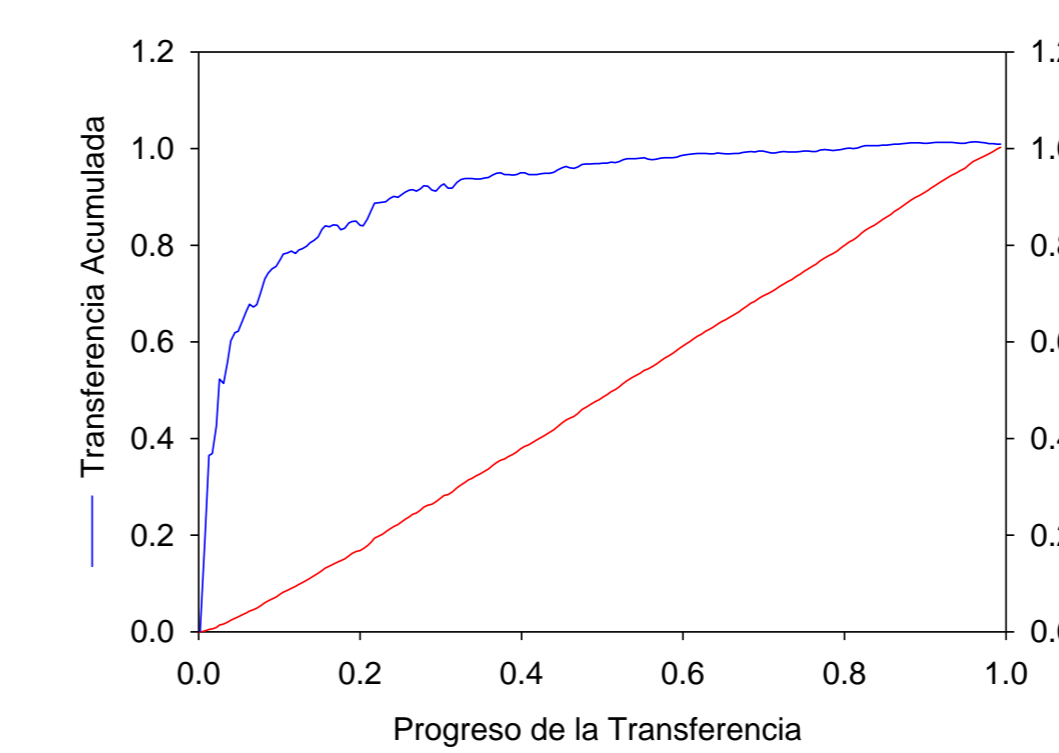


Fig. 8: Progreso de la transferencia. La transferencia representa el movimiento de las barreras, y la transferencia acumulada surge de dividir el área compensada por las barreras y el área del soporte sólido que ha sido sumergida. Ambos parámetros indican la calidad de la transferencia.

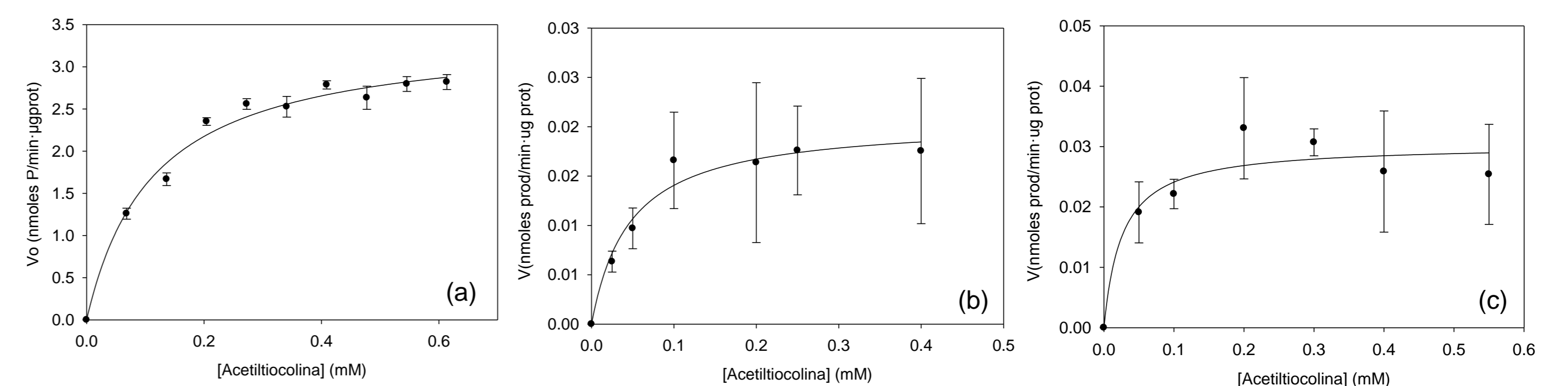


Fig. 9: Actividad catalítica de AEB vs. Concentración de sustrato (acetilcolina) con distintas fuentes de enzima. En (a), se utilizaron MEB en suspensión, en (b) LB_{MEB.10} y en (c) LB_{MEB.35}.

Tabla 2: Parámetros cinéticos de AEB en las MEB en suspensión y en los filmes LB

Fuente de enzima	$V_{m\acute{a}x}$ (nmoles P/min- μ g prot)	K_m (mM)
MEB en suspensión (n = 8)	$3,41 \pm 0,15$	$0,11 \pm 0,018$
LB _{MEB.10} (n = 5)	$0,021 \pm 0,0015$	$0,047 \pm 0,0125$
LB _{MEB.35} (n = 5)	$0,03 \pm 0,0029$	$0,026 \pm 0,0169$

Conclusiones

- Los valores del módulo de compresibilidad a la $\pi_{colapso}$ y a la $\pi_{transición}$ indican que la MEB posee un comportamiento de tipo líquido expandido a lo largo de toda la isoterma.
- A diferencia de lo observado para otras proteínas incorporadas a membranas, donde el aumento en la π indujo un cambio hacia una cinética sigmoidea, en este caso se obtuvo una cinética de tipo michaeliana para todos los tratamientos.
- La disminución de K_m en los LB respecto a las MEB en suspensión sugiere que un posible desplegamiento de AEB, al exponerse a la interfase aire-agua, modificaría su estructura 3D hacia una conformación de mayor afinidad para la formación del complejo enzima-sustrato. Se observa una disminución de $V_{m\acute{a}x}$ en los filmes LB, lo que sugiere que ocurre una transferencia selectiva de proteínas desde el film de Langmuir hacia el soporte sólido, con pérdida de AEB en relación a otras proteínas. El aumento significativo en la $V_{m\acute{a}x}$ de los LB₃₅ respecto a los LB₁₀ indica que la recuperación de la AEB mejora con un mayor empaquetamiento molecular, reflejado en la mayor π de transferencia.