

Licenciada en Bioquímica **María Elisa Mariani**

“PROPIEDADES MOLECULARES Y
CATALÍTICAS DE FOSFOLIPASA A₂ DE
SOJA (*Glycine max*) EN LA
BIOCONVERSIÓN DE FOSFOLÍPIDOS”

Director de Tesis: Dr. Ricardo Madoery

Co-director de Tesis: Dr. Gerardo Fidelio



Departamento de Química Biológica (CIQUIBIC) – CONICET

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Córdoba



Comision de Tesis

Dr. Ricardo Madoery (Director)



Dr. Fidelio Gerardo (Co-Director)



Dra. Álvarez Ma. Elena



Dra. Bujan Elba



Tribunal evaluador:

Dr. Fidelio Gerardo (Co-Director)



Dra. Álvarez Ma. Elena



Dra. Bujan Elba



Dra. Laura Leiva (Evaluador Externo)



En la vida a diferencia del ajedrez,
el juego continúa después del jaque mate.

Isaac Asimov

El trabajo que aquí se presenta fue llevado a cabo, si bien no formalmente, bajo la dirección del Dr. Gerardo Fidelio, quien a su vez ha sido el codirector de esta Tesis y quien ha guiado la trayectoria de este trabajo. A él, le estoy muy agradecida por su orientación e invaluable asesoría. Por enseñarme a dar los primeros pasos en el área de la Biofísica e incentivarme a estudiar, con paciencia, esmero y una excelente calidad humana. Por su invaluable contribución en mi formación doctoral, y por todo el apoyo incondicional brindado sin el cual no hubiese sido posible concluir este trabajo de Tesis.

A mis tres hombres:

Mi Padre Jorge, Mi Amor Augusto y mi Hijo Félix

Y a esa gran mujer que es mi Madre Estela

Su amor, su apoyo incondicional y su confianza me han impulsado a seguir esta disciplina del conocimiento y siguen siendo una de las razones más importantes que me hacen continuar adelante.



Agradecimientos

A mi Director de Tesis, el Dr. Ricardo Madoery, por creer en mí y haberme brindado la posibilidad de realizar mi Doctorado. Por su apoyo incondicional. Por compartir sus conocimientos, los cuales han aportado a mi crecimiento profesional. Muchas gracias por la buena predisposición, por las horas de charlas sobre resultados y experimentos durante mi Tesis y por su afecto.

Así mismo vuelvo a reconocer el esfuerzo desinteresado y el tiempo brindado del Dr. Gerardo Fidelio, a quien agradezco haber aceptado ser el codirector de esta Tesis.

A los miembros de mi comisión de Tesis, la Dra. María Elena Álvarez y a la Dra. Elba Buján, por sus consejos, recomendaciones y los aportes brindados en cada reunión. También por las oportunas sugerencias que permitieron mejorar este documento. A la Dra. Laura Leiva por aceptar la invitación de evaluar esta Tesis.

Al Departamento de Química Biológica (CIQUIBIC) y todos sus integrantes por permitirme formar parte y brindarme la posibilidad de llevar a cabo el desarrollo de mi Tesis facilitandome el uso de todas las instalaciones del mismo. También por la constante predisposición para brindar ayuda ante cualquier duda o problema que a uno se le presentara.

A la Facultad de Ciencias Químicas, por la formación otorgada durante todos estos años.

A todos los docentes de esta casa de estudios. En especial al Dr. Barra quien fue el padre que me inició en el camino de las Ciencias y a la Dra. Marta Hallak, una madraza durante mi paso por su laboratorio. A Marta, Bety Caputto y Bruno Maggio, que gracias a sus cartas de recomendación he podido realizar el curso de proteínas en París y asistir al Congreso Internacional de la Biophysical Society en San Diego (USA).

A CONICET, SECYT y FONCYT por la ayuda económica durante mi Tesis.

Mi reconocimiento al Dr. Marcos Villareal por su colaboración en la primera parte de esta Tesis, sus valiosos aportes y meticulosa revisión del primer manuscrito publicado.

Al Dr. Daniel García por darme la posibilidad de continuar en este camino.

A mi Familia por el amor y la paciencia que me tuvieron, acompañándome y brindándome incondicionalmente su apoyo y estar siempre a mi lado. A mis padres Estela y Jorge, mis hermanas Virginia y Angie, y a mis cuñados Oscar y Nazareno, con amor y cariño. En especial a mi hermana Angie que me banco prestándome su departamento para estudiar cada vez que lo necesite, para escribir papers, leer y hasta para la tesis. A mis sobrinos Amparo y Genaro que junto a mi hijo son la luz de mis ojos. A mis abuelos Gladys, Antonio, Margarita y Félix, quienes en vida han impulsado mi entusiasmo por la investigación científica y me han regalado los recuerdos más bellos de mi infancia. A mi padrino y su mujer Doris, por creer en mí y estar presentes siempre. A Oscar Sosa Gallardo y Yoyí, que siempre me han escuchado y apoyado en este camino.

A mi amor Augusto, que desde que lo conocí me apoyó incondicionalmente en este camino que elegí para mi vida y me sigue apoyando para que continúe en el mismo. Por su amor...su confianza...por comprender los tiempos de la ciencia...por siempre estar a mi lado dándome fuerzas...Gracias !!! Te amo !!!

A mis compañeros del grupo de Biofísica por el apoyo brindado durante estos años: a Sole Celej por las horas destinadas a las charlas, por sus correcciones de abstracts, por la lectura de la Tesis y su aporte intelectual en estos años; y alguna que otra salida nocturna para reírnos un poco. A Pablo, por sus instrucciones en el manejo de los equipos, por las charlas acerca de nuestras queridas fosfolipasas, por los consejos y por estar siempre a mi lado en las buenas y en las malas brindándome su apoyo. A Bel, por su aliento para ir hacia adelante siempre, por escucharme, por su buena predisposición para ayudar y brindar sus conocimientos. A Naty, Lau y Vane por sus aportes y consejos. A Benja por las charlas, sus chistes y los mates. A Franche, que siempre estuvo a mi lado...una gran amiga además de compañera. A Cande por las charlas más que científicas... de niños. A Nacho, mi vecinito de escritorio y mesada, gracias por las risas, los mates y por estar. A Agus, mi compañero de la Semana de las Ciencias, con el que disfruto llevar a cabo esa hermosa actividad. A Carla, Silvina, Ernesto G, Gaby, Julio, Rafa, Ernesto A, Fede, Fer, Mary, Gra y Willy. A todos, por las charlas científicas y no tan científicas, por los mates compartidos, por los viajes, por estar durante las alegrías, las tristezas y todo lo que vivido durante estos años.

A mis amigas, "las chicas de abajo" Lui, Vicky, Alyn, Sofi, Lu, Naty, Ade, Mari, Euge, Flor, Yani y Emi que siempre han estado presentes en cada momento. Por abrirme sus corazones, brindarme su amistad y apoyo incondicional, por los mates y las juntadas.

A Sole Bazán, Maurizio (mi hermano mayor) y Negro "bombon" Carpio (mi hermano menor), por su amistad brindada durante estos años y por su aporte entre copas y mates a mis conocimientos científicos y a mi vida en general.

A mis amigos de hoy y de siempre. A mis amigas de la vida y de la carrera de Bioquímica. A Mili, Sol, Lina, Yani, Enana, Choche, Mari, María del Mar, Colo, Eli, Lula, Gaby, Ceci, Marce, Andre, Ale Palacios, Layza, Turco, Mati, Andrés, Tuki, Primo y Gato, por ser mis compañeras incondicionales en este viaje, estar a mi lado en este camino que decidí transitar y compartir largas horas de charla no científicas y a veces hasta prestar el oído para escuchar algún que otro comentario referido a mi trabajo de Tesis.

A Dios, porque sin él nada sería posible y en su infinita sabiduría nos da lecciones difíciles de aprender comprendiéndolas en el camino de nuestras vidas. Gracias Dios por permitirme cumplir y llevar feliz y a término esta Tesis.

A todos ellos y a quienes en este momento posiblemente no recuerdo, pero que estuvieron a mi lado y me acompañaron en la realización de este trabajo de Tesis, solo espero sepan disculparme. Gracias por formar parte de mi vida. . . me hace muy feliz.

Índice

Abreviaturas	19
Resumen General	23
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN	29
1.1 <i>Las fosfolipasas: Clasificación</i>	29
1.2 <i>Aspectos generales de las fosfolipasas A₂</i>	31
1.2.1 <i>Potencial aplicación industrial de las sPLA₂s de plantas</i>	31
1.2.2 <i>Clasificación de las sPLA₂s de plantas dentro de la superfamilia PLA₂</i>	34
1.2.3 <i>Antecedentes: Desde los orígenes hasta la aparición de las sPLA₂ en plantas</i>	36
1.2.4 <i>Rol Biológico de las sPLA₂</i>	38
1.2.5 <i>Características moleculares de las fosfolipasas secretorias (sPLA₂)</i>	41
1.2.5.1 <i>Estructura de los dominios de proteína</i>	41
1.2.5.2 <i>Estructura tridimensional</i>	42
1.2.6 <i>Propiedades catalíticas de PLA₂ secretorias</i>	43
1.2.6.1 <i>Forma sin procesar y madura de las sPLA₂s</i>	43
1.2.6.2 <i>Propiedades Bioquímicas de sPLA₂s</i>	44
1.2.6.3 <i>Especificidad sn-, preferencia por grupo acilo y cabeza polar</i>	46
1.2.7 <i>El mecanismo de acción de fosfolipasa A₂</i>	48
1.2.7.1 <i>El mecanismo de catálisis interfacial de las PLA₂</i>	48
1.2.7.2 <i>El rol de la interfaz</i>	49
1.2.7.3 <i>Hidrólisis de agregados fosfolipídicos por PLA₂: Paradigma cinético</i>	50
1.2.7.4 <i>Activación interfacial de PLA₂</i>	52
1.2.7.5 <i>Teoría del canal hidrofóbico y la superficie de reconocimiento interfacial</i>	54
1.2.7.6 <i>Dos modos de catálisis interfacial extremos de PLA₂: Saltatorio vs. Adherido</i>	55
1.3 <i>Auxinas</i>	58
1.3.1 <i>Definición</i>	58
1.3.2 <i>Importancia Biológica</i>	58
1.3.3 <i>Antecedentes de estimulación de la actividad PLA₂ por auxinas</i>	59
1.3.4 <i>Receptores de auxinas</i>	60
1.4 <i>Hipótesis</i>	63
1.5 <i>Objetivos</i>	63
CAPITULO 2. EXPERIMENTAL	67

2.1. Materiales: reactivos y soluciones.....	67
2.2 Métodos y Fundamentación Teórica.....	68
2.2.1 Análisis Bioinformático: estudios <i>in silico</i>	68
2.2.1.1 Búsqueda de genes <i>sPLA₂</i> putativos en el genoma de <i>Glycine max</i>	68
2.2.1.2 Análisis de secuencias.....	68
2.2.1.3 Comparación y análisis de secuencias.....	69
2.2.1.4 Análisis filogenético.....	69
2.2.1.4.1 Secuencias empleadas para armar el árbol filogenético.....	69
2.2.1.4.2 Programa PHYLIP.....	70
2.2.1.5 Modelado por homología y dinámica molecular.....	70
2.2.1.5.1 Construcción de la estructura tridimensional de GmsPLA ₂ -XIA-1.....	70
2.2.1.5.2 La dinámica molecular.....	71
2.2.2. Construcción de las proteínas recombinantes: GmsPLA ₂ -XIA-1 y -XIB-2.....	72
2.2.2.1 Sistema de clonado y expresión de proteínas en procariontes.....	72
2.2.2.2 PCR y obtención de plásmidos de clonado y expresión.....	74
2.2.3 Secuenciación de nucleótidos.....	75
2.2.4 Expresión de proteínas recombinantes GmsPLA ₂ s.....	77
2.3.5 Metodología de purificación de proteínas: Cromatografía de afinidad por níquel.....	79
2.3.5.1 Fundamento de la técnica.....	79
2.3.5.2 Purificación de proteínas GmsPLA ₂ s.....	80
2.3.6 Electroforesis SDS-PAGE.....	82
2.3.7 Semi-Cuantificación de proteínas.....	82
2.3.8 Espectrometría de Masa y Secuenciación de proteína.....	83
2.4. Estrategias para el estudio cinético de <i>sPLA₂</i> s.....	83
2.4.1 Métodos de determinación de la actividad <i>sPLA₂</i>	84
2.4.1.1 Determinación indirecta de la actividad <i>sPLA₂</i>	84
2.4.1.2 Ensayo colorimétrico: cuantificación de ácidos grasos libres.....	85
2.4.2 Determinación de las condiciones óptimas de actividad.....	86
2.4.2.1 Medición de la velocidad inicial.....	86
2.4.2.2 Determinación de las condiciones óptimas para la catálisis.....	86
2.4.2.2.1 pH óptimos.....	86
2.4.2.2.2 Temperatura óptima.....	87
2.4.2.2.3 Efecto de calcio en la preservación de la estructura frente a la temperatura... 87	
2.4.2.2.4 Requerimiento de calcio óptimo.....	87

2.4.2.3 Determinación de los Parámetros cinéticos.....	87
2.4.2.4 Determinación de la preferencia de sustrato que difieren en su cabeza polar	88
2.4.2.5 Determinación del modo interfacial de acción	89
2.4.2.6 Cálculo de la relación micela/enzima	89
2.4.2.7 Efecto de las auxinas sobre la actividad GmsPLA ₂ en micelas mixtas.....	90
2.5 Espectroscopia de Fluorescencia de triptófano para proteínas.....	90
2.5.1 Fundamento de la técnica	90
2.5.2 Medición de la fluorescencia de triptófano de GmsPLA ₂ -XIA-1.....	92
2.6 Técnica de capas monomoleculares	92
2.6.1 Estudio de las membranas lipídicas en monocapas	93
2.6.2 Equipos de monocapas empleados.....	95
2.6.2.1 Equipo de monocapas circular.....	95
2.6.2.2 Equipo de monocapas KSV.....	96
2.6.3 Isoterma de adsorción de Gibbs: isoterma de penetración.....	96
2.6.4 Isoterma de compresión de Langmuir.....	97
2.6.4.1 Cálculo de MMA corregido.....	98
2.6.5 Medición de la actividad sPLA ₂ s.....	98
2.6.6 Efecto de auxinas sobre la actividad sPLA ₂	101
2.7 Estimación de lipofilicidad de auxinas en base a la estructura química	102
CAPÍTULO 3. ESTUDIOS IN SILICO DE PLA₂	105
3.1 Marco General	105
3.2 Resultados y Discusión.....	105
3.2.1 Búsqueda e identificación de genes putativos para sPLA ₂ de <i>Glycine max</i>	105
3.2.2 Análisis de las secuencias sPLA ₂ s de <i>Glycine max</i>	106
3.2.3. El análisis filogenético y la clasificación de las isoformas GmsPLA ₂	109
3.2.4 Modelado por homología de GmsPLA ₂ -XIA-1.....	111
3.2.4.1 Dinámica molecular de GmsPLA ₂ -XIA-1 en agua.....	113
3.2.4.2 Dinámica Molecular en ausencia de ion calcio.....	120
3.2.4.3 Fluorescencia intrínseca de triptófano de GmsPLA ₂ -XIA-1.....	121
3.2.4.4 Dinámica Molecular en disolvente mixto.....	122
3.3 Conclusiones	124
CAPITULO 4. PROTEÍNAS RECOMBINANTES: Clonado, expresión y purificación de sPLA₂s de <i>Glycine max</i>	129
4.1 Introducción	129
4.2 Resultados y discusión.....	129

4.2.1 Clonado de las proteínas recombinantes	130
4.2.1.1 Clonado de GmsPLA ₂ -XIA-1 y GmsPLA ₂ -XIB-2	130
4.2.1.2 Secuenciación de nucleótidos	131
4.2.2 Expresión y purificación de GmsPLA ₂ s	131
4.2.2.1 Electroforesis SDS-PAGE	134
4.2.2.2 MASA y Secuenciación del N-terminal de GmsPLA ₂ -XIA-1 y -XIB-2	134
4.3 Conclusión	135
CAPÍTULO 5. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ACTIVIDAD sPLA₂	139
5.1 Introducción	139
5.2 Resultados y discusión	140
5.2.1 Propiedades catalíticas de los GmsPLA ₂ s recombinantes	140
5.2.1.1 Determinación de la condición de velocidad inicial	140
5.2.1.2 Determinación de pH óptimo	140
5.2.1.3 Temperatura óptima	141
5.2.1.4 Concentración de ión calcio óptima	141
5.2.1.5 Efecto de ión calcio en la estabilidad térmica de GmsPLA ₂ -XIA-1	142
5.2.1.6 Modo de la catálisis de GmsPLA ₂ -XIA-1	143
5.2.2 Los parámetros cinéticos de las GmsPLA ₂ s recombinantes	144
5.2.3 Especificidad por fosfolípidos con diferente cabeza polar de GmsPLA ₂ s	146
5.3 Conclusión	150
CAPÍTULO 6. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD sPLA₂ EN MONOCAPAS	155
6.1 Introducción	155
6.2 Resultados y Discusión	155
6.2.1 Ensayo de actividad sPLA ₂ en interfaces agua/aire	155
6.2.1.1 Dependencia de la actividad con la concentración de enzima	155
6.2.1.2 Dependencia de la actividad sPLA ₂ con la presión de superficie	156
6.3 Conclusiones	157
CAPÍTULO 7. ESTUDIO DEL EFECTO DE AUXINAS SOBRE LA ACTIVIDAD sPLA₂	161
7.1 Introducción	161
7.2 Resultados	162
7.2.1 Estudio del efecto estimulante de las auxinas sobre la actividad sPLA ₂ en micelas mixtas	162
7.2.2 Interacción de las auxinas con interfaces lipídicas. Estabilidad de fitohormonas en una membrana como medio ambiente	164
7.2.2.1 Isotermas de Compresión de DLPC puro y sus mezclas con auxina	164
7.2.2.2 Isotermas de Penetración de auxinas	165

7.2.3 Estudios de Actividad $sPLA_2$ en monocapas mixtas DLPC/auxina: efecto de las auxinas sobre la actividad PLA_2	167
7.3 Discusión	168
7.4 Conclusión	170
CAPITULO 8. CONCLUSIÓN GENERAL	175
Perspectivas	177
Bibliografía	179



13

Abreviaturas

Ala	Alanina
Asn	Aspargina
Asp	Ácido aspártico
CBB	Coomasie azul brillante
C:M	Cloroformo: metanol
CMC	Concentración micelar crítica
DLPA	1,2-dilauroil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfato (sal de sodio) o ácido dilauroil fosfatídico
DLPC	1,2-dilauroil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina o dilauroilfosfatidilcolina o dilauroil fosfatidilcolina
DLPE	1,2-dilauroil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamina o dilauroilfosfatidiletanolamina o dilauroil fosfatidiletanolamina
LPG	1,2-dilauroil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfo-(1'- <i>rac</i> -glicerol) (sal de sodio) o dilauroil fosfatidilglicerol
EDTA	Ácido etilen diamino tetraacético
Gdn.HCl	Cloruro de Guanidinio
Gly	Glicina
His	Histidina
HPTLC	Cromatografía en capa fina de alta resolución
IAA	Ácido indol acético
IPA	Ácido indol propiónico
K _M	Constante de Michaelis
Leu	Leucina
Lys	Lisina

Met	Metionina
PM	Peso molecular
MPM	Marcadores de peso molecular
Π	presión lateral de superficie ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$)
PA	Ácido fosftidico
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosftidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
Phe	Fenilalanina
PL	Fosfolipasa
PLA ₁	Fosfolipasa A ₁
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
PLA ₂ s	Fosfolipasas A ₂
PM	Peso molecular
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SDS	Dodecil sulfato de sodio
sPLA ₂	Fosfolipasa A ₂ secretoria
sPLA ₂ s	Fosfolipasas A ₂ secretorias
T	tiempo
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
Ub	Ubiquitina
USP2cc	Deubiquitinasa
V _{máx}	Velocidad máxima
ΔV	Diferencia de potencial de superficie (mV)

Prólogo

Los motivos que llevaron a realizar este trabajo de Tesis fueron por un lado, el hecho que las enzimas fosfolipasas poseen un elevado potencial de aplicación biotecnológica, a nivel industrial y farmacéutico, y por otro lado, que sólo se encuentran comercialmente accesibles enzimas obtenidas de fuentes animales y microbianas, las cuales no cumplen con los requerimientos de las actuales normativas alimentarias internacionales. Por otra parte, las fosfolipasas A₂ (PLA₂s) de ambas fuentes son relativamente pocos específicos dados que promueven la formación de productos secundarios en la hidrólisis de fosfolípidos.

La bioconversión enzimática es la única vía selectiva para la obtención de *sn*-2¹ lisofosfolípidos, productos de superior hidrofiliidad y consecuentemente mayor poder emulsionante que los fosfolípidos originales. Estos bioemulsionantes presentan amplio campo de aplicación en las industrias alimentaria y farmacéutica.

Las enzimas PLA₂ secretorias catalizan la hidrólisis esteroespecífica a nivel del carbono quiral (*sn*-2) de los glicerofosfolípidos por lo que especialmente en el caso de PLA₂ vegetales las convierte en importantes biocatalizadores industriales. Por ello es que resulta importante contar con la posibilidad de emplear una sPLA₂ proveniente de plantas como biocatalizador en la producción de lisoderivados destinados a la formulación de bioemulsificantes.

Como antecedente inmediato, una enzima PLA₂ de soja (*Glycine max*), fue aislada, purificada y caracterizada, a partir de semillas de soja, por el equipo del Dr. Ricardo Madoery (Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC). La enzima se obtuvo parcialmente homogénea y se caracterizó enzimáticamente quedando pendiente un estudio más profundo y detallado donde ésta se encuentre en su forma pura.

Si bien se cuenta con abundante información acerca de las PLA₂s de origen animal, poco se sabe sobre las enzimas de fuentes vegetales razón por la cual, el trabajo se tornó interesante ya que se cuenta con pocos antecedentes bibliográficos que informen acerca de la presencia de PLA₂ en diferentes plantas.

A pesar de las dificultades encontradas en el camino, se pudo cumplir con los objetivos planteados en este trabajo de Tesis y culminar con optimismo, sabiendo que

¹ En la molécula de glicerol-3-fosfato del fosfolípido (o glicerofosfolípido) el carbono de la posición 2 (*sn*-2) del glicerol se encuentra esterificado.

ahora se cuenta con una enzima PLA₂ que muestra características óptimas para su utilización como biocatalizador a nivel industrial.

Resumen General

En el presente trabajo de Tesis se estudian las proteínas GmsPLA₂-XIA-1 y GmsPLA₂-XIB-2, sPLA₂ de soja (*Glycine max*), las cuales catalizan la hidrólisis del enlace *sn*-2 de fosfolípidos dando como producto ácidos grasos y lisoderivados (**Capítulo 1**).

En el grupo de investigación del Dr. Ricardo Madoery (Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC) se determinó la presencia de actividad PLA₂ en extracto de semillas de soja, a partir de la cual la enzima fue parcialmente purificada y caracterizada. La sPLA₂ resultó ser una enzima de reducida masa molecular (alrededor 13 kDa), con una dependencia milimolar de calcio para su actividad, pH óptimo ligeramente básico, estabilidad elevada frente al calor, estimulación por auxinas y probable modo catalítico saltatorio (hopping) de acción en presencia de vesículas multilamelares enriquecidas parcialmente por fosfolípidos aniónicos provenientes de lecitina de soja. Algunas de estas características son compatibles con otras sPLA₂s.

A pesar de haber sido determinada actividad PLA₂ en extracto de semillas de soja, no se pudo determinar la identidad de la enzima purificada, hecho que motivó en este trabajo de Tesis, una búsqueda bioinformática de los genes probables, a los fines de aseverar la existencia de este tipo de enzimas en soja (*Glycine max*) (**Capítulo 3**).

Frente a la hipótesis de la existencia de isoformas de PLA₂ que pudieran tener masas moleculares próximas que dificultaran la determinación de la identidad mediante secuenciamiento de la proteína purificada, se planteó la obtención de una proteína recombinante a los fines de poder estudiarla con mayor detalle molecular (**Capítulo 4**).

Para resumir, inicialmente se describió la presencia de 5 isoformas sPLA₂ en el genoma de *Glycine max*, cuyas secuencias fueron analizadas encontrándose que las mismas poseían características propias de sPLA₂s. Además se las clasificó dentro de la superfamilia de las sPLA₂s de plantas, ubicando tres de ellas en el subgrupo XIA y dos en el subgrupo XIB. Esta subdivisión se basó en las características halladas en la triada catalítica, secuencia N- terminal y diferencias en el sitio de unión a calcio (**Capítulo 3**).

También se determinó la estructura 3D de GmsPLA₂-XIA-1 mediante modelado por homología y dinámica molecular, y se identificaron los aminoácidos que estarían

formando la “*i-face*” o superficie de reconocimiento interfacial. Se sabe que estos aminoácidos difieren entre las proteínas, incluso dentro de la misma familia y subgrupo. Este estudio permitió junto con otros resultados obtenidos en esta Tesis, avanzar en la comprensión de las propiedades de asociación interfacial de las sPLA₂ de soja (**Capítulo 3**).

Dos de las 5 isoformas presentes en el genoma de *Glycine max*, llamadas GmsPLA₂-XIA-1 y GmsPLA₂-XIB-2, fueron seleccionadas en base a diferencias en sus masas moleculares y secuencia primaria, a los fines de ser caracterizadas a nivel bioquímico y estructural, avanzando así con el objetivo de obtener información acerca de aspectos estructurales, moleculares y cinéticos relacionados con las propiedades de asociación interfacial de sPLA₂ de soja (**Capítulo 4 y 5**).

Durante el desarrollo de los estudios que se presentan en esta Tesis, una etapa clave en el proceso de purificación de PLA₂ fue la cromatografía en columna de afinidad por níquel. Así la afinidad enzima-ligando resultó clave en la purificación e identificación de este tipo de proteínas, las cuales han demostrado ser difíciles de obtener hasta homogeneidad usando otros sistemas de purificación.

Para la medición de actividad se empleó un método espectrofotométrico específico, sensible y discontinuo, que permitió determinar el progreso de la reacción de hidrólisis de fosfolípidos, presentes en micelas mixtas, catalizada por las sPLA₂ purificadas. Este método resultó adecuado para el control de actividad enzimática durante las distintas etapas de purificación de la enzima sPLA₂ de soja y su posterior caracterización bioquímica (**Capítulo 5**).

Todos los estudios de caracterización empleando la metodología que se menciona arriba, resultaron coherentes con las propiedades esperadas para una enzima del tipo sPLA₂: reducida masa molecular, requerimiento micromolar de calcio, estabilidad frente a la temperatura, pH óptimo relativamente neutro.

En este trabajo, a partir de medidas tanto a través de la actividad utilizando micelas mixtas como la espectroscopia de fluorescencia de triptófano, que brinda idea sobre la conformación general, se ha encontrado que el calcio es importante para la estabilidad térmica de GmsPLA₂-XIA-1. Los resultados obtenidos con estas técnicas coincidieron con los obtenidos mediante dinámica molecular (**Capítulo 3 y 5**).

Además, el estudio cinético utilizando micelas mixtas reveló un comportamiento michaeliano, sugiriendo que sPLA₂s de soja tienden a actuar en modo *hopping o saltatorio* de catálisis interfacial (**Capítulo 5**). Esto, junto a una preferencia por sustrato

diferente a la observada para otras sPLA₂s, podría indicar diferencias estructurales a nivel de la superficie de reconocimiento interfacial la cual sería responsable a su vez de las diferencias catalíticas observadas. Estas observaciones sustentan la hipótesis principal que guió este trabajo de investigación con la posibilidad de establecer una correlación entre la composición amino-acídica de la "i-face" con las propiedades catalíticas interfaciales (parámetros cinéticos aparentes) de las GmsPLA₂s.

Mediante la técnica de capas lipídicas monomoleculares, se demostró que la actividad de estas enzimas depende de la presión lateral de superficie o del empaquetamiento de los lípidos en interfaces (**Capítulo 6**). Una de las hipótesis de este trabajo de Tesis consistió en determinar si el efecto de las auxinas, fitohormonas presentes en plantas, sobre la actividad lipolítica de PLA₂ es directo sobre la enzima o más bien un efecto en el cambio de la "calidad interfacial". Por ello, se estudió el comportamiento de auxinas en monocapas de DLPC observándose que tienen capacidad de penetrar y permanecer en la interface lipídica, así como también estimular la actividad sPLA₂. En micelas mixtas, también se observó una estimulación de la actividad sPLA₂ por auxinas (**Capítulo 5 y 8**).

Los resultados citados fueron obtenidos mediante el empleo de un conjunto de técnicas aplicadas a los diferentes sistemas experimentales entre los cuales es de principal importancia la utilización de sistema de capas monomoleculares sobre interfaces agua-aire, sistema de micelas mixtas y espectroscopia de fluorescencia de triptófano.

El trabajo de Tesis que se expone a continuación ha sido organizado de la siguiente manera: primero el **Capítulo 1**, que contiene la **Introducción** en la cual se describen todos los conocimientos y antecedentes que consideramos relevantes en relación a las características de las sPLA₂ y se plantean los objetivos de este trabajo de Tesis. Los detalles metodológicos sobre cada técnica además de una breve fundamentación en cada caso se encuentran en la sección **Experimental**, en el **Capítulo 2**. A continuación se encuentran desarrollados los **Capítulos 3 al 7** que contienen **Resultados, Discusión y Conclusión** y finalmente el **Capítulo 8** donde se exponen las **Conclusiones Generales**.

— CAPÍTULO 1 —

INTRODUCCIÓN

*“Especialista es el que sabe más y más . . . ,
de menos y menos. . . ,
hasta que llega a saber todo, de nada”.*

Anónimo

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Las fosfolipasas: Clasificación

Las fosfolipasas (PLs) son un grupo complejo e importante de enzimas que comparten la propiedad de hidrolizar un sustrato en común: fosfolípidos. Los fosfolípidos son moléculas anfifílicas constituyentes de biomembranas, por lo cual se autoagregan en medio acuoso formando diversas estructuras supramoleculares. Es por ello que estas enzimas actúan sobre sustratos anfipáticos en membranas biológicas u otras superficies como emulsiones, micelas, monocapas y bicapas [1, 2]. Las características de estas estructuras dependen de la longitud de la cadena hidrofóbica y del grupo polar [3] y están involucrados en una amplia gama de procesos fisiológicos tanto en plantas como en animales.

Las PLs se diferencian según el sitio sobre el que actúan en la molécula de fosfolípido, su función, modo de acción y regulación. Las PLs han sido involucradas en diversas funciones críticas para la vida, por ejemplo, el remodelado de las membranas donde se requiere la acción conjunta de una o más PLs. Sin embargo, su función va más allá de la homeostasis de la membrana. También cumplen diversos roles que van desde la digestión de nutrientes a la formación de intermediarios, moléculas bioactivas involucradas en la regulación celular (como el caso de la liberación de ácido araquidónico y diacilglicerol). En plantas, participan en procesos tales como la homeostasis de la membrana, la biosíntesis y el metabolismo de lípidos, respuestas al estrés y la señalización celular [4, 5]. Estos procesos pueden ser mediados, directa o indirectamente, por los productos de hidrólisis como lisofosfolípidos, ácidos grasos libres (FFA), diacilgliceroles (DAG), ácido fosfatídico (PA) y fosfato de colina (PC).

Dada la variedad de productos que se obtienen por actividad de PLs, éstas se clasifican en términos generales sobre la base de su especificidad posicional hacia sustratos fosfolípidicos (**Figura 1.1**) y se han definido con las denominaciones **A₁**, **A₂**, **B**, **C** y **D**. Las fosfolipasas A (PLAs) son acil hidrolasas clasificadas de acuerdo a si la hidrólisis es sobre el 1-acil ester (*sn-1*) (PLA₁) o el 2-acil ester (*sn-2*) (PLA₂). Algunas fosfolipasas son capaces de hidrolizar ambos grupos acilos por lo que reciben el nombre de fosfolipasa B. La Fosfolipasa C (PLC) cataliza la hidrólisis del enlace éster (P-O) que se encuentra entre el glicerol y el grupo fosfato situado en la cabeza polar del lípido, mientras que la fosfolipasa D (PLD) hidroliza el enlace éster (P-O) entre el fosfato y el grupo variable (indicado en la **Figura 1.1** como X)[6].

Las PLAs fueron una de las primeras fosfolipasas caracterizadas. Así, la identificación de las acciones líticas de PLs de veneno de víbora se remonta a finales del siglo XIX. Las plantas poseen un complejo y diverso conjunto de enzimas PLAs que difieren en la secuencia de nucleótidos, estructura de la proteína, propiedades enzimáticas y funciones celulares [4, 5, 7, 8].

En plantas, las PLAs comprenden cuatro subtipos dependiendo de la unión sobre la que actúen: PLA_1 que hidrolizan PC (PLA_1), PLA_2 que prefiere PA ($PA-PLA_1$), las secretorias de bajo peso molecular ($sPLA_2$), y PLAs tipo patatin ($PAT-PLA$ o $pPLA$), que exhiben actividad hacia ambas posiciones ($sn-1$ y $sn-2$) [8, 9]. La fosfolipasa B (PLB) no se ha identificado en plantas mientras que PLC y PLD si se encuentran presentes [10]. Dentro de cada tipo, existen diferentes familias y/o subfamilias de enzimas las cuales se subdividen de acuerdo a diferencias en las secuencias, propiedades bioquímicas o una combinación de ambas y se designan individualmente con letras griegas o números romanos. Estas enzimas pueden diferir en la especificidad por sustrato, requerimiento del cofactor Ca^{2+} y condiciones de reacción. Estas diferencias proveen una percepción acerca de la determinación de las funciones celulares específicas que llevan a cabo en plantas. Además, de acuerdo a su localización en el medio biológico, las PLAs se clasifican en extracelulares o secretorias e intracelulares.

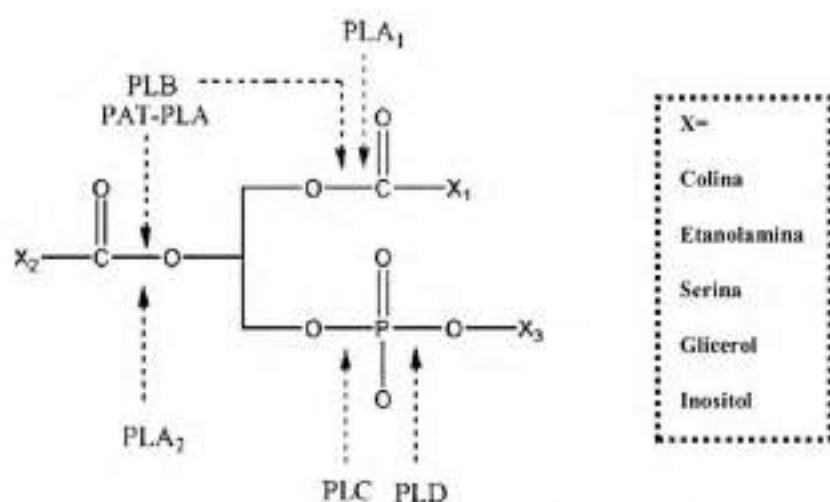


Figura 1.1 Especificidad posicional de las fosfolipasas. X: la cadena de ácido graso. PLA: fosfolipasa A; PLB: fosfolipasa B; PLC: fosfolipasa C; PLD: Fosfolipasa D. Las flechas indican el sitio atacado por cada fosfolipasa. Extraído y adaptado de [10].

Recientemente, mediante análisis genéticos y bioquímicos se determinó que además de tener múltiples tipos de fosfolipasas, las plantas poseen múltiples isoformas de

las enzimas PLA, PLC y PLD que difieren en el gen o la estructura de la proteína, los patrones de expresión, propiedades catalíticas y el desarrollo o la distribución específica en tejidos. Esto sugiere que poseen diversas funciones fisiológicas, las cuales aún no han sido completamente dilucidadas.

1.2 Aspectos generales de las fosfolipasas A₂

Las fosfolipasas A₂ (PLA₂, EC 3.1.1.4) fueron las primeras PLs en ser reconocidas. Son enzimas solubles en agua que catalizan la hidrólisis de la unión *sn*-2-acil-éster de fosfolípidos, generando ácidos grasos libres y 1-acil-2-liso-fosfolípidos (Figura 1.2). La superfamilia PLA₂ consiste en un amplio y creciente conjunto de enzimas, que aunque no están relacionadas, tienen en común dicha función.

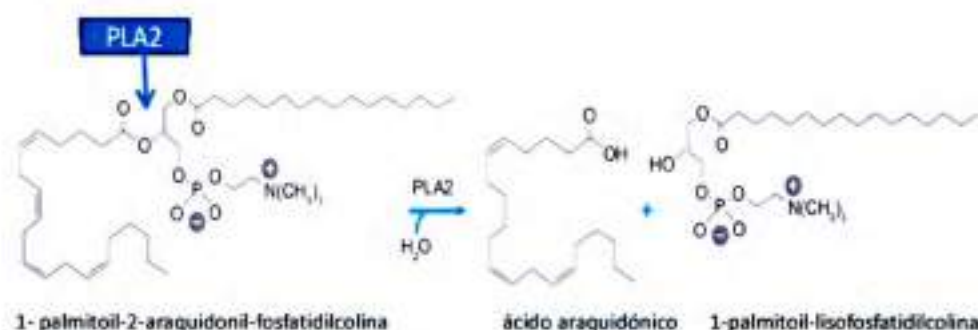


Figura 1.2 Esquema de la reacción de hidrólisis llevada a cabo por sPLA₂ en la posición *sn*-2 de fosfolípidos para producir ácido graso y liso-fosfolípidos. La enzima tiene un requerimiento de calcio absoluto. Adaptado de [11].

1.2.1 Potencial aplicación industrial de las sPLA₂s de plantas

La aplicación de la biotecnología en general, y de las enzimas en particular, en procesos industriales se encuentra en continuo crecimiento dado su mínimo impacto ambiental, ya que generalmente utilizan sustancias naturales y no se producen residuos tóxicos. Además, generalmente estos procesos industriales consumen poca energía y los productos de reacción son biodegradables [12].

Los fosfolípidos naturales y modificados han sido extensamente utilizados en la industria alimenticia, cosmética, farmacéutica y en agricultura.

Las PLs, obtenidas mayormente de microorganismos o mamíferos, han sido empleadas durante años por las industrias, ya sea para el refinado de aceites, productos lácteos, productos de panadería y otras industrias alimenticias. Las PLAs, demostraron ser

útiles para el desgomado de aceites y la síntesis de triglicéridos enriquecidos en ácidos grasos poli-insaturados [8].

PLA₂ promueve la hidrólisis de fosfolípidos y su conversión a lisoderivados. La mayoría de las sPLA₂s de páncreas animal (porcino o bovino) o de veneno (abeja, víbora) se han empleado durante años con el fin de convertir fosfolípidos en lisofosfolípidos ya que son enzimas fácilmente aisladas a partir de los órganos animales en grandes cantidades a un costo relativamente bajo y se encuentran comercialmente disponibles. Tienen una larga tradición en la industria, especialmente en la producción de alimentos, industria de la yema de huevo (emulsificación para mayonesa, salsas, aderezos de salsas y otras aplicaciones), panaderías y refinamiento de aceites vegetales mediante el desgomado [13, 14]. Sin embargo, los productos de fuente animal, son rechazados por muchos clientes por razones religiosas o riesgo de infecciones virales o de priones. Por otra parte, la utilización de una enzima de origen animal en procesos destinados a la obtención de aditivos alimentarios puede resultar incompatible para ciertas normativas internacionales, por lo que no es aceptada en algunos campos de aplicación. Es por ello que la producción industrial de PLA₂s de origen vegetal es deseable.

En la última década, las investigaciones se han centrado en el estudio de las aún poco conocidas PLAs de origen vegetal [5]. Importantes avances se han llevado a cabo en la identificación, clasificación, caracterización bioquímica y análisis funcional de las PLAs de plantas. El progreso reciente en el conocimiento de las propiedades bioquímicas y funcionales de PLAs en plantas ha permitido allanar el camino para la aprobación de la idoneidad de estas mismas para su uso comercial y diversas aplicaciones. Varias PLAs han demostrado un potencial elevado como blanco (target) en el campo de la biotecnología vegetal, y la diversidad molecular y catalítica que muestran las PLs de plantas son de un valor cada vez mayor para la biotecnología industrial y las aplicaciones industriales.

En el caso específico de sPLA₂ presente en semillas de soja (*Glycine max*), aún no se ha profundizado su estudio, sin embargo, la posibilidad de utilizar fosfolipasas vegetales en dichos procesos constituiría una ventaja, desde el punto de vista de las normativas alimentarias. Es por ello que resulta de gran interés el estudio de las propiedades de sPLA₂s de soja desde el punto de vista tanto agronómico como biotecnológico [15, 16], si se considera la posición de Argentina como tercer productor mundial de soja y como primer exportador mundial de aceite de soja. Por otra parte, cabe resaltar que como subproducto de la purificación del aceite de soja se obtienen las

“gomas”, material rico en fosfolípidos (65 % en base seca), que usualmente es utilizado en la alimentación animal o, previo secado, comercializado como lecitina de soja. Los productos de reacción que se obtienen por la acción de sPLA₂s, a partir de dicha materia prima, los lisofosfolípidos (lisolecitina), son ampliamente utilizados como emulsionantes en comidas, en la industria alimentaria o en la industria farmacéutica, dado su alto balance hidrofílico-lipofílico, con amplia aplicación en la industria alimenticia y farmacéutica [17, 18].

Recientemente, las sPLA₂s han sido probadas como catalizadores para la síntesis de fosfolípidos con ácidos grasos definidos por reesterificación de lisofosfolípidos [19]. Además, las sPLA₂s de plantas mostraron diferencias distintivas a las de animales en cuanto a la selectividad por sustrato respecto a la cabeza polar y las cadenas acilo de los glicerofosfolípidos [20]. Las propiedades únicas que poseen las PLAs de plantas ahora abren nuevos horizontes a la ingeniería de biocatalizadores. Definitivamente satisfacen los requerimientos de las regulaciones alimentarias internacionales como Kosher² y Halal³ y por lo tanto los productores se podrán ver incitados a emplear estas enzimas. Como se mencionó anteriormente, las PLAs de plantas deberían ser adecuadas para el desgomado enzimático en el refinamiento de aceites vegetales y la producción de biodiesel debido a la adaptación de las especificidades por sustrato a fosfolípidos que preferentemente están presentes en plantas.

Las sPLA₂s de plantas se espera que tengan ventajas frente a las provenientes de animales respecto al rendimiento o la incorporación de ácidos grasos poli-insaturados por ejemplo ácido linoléico en PC de huevo para la producción de alimentos. Por lo tanto, el proceso para la producción de fosfolípidos con ácidos grasos que no son comunes y que cumplen con los requerimientos especiales funcionales es deseable. A menudo, pequeñas diferencias en la estructura primaria o 3D resultan en diferencias en las propiedades catalíticas, las cuales pueden ser de gran importancia en aplicaciones biocatalíticas. Sin embargo, a pesar de su enorme potencial, aún no han sido consideradas las enzimas de plantas para la aplicación industrial. Esto podría atribuirse a la limitada disponibilidad de estas enzimas, recientemente descubiertas y caracterizadas. Además estas enzimas son

² La normativa Kosher se ha elaborado de acuerdo con las leyes dietéticas judías. Las leyes judías y las reglas se conocen colectivamente como kashrut.

³ <http://www.halalcertified.com>

mucho menos abundantes en su ambiente natural que las enzimas animales y ninguna se encuentra disponible comercialmente.

1.2.2 Clasificación de las sPLA₂s de plantas dentro de la superfamilia PLA₂

Cuatro criterios han sido tenidos en cuenta para la inclusión de una enzima en la superfamilia PLA₂. El primero es que debe catalizar la hidrólisis de la unión éster *sn*-2 de un fosfolípido. El segundo es que la secuencia completa de aminoácidos de la enzima debe ser conocida. El tercero es que cada grupo de PLA₂ debería incluir todas aquellas enzimas que sean rápidamente identificables por su secuencia homóloga. El cuarto tiene en cuenta las variantes del sitio activo del mismo gen de PLA₂ para ser consideradas proteínas distintas [2].

Un número cada vez mayor de PLA₂s están siendo identificadas dentro de esta superfamilia que se expande. Hasta el momento, se han identificado más de 15 grupos de PLA₂s que difieren en la estructura del gen [2, 21]. De éstos grupos, 10 están compuestos de enzimas extracelulares (PLA₂s secretoras), mientras que los otros se encuentran en el citosol (PLA₂s citosólicas). Recientemente Six y Dennis han categorizado y ordenado a las PLA₂s en dos grandes grupos basado en el mecanismo catalítico [2]: en un grupo están incluidas las enzimas que utilizan una His catalítica (**Tabla 1.1**) como el primer residuo catalítico (sPLA₂), mientras que el otro grupo involucra una Ser catalítica (son típicamente iPLA₂ y cPLA₂) (**Tabla 1.2**) y normalmente un intermediario acil-serina [21].

De acuerdo a su localización en el medio biológico y a sus propiedades biológicas, funcionales y estructurales, las PLA₂ se clasificaron en grupos, cuyo número se va ampliando, de acuerdo a la secuencia de aminoácidos, los cuales pueden ser simplificados en cinco clases: las secretoras de bajo peso molecular (sPLA₂s) principalmente presente en animales y plantas, las citosólicas (cPLA₂) dependientes de Ca⁺² en animales y hongos inferiores (levaduras), las intracelulares independientes de Ca⁺² (iPLA₂) en protistas, plantas y animales, las acetilhidrolasas factor activador de plaquetas [5, 22] en animales y las sPLA₂s lisosomales [23].

Hasta hoy, en plantas sólo dos de estas sPLA₂s han sido reportadas, basándose en las secuencias y propiedades biológicas: sPLA₂s de bajo peso molecular secretoras y PLA₂s del tipo patatin (similar a las independientes de Ca⁺² pero que muestran actividad PLA₁ y PLA₂) [23]. La presencia de PLA₂ citosólica en plantas no ha sido demostrada hasta el momento.

Tabla 1.1 *PLA₂s con sitio activo His catalítica* [2] [20].

Grupo	Fuentes comunes	Tamaño (kDa)	Puentes disulfuros
I	Veneno de cobra, páncreas de mamíferos	13-15	7
II	Fluido sinovial, cerebro, corazón, útero humano y de rata	13-17	6-8
III	Abeja, lagarto, escorpión y humano	15-18	5
V	Macrófagos, pulmón y corazón de mamíferos	14	6
IX	Veneno de serpiente	14	6
X	Leucocitos, timo y bazo humano	14	8
XI	Plantas	12-18	6
XII	Músculo, piel, riñón, corazón de mamíferos	18,7	7
XIII	Parvovirus	< 10	0
XIV	Hongos simbióticos, estreptomices	13-19	2

Tabla 1.2. *PLA₂s con sitio activo serina catalítica* [2] [20].

Grupo	Fuentes comunes	Tamaño (kDa)	Ubicación
IV	Células humanas, plaquetas, riñón de rata	61-114	Citosólica
VI	Macrófagos, linfocitos B humanos, músculo esquelético y corazón humano	84-90	Intracelular
VII	Plasma bovino, porcino, rata y humano	45	Intracelular
VIII	Cerebro humano	26	Intracelular

Para determinar si las sPLA₂s de plantas podrían ser incluidas dentro de los grupos reconocidos para sPLA₂s de animales, sus secuencias fueron comparadas con aquellas de animales de diferentes grupos. El criterio empleado para distribuir las sPLA₂s animales en los diferentes grupos fue: (1) similitud en la secuencia de aminoácidos, (2) número de

puentes disulfuro intramoleculares importantes para la estabilidad de la enzima, (3) posición de residuos de cisteína particulares conectados por puentes disulfuro, y (4) similitud de las extensión de aminoácidos en las posiciones correspondientes dentro de la proteína [24].

Las sPLA₂s de plantas contienen doce residuos Cys en su estructura, por lo tanto, tienen el potencial de formar seis puentes disulfuros. Esto las asemeja a las enzimas del Grupo V, sin embargo, comparten mayor similitud con las enzimas del grupo I cuando sólo el sitio de unión de Ca⁺² y los sitios catalíticos son considerados. Si la secuencia entera fuera comparada, las sPLA₂s de plantas se asemejarían más a las del grupo III y IX [20]. Por lo tanto, las sPLA₂s de plantas no pueden ser asignadas a ninguno de los grupos anteriormente mencionados existentes para sPLA₂s de animales. De acuerdo al criterio establecido para las sPLA₂s animales [2], las sPLA₂s de plantas se clasifican como un grupo separado de sPLA₂s, el grupo XI. El alineamiento de las secuencias identificadas hasta el momento, reveló que el grupo de las sPLA₂s de plantas puede subdividirse a la vez en dos subgrupos, debido a diferencias significativas en el peso molecular y desviaciones en la secuencia especialmente en la región -N y -C terminal de la proteína, llamados XIA y XIB (**Tabla 1.3**).

Las sPLA₂s de plantas clasificadas dentro del grupo XI, presentan residuo catalítico His y un residuo Asp; no obstante, conservan varios residuos de PLA₂ de otros grupos, incluyendo dos residuos Tyr y dos Gly dentro del sitio de unión a Ca⁺². Comparten poca similitud de aminoácidos en sus secuencias (sólo aproximadamente un 15%) con las de sPLA₂s de animales excepto en las regiones catalíticamente importantes como son el sitio de unión a Ca⁺² y el motivo del sitio activo (alrededor del 55% de identidad). La presencia de 14 residuos cisteína en la proteína inmadura y 12 en la proteína madura, distinguen las sPLA₂s de plantas de otras conocidas como PLA₂ His catalítica [2]. Es evidente que las células de planta, como la mayoría de las células de mamíferos, contienen varias sPLA₂s, sugiriendo que podrían cumplir diferentes funciones en la célula.

1.2.3 Antecedentes: Desde los orígenes hasta la aparición de las sPLA₂ en plantas

Hace más de un siglo, Bokay (1877-1878) observó que la fosfatidilcolina era degradada por un componente que se encontraba en el fluido pancreático. A comienzos de siglo, se encontró que el veneno de cobra poseía actividad hemolítica hacia membranas de eritrocitos (P. Keyes 1902). Una década más tarde se identificó que el compuesto

producido por la fosfolipasa de veneno era lisocitina (más tarde llamada lisolecitina). Así, la actividad PLA₂ fue estudiada por primera vez en la década de 1970 en veneno de cobra, más tarde en veneno de serpiente cascabel [22] y de avispa. Durante ese mismo período, se estudió la enzima digestiva pancreática porcina, que era capaz de hidrolizar fosfolípidos de mamífero, y también la enzima pancreática humana. De éstas últimas, la PLA₂ de páncreas porcino es la que mejor se ha caracterizado hasta el momento [25]. A finales de 1980 se reportaron actividades tipo PLA₂ en células de mamíferos en contraste con las actividades de las PLA₂ secretorias extracelulares de veneno y páncreas. Un cambio dramático en el campo de las PLA₂ ocurrió en 1988, cuando se informó la purificación, secuenciación y clonación de la primera PLA₂ secretoria humana no pancreática aislada del fluido sinovial de las articulaciones de una rodilla artrítica. En 1992, informaron de forma independiente la purificación, secuenciación y clonación de la primera PLA₂ citosólica humana (cPLA₂). Más adelante, las enzimas obtenidas conocidas como extracelulares, fueron purificadas, caracterizadas y definidas mecanística y estructuralmente [26].

Hasta hoy, más de 30 enzimas que poseen actividad PLA₂ o relacionadas han sido identificadas en mamíferos, pero sólo un tercio de estas enzimas (11) pertenecen a la familia de las PLA₂ secretoras (sPLA₂) [27]. Cabe destacar que la mayor parte del conocimiento sobre PLA₂s ha sido obtenido a partir del estudio sobre enzimas de origen no humano.

En comparación con las sPLA₂s de animales, el conocimiento generado acerca de las sPLA₂s de plantas es aún limitado, a pesar de que en los últimos años se han expresado enzimas recombinantes de plantas en *E.coli* y levaduras, se han caracterizado, y algunos estudios de actividad enzimática se han reportado en preparaciones más o menos crudas [28-30].

Recientemente varias sPLA₂s extracelulares han sido purificadas: La primera PLA₂ secretoria purificada hasta homogeneidad, secuenciada y caracterizada de origen vegetal, fue la sPLA₂ de endosperma de semillas de olmo (*Ulmus glabra*) en 1998 [31]. Posteriormente en 1999, se caracterizaron dos sPLA₂s (sPLA₂-I y -II) obtenidas a partir de brotes de arroz (*Oryza sativa*) [32]. Se clonaron dos sPLA₂s obtenidos a partir de ADNc de flores de clavel (*Dianthus caryophyllus*) [33]. Con el progreso en los proyectos de secuenciamiento de genomas, más sPLA₂s han sido identificadas: en tomate [20] y brotes de ricino (*Ricinus communis*) [34]. También se han aislado cuatro isoformas de sPLA₂s provenientes de *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) llamadas AtsPLA₂ - α , - β , - γ y - δ [4,

35-37], las cuales han sido expresadas [9, 32], dos isoformas han sido estudiadas en tabaco (*Nicotiana tabacum*) [38, 39] y citrus (*Citrus sinensis*) [40]. En soja (*Glycine max*) se han obtenido evidencias indirectas de la presencia de sPLA₂ midiendo la producción de lisofosfolípidos marcados [39, 41] y más adelante se ha purificado parcialmente una enzima PLA₂ con actividad [42]. Recientemente, se han obtenido sPLA₂s de trigo (*Durum wheat*) [43, 44]. En la **Tabla 1.3** se resumen las características de algunas de estas sPLA₂s.

Tabla 1.3 sPLA₂s de origen vegetal con sus números de acceso, características de sus N-terminal y purificación.

Fuente	Nombre	Purificación	N-terminal	Número de Acceso	Grupo XI	Ref.
olmo	sPLA ₂	Semillas	Madura			[31]
arroz	rPLA ₂ -I	Brotos de arroz	-	AJ238116	A	[32, 45]
	rPLA ₂ -II	ADNc	Madura	AJ238117	B	
	rPLA ₂ -III			AAK50122	B	
<i>Arabidopsis</i>	AtsPLA ₂ -α	ADNc	Recombinante	At2g06925	B	
	AtsPLA ₂ -β			At2g19690	A	
	AtsPLA ₂ -γ			At4g29460	A	
	AtsPLA ₂ -δ			At4g29470	A	
clavel	DesPLA ₂			AF064732	B	
tomate	LesPLA ₂			AI487873		
tabaco	Nt1PLA ₂	ADNc	Madura	AB190177	A	[46]
	Nt2PLA ₂	Extracto	-	AB190178	B	
trigo	TdsPLA ₂ I	Extracto de hoja	-	JX021445	A	[44]
	TdsPLA ₂ II	Extracto de hoja	-	JX021446	B	[44]
	TdsPLA ₂ III	Recombinante	6×His-TdsPLA2III	JX021447	B	[43]
	TdsPLA ₂ IV	Extracto de hoja	-	JX021448	B	[44]

Madura: sin aminoácidos extras en el N-terminal. Cuando la enzima se extrae de un órgano de la planta la purificación es parcial. Cuando se indica recombinante es que no se sabe si es madura, ya que no hubo secuenciamiento, sólo se sabe que no contiene al péptido señal.

1.2.4 Rol Biológico de las sPLA₂

Un rápido crecimiento se ha generado durante la década pasada en el conocimiento acerca de las funciones biológicas de las PLAs, de las cuales las más extensivamente estudiadas han sido las PLA₂s. En la naturaleza, las PLA₂s tienen diferentes funciones como pueden ser digestión (PLA₂ pancreática) y defensa (PLA₂ de veneno de insectos y víboras) o regulación celular y señalización [21, 47-49].

Las sPLA₂s de animales han sido detalladamente estudiadas y se sabe que desempeñan un papel fundamental en diversas respuestas celulares, como la defensa del

huésped, la transducción de señales, la digestión de fosfolípidos, el metabolismo [50] y la generación de precursores [49]. A pesar de que en animales como en plantas las PLAs cumplen funciones en la transducción de señales y el metabolismo de lípidos, cumplirían roles biológicos en plantas comunes y particulares.

En los últimos años, avances significativos se han llevado a cabo para conocer más a fondo la actividad de sPLA₂s en plantas. La presencia de sPLA₂ en plantas, ha sido sugerida desde hace tiempo y su actividad ha estado asociada con diversos procesos fisiológicos. Los productos derivados de la actividad de sPLA₂, ácidos grasos y lisofosfolípidos (LPL), estimulan diversas enzimas de membrana plasmáticas, tales como, H⁺-ATPasa, NADH oxidasa y proteína kinasa, y juegan un papel importante ya que son mensajeros secundarios en señales de transducción mediando una multitud de procesos celulares de crecimiento y desarrollo [4, 36, 51-53], incluyendo elongación celular, apertura de estomas, gravitropismo, tráfico intracelular, biosíntesis de ácido jasmónico y señalización de defensa [4, 36, 51-53] (**Figura 1.3**). Además, se propuso que la acción sPLA₂ puede potencialmente contribuir al daño en membranas vegetales, ya que la acumulación de ácidos grasos es un factor causante de daño fisiológico en vegetales [54] [55].

Las plantas a menudo se encuentran con stress abiótico producido por la alta salinidad, deshidratación y bajas temperaturas, que imponen condiciones de crecimiento adversas, que afectan el desarrollo, longevidad y productividad de la planta (**Figura 1.3**). El mecanismo adaptativo involucra la activación de numerosas vías de transducción de señales, que conducen a varios cambios moleculares, celulares y fisiológicos. Además, varias señales ambientales disparan la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana, lo que resulta en la generación de diferentes tipos de lípidos y mensajeros señal derivados de lípidos como el ácido fosfatídico (PA), diacilglicerol (DAG), DAG-fosfato (DGPP), lisofosfolípidos, ácidos grasos libres (FFAs), fosfoinosítidos e inositol polifosfato [56, 57].

La activación de las sPLA₂s en plantas ocurre en respuesta a la luz azul, presencia de auxinas [4, 58], stress abiótico [59, 60], stress por heridas e inductores de patógenos [4, 54, 58] (**Figura 1.3**). La información acerca de la señalización aguas arriba de la activación PLA₂ es limitada, debido a los pocos datos disponibles en cuanto a los genes PLA₂ que están involucrados en respuestas particulares en plantas. El análisis de las propiedades bioquímicas y moleculares de las isoformas de las sPLA₂s podrían proveer

claves básicas de la señalización aguas arriba que conducen a su activación, y sus roles celulares aguas abajo (**Figura 1.3**).

Se especula que las sPLA₂s de plantas podrían estar reguladas vía proteína -G, a partir de que se observó que un activador de proteína-G heterodimérica era capaz de estimular la actividad PLA₂ en plantas [61, 62]. Sin embargo, no hay pruebas directas que confirmen que las PLA₂s actúan acopladas a proteína-G como en ratón [63].

Se ha observado que la concentración de Ca²⁺ óptima para la actividad sPLA₂s en plantas varía con las condiciones de sustrato empleadas [37]. La concentración de Ca²⁺ en el espacio extracelular de las células de plantas se estima que ronda entre 1-10 mM [64]. Dependiendo del requerimiento de Ca²⁺ de cada sPLA₂, podremos encontrarla activa o parcialmente activa en el medio al que es secretada, el cual es modulado en plantas en respuesta a una variedad de estímulos incluyendo stress abiótico y biótico [64].



Figura 1.3 Diagrama esquemático que representa las vías de señalización río arriba y río abajo de las sPLA₂ de plantas. Río arriba representa la señalización que conduce a la activación de la sPLA₂ que podría involucrar receptores de unión a Proteína-G, fotoreceptores, pH apoplástico y niveles de calcio, y expresión de genes de isoformas específicas en respuesta a señales externas. Río abajo, los targets regulados por los productos de la hidrólisis llevada a cabo por la sPLA₂ que podrían involucrar la proteína quinasa, H⁺-ATPasa y PLDα para mediar procesos de señalización celular como la elongación celular, gravitropismo, senescencia, maduración de las semillas, apertura de los estomas, defensa y respuestas al stress. Basado en [20].

Como se puede evidenciar en la literatura hasta hoy disponible acerca de sPLA₂ de plantas, la mayoría de los trabajos se han realizado en el modelo dicotiledónea de *Arabidopsis* y otras especies donde la información disponible es mínima. Sin embargo, muchos trabajos reportaron que las enzimas de *Arabidopsis* están involucradas en redes de señalización y regulación de procesos celulares, por lo que es coherente pensar que en otras plantas estas enzimas podrían estar involucradas en funciones similares.

1.2.5 Características moleculares de las fosfolipasas secretorias (sPLA₂)

1.2.5.1 Estructura de los dominios de proteína

Mediante alineamiento de las secuencias, se determinó que las sPLA₂s de plantas poseen un dominio conservado llamado PA2c (Figura 1.4) que contiene al sitio de unión a Ca²⁺ conservado (YGKYCGxxxxGC) y al motivo del sitio catalítico (DACCxxHDxC) (patrones PS0018 y Pfam00068) que contiene a los residuos enzimáticamente activos conservados de la diada His/Asp, ambos identificados en sPLA₂s de animales [36, 37].



Figura 1.4 Esquema representativo de la estructura de una sPLA₂ sobre la cual se indican los dominios de relevancia catalítica y presencia del péptido señal.

Estudios en animales revelaron que la His funciona como una base para la deprotonación de una molécula de agua generando el nucleófilo que luego dará lugar al ataque sobre el carbono del éster carboxílico del sustrato, y el grupo β-carbonilo del Asp interacciona con el cofactor Ca²⁺ [2, 65]. Otros dos residuos conservados, Tyr and Gly, que se encuentran en el bucle de unión a Ca²⁺ en las sPLA₂s de plantas [36, 37], participan en la red de unión de puente hidrógenos en animales. Además, las sPLA₂s difieren en sus secuencias en el tercer aminoácido del sitio de unión a Ca²⁺ que se encarga de la coordinación: en las enzimas del grupo XIA ese aminoácido es una Gly como en animales, mientras que la Gly es reemplazada por una Leu o una Met en las enzimas del grupo XIB [66].

1.2.5.2 Estructura tridimensional

A pesar de que las secuencias de las sPLA₂s difieren significativamente, las estructuras tridimensionales tienen muchas características en común. Hay más de 40 entradas de sPLA₂s en el banco de datos de proteínas (PDB). Las estructuras nativas y complejas de sPLA₂s con mimetización del sustrato, han ayudado a identificar los residuos catalíticamente importantes presentes en el sitio activo.

Mediante cristalografía de rayos X se ha dilucidado la estructura terciaria de muchas sPLA₂s como la de páncreas porcino o veneno de abeja (bv-PLA₂) [65, 67] la cual reveló una arquitectura tridimensional común, rígida y con una región altamente conservada. Se observó que el sitio activo no se encuentra accesible a la fase acuosa, sino que se encuentra a lo largo de una superficie plana llamada "*i-face*", a lo largo de la cual la sPLA₂ interactúa con el sustrato presente en la interfaz [68].

El sitio catalítico se caracteriza por la presencia de una diada catalítica His-Asp [69] la cual junto con una molécula de agua funciona similar a la triada catalítica de las serina proteasas. El corazón conservado de las sPLA₂s consiste en dos α hélices, que están conectadas por dos puentes disulfuros y alberga al sitio activo, y un bucle de unión a Ca²⁺. El tercer puente disulfuro, invariante en todas las sPLA₂s, conecta una de las α hélices con el bucle de unión a Ca²⁺. Otra característica estructural importante de las sPLA₂s es el canal hidrofóbico que estabiliza la unión del sustrato mediante un grupo de aminoácidos hidrofóbicos, como Phe, Leu y Tyr, y el sitio de unión interfacial que se encuentra en la apertura del canal hidrofóbico [69]. A pesar de poseer baja similitud en las secuencias de aminoácidos entre las sPLA₂s de plantas y las de animales, cuando se comparan las secuencias completas, el corazón de las proteínas es similar.

En plantas, se han resuelto pocas estructuras tridimensionales de sPLA₂s. Mediante modelado por homología se obtuvo la estructura de AtsPLA₂- α de *Arabidopsis* (PDB AY136317), donde se demostró que comparativamente a la sPLA₂ de páncreas porcino (grupo I) o de veneno de abeja (grupo III), la región catalítica con sus dos α hélices estabilizadas por dos puentes disulfuros y el sitio de unión a Ca²⁺ son congruentes [66]. Se observó que tres de los seis puentes disulfuros están conservados tanto en plantas como animales [66]. Dos de esos puentes disulfuro estabilizan las dos α hélices antiparalelas centrales, mientras que el tercer puente disulfuro une el sitio de unión a Ca²⁺ altamente conservado a la α hélice que contiene a la His catalítica y el Asp que coordina el ión Ca²⁺.

Recientemente, se determinó también la estructura cristalina de la isoforma II de sPLA₂ de arroz (PDB AJ238117) la cual parece ser bastante diferente a la de sus homólogos en animales [45]. La mitad N-terminal de la secuencia contiene principalmente una estructura en bucle, incluyendo el bucle de unión a Ca²⁺ conservado y también incluye dos hojas β-antiparalelas cortas. La mitad C-terminal se compone de tres α-hélices antiparalelas, pero sólo las dos primeras están presentes en otras sPLA₂s.

Diferencias sorprendentes se encontraron en el Asp de la díada catalítica His/Asp (en la sPLA₂ pancreática es el Asp99 y en abeja el Asp64), la cual no es conservada en plantas. Este residuo catalíticamente importante es reemplazado por una Ser o una Asn en las enzimas del grupo XIB y por una His o una Asn en las enzimas del grupo XIA. Mediante modelado por homología se determinó que los residuos Ser, His, Asn pueden adoptar el rol catalíticamente importante que cumple el Asp en sPLA₂s de animales [66].

Todas las estructuras de las sPLA₂s tienen la misma constelación de los residuos catalíticos His-Asp-Ca²⁺ en la arquitectura del sitio catalítico. La característica que difiere entre las sPLA₂s son generalmente los residuos que conforman la llamada "i-face" o "microsuperficie de reconocimiento interfacial (SRI)" y otros residuos de superficie que son parte del sistema de reconocimiento para otras funciones.

1.2.6 Propiedades catalíticas de PLA₂ secretorias

1.2.6.1 Forma sin procesar y madura de las sPLA₂s

Así como en su contraparte en animales, en las sPLA₂s de plantas se predijo mediante análisis de las secuencias, la existencia de péptidos señal putativos en el extremo N-terminal, lo que indicaría que por asemejarse a las de animales deberían ser enzimas secretadas al espacio extracelular [4] (Figura 1.4) en su forma madura, luego de que su péptido señal es removido en el retículo endoplásmico. A nivel celular, las sPLA₂s podrían funcionar durante la secreción (en el compartimento secretorio o en el espacio extracelular de manera autócrina o parácrina) y durante la internalización [70].

Mediante ensayos de expresión transitoria empleando células epidérmicas de cebolla, se halló que *Ats*PLA₂-β y -γ son en efecto secretadas al espacio extracelular [36, 37]. Además, se observó que tanto *Ats*PLA₂-β como sPLA₂-I de arroz contienen las secuencias KTEL y KLEL, respectivamente, en sus extremos C-terminal, que son similares a las secuencias de retención en el retículo endoplásmico KDEL y HDEL [71].

Algunas sPLA₂s de plantas con características de secretorias tienen secuencias de retención y quedan retenidas en un entorno no óptimo (por ejemplo *Ats*PLA₂-γ), en el

cual la enzima se encuentra inactiva. Sin embargo estudios en animales sugieren que la sPLA₂ monomérica (inactiva) se convierte en dimérica (activa) con la ayuda de membranas cargadas negativamente y por interacción mediada entre sPLA₂ y productos de los lípidos. Por lo tanto se especula que serían secretadas al espacio intercelular, luego cambiarían su estructura conformacional para lograr la actividad óptima [72]. No obstante, el control de la función de las sPLA₂s ocurre a nivel transcripcional, pero también mediante mecanismos regulatorios durante la secreción, por maduración proteolítica, por propiedades biofísicas de la superficie de la membrana en donde la enzima opera, y por inhibición y degradación debido a la unión de la sPLA₂ a proteínas de unión específicas [11].

En la **Tabla 1.4** se encuentra resumida toda la información referente a las formas maduras de las diferentes sPLA₂s halladas hasta el momento de *Arabidopsis*, olmo, arroz, clavel, tomate, trigo y tabaco. Se observó que la actividad de *Ats*PLA₂- β y - γ es 2.0 y 1.3 veces más específica para la hidrólisis del sustrato que la de las formas sin procesar que contienen el péptido señal [36, 37], lo cual se sabe que se debe a un rearrreglo estructural de la enzima durante la maduración.

Tabla 1.4 Masa molecular, punto isoelectrico y actividad de las diferentes sPLA₂s de plantas.

Procedencia	Nombre	Masa molecular de la proteína madura (kDa)	pI	Actividad ($\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ proteína)	Ref.
<i>Arabidopsis</i> .	<i>Ats</i> PLA ₂ - α	14,2	7,7	16,7 (DOPC)	[20, 73]
	<i>Ats</i> PLA ₂ - β	16,3	8,2	0,53	[20]
	<i>Ats</i> PLA ₂ - γ	17,5	8,3	-	[20]
	<i>Ats</i> PLA ₂ - δ	18,0	7,7	-	[20]
arroz	rPLA ₂ -I	12,9	7,9	-	[20]
	rPLA ₂ -II	13,8	5,5	145	[20, 45]
	rPLA ₂ -III	13,5	4,8	-	[20]
clavel	DcsPLA ₂	12,4	6,9	-	[20]
tomate	LesPLA ₂	13,9	6,9	-	[20]
olmo	sPLA ₂	13,9	-	90	[20, 31]
tabaco	Nt1PLA ₂	16,2	-	8,2	[20, 46]
	Nt2PLA ₂	12,7	-	-	[20]
trigo	TdsPLA ₂ s-III	13,9	-	3,2	[43]

1.2.6.2 Propiedades Bioquímicas de sPLA₂s

Las sPLA₂s extracelulares de plantas son moléculas pequeñas compactas (12-18 kDa), similares a las sPLA₂ de animales que tienen alrededor de 120 aminoácidos en su

secuencia. Contienen 12 residuos Cys altamente conservados, como se mencionó previamente, que tienen el potencial de formar 6 puentes disulfuros [4]. Estudios en sPLA₂s de animales indicaron que los residuos Cys juegan un rol crítico en la estabilidad estructural y la actividad enzimática [74]. Notablemente, las posiciones de aminoácidos de los 7 residuos cisteína están altamente conservadas en sPLA₂s tanto de veneno como de plantas [36].

El Ca²⁺ tiene un rol directo en la catálisis llevada cabo por las sPLA₂s, cuyo mecanismo catalítico es diferente al de otras PLA₂s [2]. Es por ello que las sPLA₂s son Ca²⁺ dependientes para su actividad óptima (Tabla 1.5), con un amplio rango de requerimientos de Ca²⁺ que va desde el orden micromolar a milimolar. Además, se sabe que las concentraciones de Ca²⁺ afectan la actividad enzimática como se mencionó en la sección 1.2.4.

Estas enzimas desarrollan actividad óptima en un rango de pH entre 6 y 9, son estables al calor y a los agentes desnaturalizantes, y difieren en las especificidades por sustrato. En la Tabla 1.5 se muestran las condiciones óptimas de pH y Ca²⁺ para varias sPLA₂s de plantas. Como puede observarse, *Ats*PLA₂- γ y - δ en su localización subcelular (entorno ácido) podrían encontrarse inactivas ya que requerirían de un aumento de pH en el medio para su activación. Lo mismo se observó para sPLA₂ purificada de olmo [31].

Tabla 1.5 Requerimientos óptimos para las propiedades catalíticas de las diferentes sPLA₂s halladas en plantas.

Procedencia	Nombre	pH	Requerimiento de calcio *	T (°C)	Ref.
<i>Arabidopsis</i>	<i>Ats</i> PLA ₂ - α	8-9,5	10 mM	30-40	[20, 73]
	<i>Ats</i> PLA ₂ - β	6-7	μ M	-	[20]
	<i>Ats</i> PLA ₂ - γ	7-9	μ M	-	[20, 37, 72]
	<i>Ats</i> PLA ₂ - δ	8-9	μ M	-	[20]
arroz	rPLA ₂ -I	-	-	-	
	rPLA ₂ -II	-	-	-	
	rPLA ₂ -III	-	-	-	
clavel	DcsPLA ₂	-	-	-	
tomate	LesPLA ₂	-	-	-	
olmos	sPLA ₂	8-9	10-15 mM	-	[31]
tabaco	Nt1PLA ₂	8-10	< 1 mM	-	[38, 46]
	Nt2PLA ₂	-	-	-	
trigo	TdsPLA ₂ III	5,5-9	2mM	-	[44]

* Para las sPLA₂s de *Arabidopsis* - β , - γ , - δ , se ha reportado un requerimiento μ M sin precisar concentración.

Tanto *AtsPLA₂-α* como *-β*, retienen casi toda la actividad enzimática luego de 5 minutos de ser calentadas en agua hirviendo (80-95%), pero pierden entre un 35-65% de su actividad en presencia de 5mM DTT (ditiotreitól), un agente reductor [36], observándose un comportamiento similar para la *sPLA₂* purificada de olmo [31].

1.2.6.3 Especificidad *sn*-, preferencia por grupo acilo y cabeza polar

A pesar que la especificidad por sustrato está dada por los valores relativos de k_{cat}/K_M , los estudios de especificidad por sustrato de las enzimas interfaciales a menudo se llevan a cabo comparando las velocidades de hidrólisis de los agregados con diferentes lípidos puros. Esta forma de evaluar la afinidad por diferentes sustratos hace que sean difíciles de interpretar los resultados, porque reflejan tanto la especificidad de la enzima en la interfaz como las diferencias de afinidad de la enzima por los diferentes agregados (*E* a *E**). Esta última puede determinarse mediante estudios directos de binding y la primera dejando que la enzima actúe en modo adherido conteniendo sustratos que compitan entre sí. Cabe dejar claro que los estudios llevados a cabo con un solo sustrato y luego midiendo la velocidad relativa no es una representación adecuada de la especificidad por sustrato.

Las especificidades de las *AtsPLA₂s* se han determinado empleando PE y PC. No se detectó actividad en LPE y LPC, lo cual sugirió que las *AtsPLA₂s* catalizan la hidrólisis específicamente en la posición *sn*-2, indicando que son verdaderas enzimas *PLA₂* y no *PLA₁* [36, 37]. Una especificidad *sn*- similar se observó para las *sPLA₂s* purificadas de semillas de olmo y arroz [31, 32]. Además, se ha visto que las *sPLA₂* de *Arabidopsis*, tienen preferencia notable hacia sustratos con diferente cabeza polar, mientras que variando el largo de las cadenas de los fosfolípidos las diferencias no fueron tan notorias. Se observó que para un mismo lípido, la actividad disminuye cuando aumenta el largo de la cadena (más de 10 átomos de carbono), aunque se observó que cuando las cadenas son de 5-7 átomos de carbono de largo, la actividad también es reducida [73].

Los fosfolípidos en *Arabidopsis* contienen ácidos grasos insaturados con 16 (en la posición *sn*-1) y 18 (en la posición *sn*-2) átomos de carbono. Sin embargo se vio que *AtsPLA₂-α* desarrolla su mayor actividad frente a fosfolípidos con ácidos grasos de 10 átomos de carbono de largo [73] y prefiere sustratos que tengan alta cantidad de insaturaciones en la posición *sn*-2. Cabe resaltar que las *sPLA₂s* de mamíferos tienen generalmente mayor actividad frente a sustratos aniónicos [75].

Tabla 1.6 Preferencia por sustrato de las diferentes sPLA₂s.

Procedencia	Nombre	Especificidad Sn-	Preferencia por Acilo	Selectividad por cabeza polar	Ref.
<i>Arabidopsis</i>	<i>AtsPLA₂-β</i>	<i>Sn-2</i>	Palmitico>linoleico	PE (baja)	[20]
	<i>AtsPLA₂-γ</i>	<i>Sn-2</i>	Linoleico >palmitico-oleico	PE (fuerte)	[20, 37]
	<i>AtsPLA₂-δ</i>	-	Palmitico- oleico>linoleico	PE (fuerte)	[20]
	<i>AtsPLA₂-α</i>	-	linoleico	PC>PE (baja)>PG>PI	[20]
olmo	sPLA ₂	<i>Sn-2</i>	Oleico (C8-C12)	-	[20, 31]
arroz	rPLA ₂ -II	<i>Sn-2</i>	-	-	[20]
tabaco	Nt1sPLA ₂	<i>Sn-1/Sn-2</i>	-	PC	[46]
	Nt2sPLA ₂	<i>Sn-2</i>	-	-	[46]
tomate	LesPLA ₂	-	-	-	
	sPLA ₂	-	-	-	
	sPLA ₂	-	-	-	
trigo	TdsPLA ₂ III	<i>Sn-2</i>	Palmitico	PC	[43]

En la **Tabla 1.6** se resume la preferencia de las diferentes sPLA₂s de plantas conocidas hasta el momento por sustratos con diferente grupo de cabeza polar y largo de cadena. La preferencia por cabeza polar, se piensa que puede deberse a diferencias en la habilidad de las sPLA₂s de unirse a la interfaz de una vesícula de fosfolípido en particular.

A pesar que no han mostrado una alta actividad frente a sustratos aniónicos, se observó que la presencia de éstos aumenta la velocidad de la reacción de hidrólisis de fosfolípidos zwitteriónicos, aunque la activación es menor a la que se observa para la PLA₂ pancreática, la cual es pronunciada [76].

Se ha reportado que algunas sPLA₂s de plantas exhiben preferencia por determinados grupos acilos en la posición *sn-2* del fosfolípido empleado como sustrato, a diferencia de su contraparte en animales. La sPLA₂ purificada de semillas de olmo prefiere cadenas de ácido oleico comparado con las cadenas de ácido palmítico [31]. En el caso de *AtsPLA₂-α*, hidroliza más rápido cadenas de ácido linoléico que palmítico, mientras que *AtsPLA₂-β* mostró una preferencia opuesta [36]. En contraste, *AtsPLA₂-γ* [37] y *-δ* no exhibieron una preferencia por grupo acilo significativo, al igual que lo que se observa en sPLA₂s de animales [77]. Por otra parte, se vio que el grupo acilo en la posición *sn-1* puede influir en la preferencia por grupo acilo en la posición *sn-2*. En tal sentido, se observó que *AtsPLA₂-α* exhibió una preferencia *sn-2* por ácido linoléico> palmítico>oleico cuando en la posición *sn-1* había un ácido palmítico, pero no existe tal preferencia cuando el ácido oleico está en la posición *sn-1*[73].

1.2.7 El mecanismo de acción de fosfolipasa A₂

1.2.7.1 El mecanismo de catálisis interfacial de las PLA₂

En el dominio del sitio catalítico de las sPLA₂s, se encuentra presente el residuo His (His48 en la PLA₂ pancreática) el cual es asistido por un residuo Asp (Asp99 en PLA₂ pancreática) en la polarización y activación de una molécula de agua ligada, en un modo dependiente de Ca²⁺ [24, 78], seguido por el ataque nucleofílico sobre el enlace *sn*-2 como se muestra en la **Figura 1.5**. Se dice que la tríada catalítica consiste entonces en la His48, el Asp49 y una molécula de agua. La hidrólisis procede a través de la activación y orientación de la molécula de agua por puente hidrógeno al sitio activo His, lo cual determina la dependencia de pH entre 7 y 9 para todas las PLA₂ con His catalítica. Esta molécula de agua ligada es la responsable del ataque nucleofílico que posteriormente ocurre sobre el grupo éster del carbonilo [2] y la reacción hidrolítica es promovida [79]. El residuo Asp, adyacente a la His, junto con los átomos de oxígeno de la cadena carbonílica principal del bucle de unión a Ca²⁺ actúan como ligando para Ca²⁺. El Ca²⁺ es un cofactor esencial para la unión del sustrato al sitio activo vía el Asp49. Unido al sitio de unión a Ca²⁺, forma un oxianión cargado positivamente que asiste polarizando el enlace escindible y estabilizando la carga negativa del estado de transición que se forma durante la hidrólisis del fosfolípido [65]. Este es el origen de la dependencia milimolar de Ca²⁺ de estas PLA₂ [2].

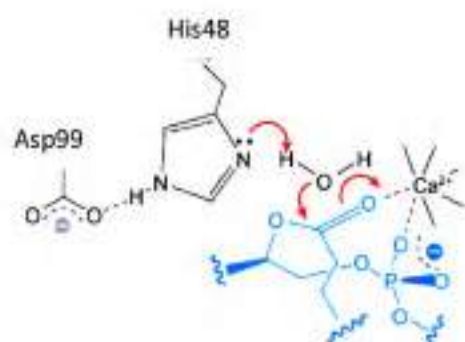


Figura 1.5 Hidrólisis de fosfolípidos por acción de sPLA₂

Recientemente se observó que una segunda molécula de agua une el agua catalítica que coordina al Ca²⁺ al sitio activo His, la cual se infiere que está involucrada en la catálisis, en el mecanismo de oxianión que coordina Ca²⁺ en sPLA₂ [80-83].

Si bien este mecanismo de reacción corresponde a una PLA₂ animal, se sabe que las plantas comparten un 15% de la secuencia de aminoácidos con las animales, excepto

en el bucle que une Ca^{2+} y el sitio activo, donde se observa un 55% de identidad, por lo que el mecanismo de catálisis podría pensarse que es básicamente el mismo.

1.2.7.2 El rol de la interfaz

Una de las mayores diferencias entre las PLA_2 de las diferentes fuentes se encuentra en la cinética de acción sobre sustratos organizados en interfaces agua/aire, lo cual resulta lógico dada la diversidad de ambientes naturales en los que estas enzimas actúan. Una observación realizada en los 70's por De Hass y colaboradores [84] fue que al emplear sustratos sintéticos solubles en agua, como sustrato de las PLA_2 s, la enzima era capaz de hidrolizar fosfolípidos apreciablemente sólo cuando se encontraban en concentraciones significativamente por encima de la CMC del lípido, es decir, la catálisis sobre sustratos monoméricos era muy baja o nula. Además, se demostró que la actividad aumenta cuando actúa sobre interfaces, dependiendo de la estructura, la organización y la dinámica del sustrato.

Durante años, muchas explicaciones se han formulado para tratar de entender el requerimiento de las sPLA_2 s de sustratos en forma de agregados y la importancia de la interfaz, incluyendo:

- i) Alteración del estado físico, como puede ser conformación, hidratación, u orientación del sustrato lipídico que pasa de monómero a formar micelas.
- ii) Un cambio conformacional y activación de la enzima como resultado de la unión al fosfolípido, si el mismo es monomérico o interfacial.
- iii) La activación de la enzima, resultado de la asociación con la interfaz agua/lípido como puede ser la penetración del corazón hidrofóbico de la micela.
- iv) Un efecto de concentración, donde la enzima experimenta una concentración local mayor del sustrato como resultado de la agregación del sustrato, causando que la enzima se encuentre cercana a la interfaz por: a) la unión inicial al fosfolípido interfacial que tiene a la enzima cerca del sustrato concentrado el cual luego se une en su sitio activo en un paso subsiguiente, b) una unión inicial a la interfaz, seguido de una asociación catalítica productiva con el sustrato concentrado.

Es por ello que el aspecto crítico en la comprensión de la acción de las sPLA_2 s es el rol de la interfaz lípido-agua. Para entender la catálisis interfacial, es necesario apreciar la organización y la dinámica del agregado lipídico.

Las propiedades de las dispersiones acuosas de lípidos se entienden mejor en términos de su carácter anfifílico. Estas dispersiones exhiben polimorfismos que están determinados por el tamaño relativo efectivo del grupo de la cabeza polar y las cadenas hidrocarbonadas apolares. El tamaño, la forma y la morfología del agregado y la dinámica del anfífilo dependen no sólo de la concentración, composición, y estructura de los anfífilos, sino también de factores ambientales como la temperatura, pH y fuerza iónica [85]. No obstante, cabe resaltar que la actividad de la PLA₂ es generalmente mayor en presencia de detergente el cual forma micelas mixtas con el lípido sustrato.

1.2.7.3 Hidrólisis de agregados fosfolipídicos por PLA₂: Paradigma cinético

La gran mayoría de las enzimas lipolíticas son proteínas solubles que actúan sobre sustratos insolubles (membrana, liposomas o micelas). A pesar de que las PLA₂ son solubles en agua, han evolucionado para llevar a cabo la hidrólisis de sustratos organizados en la interfase, porque en las dispersiones acuosas, los fosfolípidos se organizan espontáneamente formando agregados. La magnitud del efecto hidrofóbico es tan grande, que la concentración de fosfolípidos monoméricos, en la fase acuosa es muy baja (<100 pM). A pesar que las PLA₂ obedecen al formalismo de Michaelis-Menten, su comportamiento cinético difiere de la cinética clásica de una enzima soluble que actúa sobre sustratos monoméricos diluidos en solución homogénea.

En la catálisis interfacial es importante considerar qué "ve" la enzima cuando se encuentra bajo determinadas condiciones experimentales, en lugar de sólo considerar todo el fosfolípido que está masivamente presente en la mezcla de reacción. El siguiente esquema (**Figura 1.6**), planteado por Jain y Gelb (1991) [86], representa adecuadamente la catálisis interfacial que involucra a la enzima PLA₂, la cual se postuló que actúa en dos etapas.

En una primera etapa de adsorción (o unión interfacial a la superficie), la enzima en la fase acuosa (E) se une a la interfaz del sustrato agregado, y posteriormente la enzima en la interfaz (E*) se une a la molécula de sustrato para formar el complejo E*S y llevar a cabo el ciclo catalítico (turnover) en dicha interfaz dando lugar a los productos de acuerdo con el clásico formalismo de Michaelis-Menten [1]. Esto es coherente con la descripción mencionada anteriormente donde se postula que la unión de la enzima a la interfaz y la unión del sustrato fosfolipídico al sitio activo de la enzima (E*) para producir el complejo enzima-sustrato (E*S) constituyen etapas diferentes [86].

La especificidad por sustrato puede resultar de estas dos etapas. Esto quiere decir, que primero la sPLA₂ debe unirse a la interfaz y ese paso de unión interfacial tiene efectos profundos en la catálisis. A menos que la sPLA₂ pueda unirse efectivamente a la superficie del fosfolípido no podrá acceder al sustrato y ejercer su actividad.

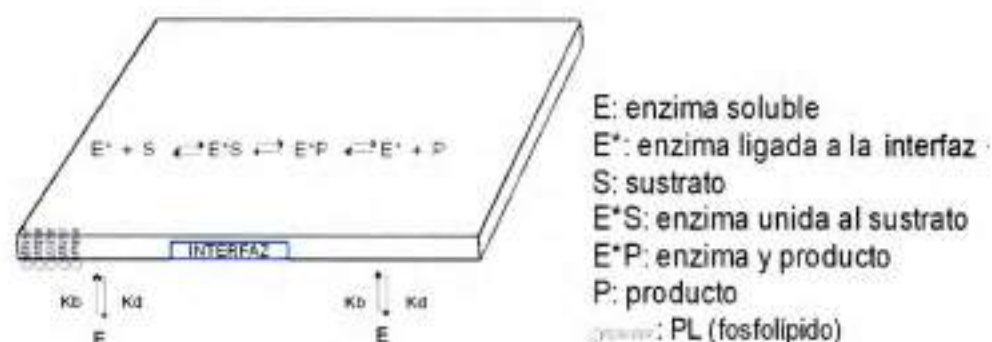


Figura 1.6 Representación de catálisis interfacial por PLA₂

Se ha observado que el rol del Ca²⁺ es fundamental para la catálisis de algunas PLA₂s [24], por lo que se lo considera un cofactor esencial [87] en la reacción de hidrólisis de fosfolípidos. Resultados reportados por Jain y col. [86], demuestran que el Ca²⁺ no es requerido para la unión de PLA₂ a la interfaz (E → E*), es un cofactor obligatorio (aunque algunos autores consideran que probablemente tampoco sea indispensable) para la unión de la molécula de sustrato al sitio catalítico de la enzima en la interfaz (E* + S → E*S) y para el paso químico en el ciclo catalítico. La etapa catalítica y la etapa de unión a la interfaz serían entonces, cinética y funcionalmente diferentes. La preferencia por una u otra interfaz por parte de las sPLA₂s está asociada con la interacción a través de un sitio "i-face," que es diferente al sitio catalítico.

Por todo lo mencionado anteriormente, la concentración de sustrato es importante por dos motivos: i) la concentración en solución (bulk) de enzima, expresada en unidades de moles/litro, controla la fracción de enzima en la interfaz, y por otro lado, ii) la fracción molar de sustrato en la interfaz determina la probabilidad de encuentro del sustrato con la enzima en la interfaz, es decir, es la concentración de enzima unida, la efectiva, para formar el complejo de Michaelis-Menten. Por ello, la velocidad de hidrólisis efectiva es determinada no sólo por el número de moléculas de sustrato en la interfaz relacionado a la fracción molar de sustrato, sino también por el equilibrio $E \rightarrow E^*$ que depende de la concentración en solución (bulk) de enzima.

Por otra parte, el sitio activo de la sPLA₂ es funcionalmente y topológicamente diferente al sitio de reconocimiento interfacial (SRI o “*i-face*”) a través del cual la enzima se une al sustrato en la interfaz. La catálisis es mediada por la His localizada en la cavidad que es accesible desde la “*i-face*”. Por lo tanto, la actividad y la unión de la sPLA₂ a través de la “*i-face*” al sustrato interfacial son reguladas por la concentración de enzima y sustrato, las cargas y la hidratación característica determinadas por la composición, organización y dinámica de la interfaz donde actúa. Estas características están moduladas por el sustrato, la presión lateral y las propiedades de separación de fase y por factores físicos como la temperatura, pH y la naturaleza y concentración de iones.

Los lípidos de membrana pueden existir como gel rígido, donde están muy juntos, empaquetados, con poco movimiento posible; o bien en un estado de líquido cristalino donde las moléculas en la bicapa están más apartadas, lo que permite una mayor dinámica. La hidrólisis de fosfolípidos, conteniendo ácidos grasos saturados o insaturados, catalizada por PLA₂ está favorecida a temperaturas próximas a la de transición. Por debajo o por encima de esa temperatura, la actividad de la enzima se reduce considerablemente. La coexistencia de regiones ordenadas y desordenadas de fosfolípidos que ocurre a la temperatura de transición puede ser la responsable en la optimización del grado de hidrólisis. Las irregularidades en el empaquetamiento de la bicapa lipídica a esta temperatura puede favorecer la inserción de la enzima en la bicapa [88].

En investigaciones realizadas utilizando micelas y monocapas, las contribuciones cinéticas y de equilibrio a la etapa $E \rightarrow E^*$ no son claramente discernibles. También en el caso de bicapas fosfolipídicas, muchas de las anomalías observadas en la cinética de PLA₂ se debe a una significativa y variable contribución de la etapa $E \rightarrow E^*$ al estado estacionario del ciclo enzimático. Así, un período de latencia (*lag time*) se visualiza en la curva que representa el progreso de la reacción de catálisis llevada a cabo por PLA₂ de páncreas porcino sobre vesículas de PC, hecho que se explica sobre la base de la baja afinidad hacia vesículas de fosfolípidos zwitteriónicos [89]. Sin embargo, se une estrechamente a vesículas aniónicas donde lleva a cabo la hidrólisis en la interfaz a una velocidad relativamente mayor con respecto a vesículas neutras.

1.2.7.4 Activación interfacial de PLA₂

Los fosfolípidos generalmente se presentan en las células bajo la forma física de membranas. Se ha demostrado que las enzimas lipolíticas del tipo sPLA₂ son

considerablemente más activas a nivel interfacial (sustrato agregado) que en solución (sustrato soluble) y también que el comportamiento catalítico global de estas enzimas es modulado por la organización y dinámica de las interfaces [26, 90].

Esta activación interfacial configura un complejo fenómeno biofísico en el que la etapa de unión a la superficie fosfolipídica regula la concentración de enzima activa. En el caso de PLA₂ actuando sobre fosfolípidos de cadena corta (C6-C8) se observa que cuando el sustrato está presente en estado monomérico ($[S] < CMC$) la actividad de la enzima es muy reducida, mientras que cuando $[S] > CMC$, se produce un drástico incremento en la actividad PLA₂ [91]. Esta activación interfacial indica que la superficie lípido-agua de los agregados constituye un mejor sustrato que la solución molecular (monómeros). El aumento en la concentración de monómeros hasta alcanzar la CMC, conduce a un cambio cualitativo desde el punto de vista fisicoquímico: la formación de agregados.

Varias hipótesis se plantearon inicialmente para tratar de explicar el brusco incremento de la actividad que ocurre cuando una enzima lipolítica se asocia a interfaces. Algunas hipótesis se focalizaron en el sustrato mientras que otras consideraron principalmente a la enzima:

- i) Elevada concentración local de moléculas de sustrato.
- ii) Disminución de la energía de activación dada por el estado de agregación del sustrato.
- iii) El estado de hidratación del sustrato
- iv) Área por molécula de sustrato o presión de superficie (energía libre de la superficie)
- v) Orientación y cambio conformacional de la enzima a nivel de la interfase.

En cualquier caso la calidad de la interfaz actuaría como un potente regulador de la actividad catalítica porque las enzimas lipolíticas se asocian a interfaces mediante un dominio específico [91] como se mencionó anteriormente.

En estudios realizados por Kilby y col. (1995) [92] se sugirió que cambios conformacionales a nivel del sitio activo de PLA₂s, concretamente en la hélice N-terminal y en una región rica en residuos Lys se relacionarían con la activación de la enzima en presencia de sustratos agregados. Mediante resonancia magnética nuclear (NMR) se reveló que ocurren cambios conformacionales en la molécula de PLA₂ durante la activación interfacial [93]. También se indicó que la ocupación del sitio de unión de la

enzima por ácidos grasos de cadena larga, estimula la actividad catalítica de PLA₂ debido a cambios en la conformación de la proteína y no por cumplir un rol de “ancla” hidrofóbico en la interacción con la superficie lipídica [94]. De todos modos, la activación de la enzima por asociación a agregados fosfolipídicos es un fenómeno aún no completamente clarificado.

Se han estudiado los efectos de los aniones en el progreso de la reacción de hidrólisis. Se observó que a concentraciones menores a 0,1 M y en esta secuencia de efectividad: sulfato > cloruro > tiocianato, los aniones en la fase acuosa se unen a la enzima y estos compiten con la interfaz aniónica para unir la enzima.

1.2.7.5 Teoría del canal hidrofóbico y la superficie de reconocimiento interfacial

Se sabe que el sustrato debe penetrar 15 Å desde su posición en la interfaz para unirse al sitio catalítico de la sPLA₂ unida a la interfaz (ver esquema en **Figura 1.7**) La especificidad aparente por sustrato de la sPLA₂ es una combinación de la interfaz/superficie de reconocimiento y especificidad por el sitio catalítico. Operacionalmente, dos características estructurales de PLA₂ son de interés funcional: el sitio catalítico y la microsuperficie de reconocimiento interfacial (SRI). Todas las sPLA₂s poseen la misma arquitectura a nivel del sitio catalítico (His-Asp) pero difieren en los residuos de aminoácidos que conforman la SRI [26]. Scott y col. [65], de acuerdo con la teoría del canal hidrofóbico, postularon que la molécula de fosfolípido que sufre la reacción de hidrólisis abandona previamente el agregado y alcanza el sitio catalítico por difusión facilitada a través de un canal hidrofóbico cuya apertura se encuentra en la SRI. Sólo sustratos que siguen dicha ruta de acceso quedan adecuadamente posicionados para la catálisis (**Figura 1.7**). La SRI consiste en un anillo de cadenas laterales positivamente cargadas rodeando un canal hidrofóbico que conduce a un sitio activo localizado centralmente [65]. La asociación a la interfaz mediante la SRI parece involucrar interacciones coulombicas y puente hidrógeno, acopladas con efectos hidrofóbicos que permitirían alejar una gran área superficial plana, de la fase acuosa [26].

Este modo de acceso es requerido para la acción enzimática óptima y puede ocurrir sólo a nivel de la interfaz. Los fosfolípidos en estado monomérico (no existe interfaz en ese caso) carecen de la posibilidad de utilizar la vía descrita para alcanzar la superficie catalítica. Dado que la adsorción de la enzima a la interfaz de sustrato puede ser distinguida cinéticamente de la unión de una molécula de fosfolípido al sitio catalítico, es posible analizar las cualidades de una interfaz en forma separada del proceso de

selección de sustrato y la química de la catálisis. En este sentido, se sabe que una superficie discreta de la proteína está involucrada en el proceso de adsorción interfacial. De Hass y col. [95] mediante la realización de mutaciones y modificaciones químicas en PLA₂ de páncreas bovino, sugirieron que el dominio de unión interfacial es una porción de la superficie de la proteína cuyo centro se ubica en la apertura del canal hidrofóbico. Dicha superficie consiste en un anillo de cadenas laterales positivamente cargadas rodeando al canal hidrofóbico que contiene en el centro al sitio activo His [65]. La unión, la permanencia y la orientación de las PLA₂s a nivel de la interfaz lípido-agua estaría gobernada por fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas que operan en dicha superficie [69].

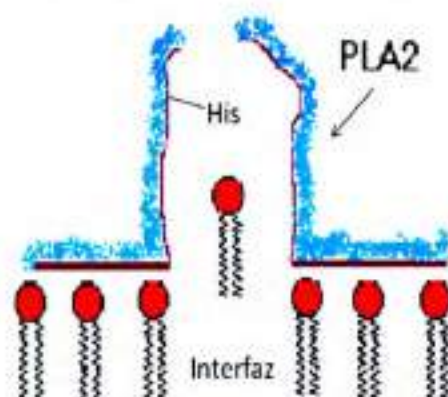


Figura 1.7 Representación esquemática del canal hidrofóbico que ilustra la interacción productiva entre una molécula de PLA₂ y un fosfolípido que forma parte del agregado.

En ese sentido, se reportaron estudios de rayos X de la estructura cristalina de PLA₂ *Naja naja naja* a los efectos de clarificar la unión de la enzima a un fosfolípido componente de una interfaz. Aparentemente, sólo 9-10 carbonos de la cadena *sn*-2 interactúan con la enzima, mientras que el resto de la cadena presumiblemente permanece inserta en la interfaz [24].

1.2.7.6 Dos modos de catálisis interfacial extremos de PLA₂: Saltatorio vs. Adherido

Se sabe que la forma soluble de la PLA₂ sufre un brusco incremento de la actividad en presencia de interfases lipídicas, fenómeno que se denomina activación interfacial [65, 91]. Primeramente, la enzima se adsorbe a la superficie lipídica y luego tiene lugar la etapa catalítica desarrollando dos modos característicos de acción: adherido (o *scooting*) [86] o saltatorio (o *hopping*) [96]. La enzima actuará de uno u otro modo dependiendo del tipo de PLA₂ (pancreática, de venenos, etc.), de las características del fosfolípido empleado como sustrato, del estado físicoquímico del mismo (algunas PLA₂s

se adsorben preferentemente a PL en estado gel y otras a sustratos en estado líquido cristalino) y de las condiciones experimentales.

En el modo adherido (o scooting), PLA_2 actúa adsorbida (**Figura 1.8**) a la superficie de los agregados desarrollando numerosos ciclos catalíticos sin abandonar la superficie (reacción procesiva) [96] hasta que todo el sustrato en la capa externa de la vesícula que contiene la enzima es hidrolizado. Debido a que PLA_2 no se desorbe del agregado, sólo serán hidrolizados fosfolípidos ubicados en la monocapa externa de la vesícula.

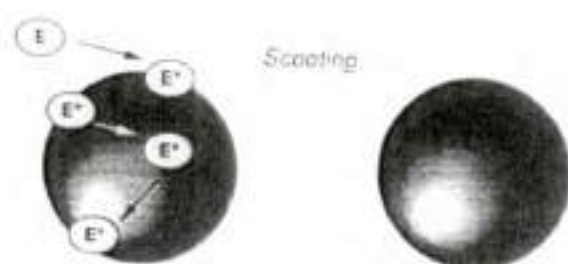


Figura 1.8 Representación de catálisis interfacial en modo adherido o scooting

Este modo de catálisis adherido, se sabe que ocurre cuando las PLA_2 tienen gran afinidad por agregados constituidos por fosfolípidos aniónicos, como es el caso de la PLA_2 pancreática. Sin embargo, si se aumenta la fuerza iónica, los iones positivos se aproximarán a la superficie negativa interrumpiendo la interacción entre la enzima y el sustrato. Por esta razón las enzimas no podrán actuar de este modo.

En el modo adherido, la enzima permanecería asociada a la superficie del agregado y la hidrólisis llegaría a un valor máximo cuyo límite estaría dado por la proporción de fosfolípido en la monocapa externa de la vesícula. Sin embargo esto sería viable si existiera una cantidad de moléculas de PLA_2 equivalente al número de vesículas. PLA_2 sólo tiene acceso a la monocapa externa y su adsorción es cuasi irreversible, por lo que sólo hidroliza sustrato en dicha monocapa. La ventaja de estudiar la catálisis en este modo, reside en que la etapa de asociación a la superficie no está incluida en el estado estacionario del ciclo catalítico dentro de la interfase. Por lo tanto, la velocidad global de la reacción de hidrólisis no estará influenciada por la adsorción y la desorción de PLA_2 entre los ciclos catalíticos.

En el denominado modo saltatorio (o hopping), PLA_2 se desplaza de una vesícula hacia otra durante el ciclo catalítico. De esta forma la enzima puede hidrolizar todo el sustrato

disponible [96]. Al incrementar la fuerza iónica o disminuir el pH, de manera de que prevalezca la especie no disociada del ácido, o bien conociendo la temperatura de transición del sustrato para desfavorecer la adsorción de la PLA₂ a la superficie de la interfaz, se estará promoviendo este modo de actuar [1]. La **figura 1.9** ilustra esquemáticamente la catálisis interfacial en el modo saltatorio. En el caso de fosfolípidos zwitteriónicos, prevalece la actividad de la enzima sPLA₂ en el modo hopping o saltatorio"

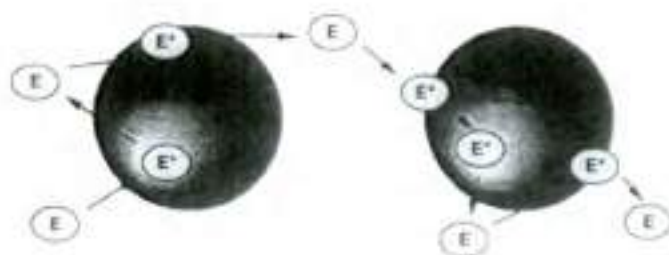


Figura 1.9 Representación de catálisis interfacial en modo saltatorio o hopping

En este caso, la velocidad global del ciclo catalítico incluye las velocidades del proceso de desorción y adsorción, complicando el análisis.

Estos distintos modos de acción de PLA₂ se ven reflejados en los respectivos gráficos de actividad en función del tiempo. En el caso del modo adherido, se obtendría un gráfico hiperbólico, mientras que en el modo saltatorio se produce un aumento brusco de la pendiente luego de un comienzo similar al adherido. Esta diferencia tiene que ver con la capacidad que posee PLA₂ para desplazarse de una vesícula a otra en determinadas condiciones experimentales [1].

En el modo adherido cuando la relación vesícula/enzima es >5 hay como máximo una molécula de enzima por vesícula. Si la afinidad de PLA₂ hacia la vesícula es elevada, la enzima unida no abandona el agregado aún cuando todo el sustrato en la monocapa externa es hidrolizado. Entonces, el exceso de agregados no es hidrolizado por la enzima presente a menos que las vesículas puedan fusionarse o que la enzima sea forzada a un intercambio intervesicular.

Por otro lado, durante la catálisis en el modo saltatorio, la enzima se desorbe de la superficie del agregado y así todas las vesículas son hidrolizadas completamente aún si la relación vesícula/enzima es $\gg 1$.

En principio si la relación vesícula/enzima es muy grande, la enzima no se desplaza hacia otras vesículas. No obstante, modificando ciertas condiciones experimentales en función de las características del fosfolípido usado como sustrato y/o el tipo de PLA₂ (pancreática, bovina, de veneno, de planta, etc), es posible favorecer uno u otro modo de acción de PLA₂ [69]. En general, todo aquello que favorezca la adsorción de la enzima a la superficie del agregado llevará a una acción en el modo adherido.

1.3 Auxinas

1.3.1 Definición

El término "auxina" deriva de la palabra griega "auxein" que significa "crecer". Es por ello que los compuestos se consideran generalmente auxinas si pueden ser caracterizados por su capacidad para inducir la elongación celular en tallos o se asemejan al ácido indolacético (la primera auxina aislada) en la actividad fisiológica. Las auxinas suelen afectar otros procesos, pero esta característica se considera crítica para todas las auxinas y "ayuda" a definir la hormona.

La denominación genérica "auxina" abarca a un conjunto de hormonas que se encuentran en plantas y que se asemejan estructural o funcionalmente al triptófano. Dentro de esta familia de fitohormonas, uno de los principales grupos es el de la clase de compuestos basados en el anillo indol, hidrófobo, enlazado a la cadena de hidrocarburo de un ácido acético (IAA) o ácido propiónico (IPA), respectivamente (**Figura 1.10**).

El ácido indolacético (IAA) fue la primera auxina natural identificada y hoy es considerada la principal hormona en plantas.

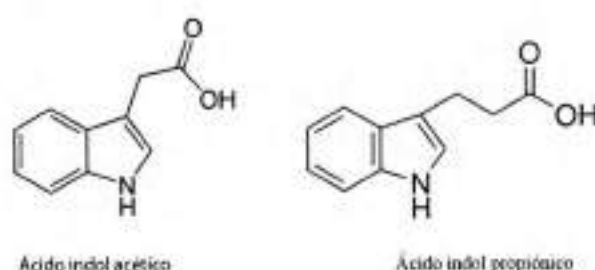


Figura 1.10 Fitohormonas de la familia de las auxinas

1.3.2 Importancia Biológica

Las auxinas son fitohormonas vegetales producidas por las plantas para acelerar, inhibir o modificar su crecimiento en respuesta a la gravedad o los estímulos luminosos. En las plantas, el crecimiento se controla durante la división celular, la elongación celular y la diferenciación celular, y estas hormonas pueden afectar a cualquiera o a todos estos

procesos [97], ya que tienen influencia en el control de las respuestas de crecimiento y desarrollo en plantas. Desde un punto de vista de toda la planta, la auxina juega un papel esencial en los procesos tales como la dominancia apical, la formación de raíces laterales/adventicia, tropismos⁴, desarrollo, diferenciación vascular, embriogénesis [98], gametogénesis, crecimiento de las plántulas, patrón vascular y desarrollo de las flores [61, 99].

El ácido indol-3-acético (IAA), es la auxina más abundante y potente de origen natural activa en las plantas superiores [100], controla una variedad de procesos de desarrollo y tiene profundos efectos en el crecimiento de plantas [101]. Ejerce el control de muchos procesos de desarrollo importantes en plantas, incluyendo la división celular y la expansión celular, la diferenciación del tejido vascular, iniciación de las raíces, la dominancia apical, las respuestas gravitropica y fototropicas, la floración, la maduración del fruto, senescencia foliar, y caída de hojas y frutos [102-104]. Se sabe que las aplicaciones de IAA o auxinas sintéticas a las plantas causan cambios profundos en crecimiento de la planta y el desarrollo [105].

1.3.3 Antecedentes de estimulación de la actividad PLA₂ por auxinas

Como se comentó anteriormente, las PLA₂s hidrolizan glicerofosfolípidos en la posición *sn*-2 con la consecuente liberación de ácidos grasos libres y lisofosfolípidos. La velocidad de hidrólisis depende de propiedades fisicoquímicas de la membrana tales como: curvatura de la membrana, composición de lípidos, alto grado de empaquetamiento, longitud de la cadena de lípidos, y carga presente en el grupo de la cabeza polar. Además, como se mencionó más arriba, las sPLA₂s desempeñan un rol importante en la transducción de señales ya que regulan proteínas y procesos celulares [4, 106], y probablemente, están implicados en la señalización de fosfolípidos, ya que hay datos reportados en otros organismos [107, 108].

Un rápido aumento en la actividad de PLA₂ se verificó por primera vez al tratar microsomas aislados y cultivos celulares con auxinas [107-113] y, luego, el trabajo fue continuado con microsomas aislados de segmentos de hipocotilos [26]. Además, se reportó que la adición de ácido indol-acético; ácido 2,4-diclorofenoxiacético o ácido α -naftil-acético a células cultivadas de soja (*Glycine max*) incrementaron la actividad PLA₂ [42]. También se estimuló la conversión de fosfolípidos a lisofosfolípidos "in vivo" e "in

⁴ Un tropismo es la tendencia de una planta para crecer hacia o lejos de algo, y los dos estímulos principales que la causan en las plantas son luz y gravedad (geotropismo).

vitro" en membranas aisladas de calabacín (*Cucurbita pepo*) [106]. Se sabe que PLA₂ es un mediador en el crecimiento de elongación de plantas inducido por auxinas [114].

La concentración de auxina fisiológica es entre 20 nM y 1 μM y la activación se observó dentro de 1 min después de la aplicación de la auxina [107, 115] o 5 min [115] dependiendo del método de aplicación. Se observó que los ácidos grasos liberados y lípoderivados son potenciales segundos mensajeros en la acción de auxinas. Además, mientras que bajas concentraciones de IAA estimulan el crecimiento y desarrollo de la planta [104], las altas concentraciones pueden ser tóxicas para la planta [116]. Por lo tanto un control cuidadoso de la concentración de IAA es importante para el desarrollo apropiado de la planta.

Se sabe que en el medio biológico, las enzimas actúan frecuentemente en asociación hidrofóbica y/o electrostática a las membranas [117]. Cerca de la mitad de la proteína en las células está asociada a membranas y, específicamente, en el caso de las fosfolipasas, actúan frecuentemente asociadas a membranas biológicas [26]. La interacción con ligandos puede verse afectada por cambios conformacionales en la molécula de proteína, como una consecuencia de la inmovilización [98]. Un concepto común en la teoría regulatoria del crecimiento en plantas, es la interacción proteína-auxina y en este sentido se ha propuesto que el mecanismo de acción de las auxinas implica una asociación a proteínas [100]. Además, se ha estudiado una PLA₂ activada por auxina y los resultados mostraron que la presencia de una glicoproteína unida a la membrana participaría en la activación. Sin embargo, ningún mecanismo por el cual las auxinas producen activación sPLA₂ se ha establecido firmemente hasta hoy.

Al presentar estas fitohormonas un comportamiento hidrofóbico, pueden penetrar en monocapas llevando a cabo cambios en las propiedades de la misma, ya que se unen al hidrocarburo y regiones del grupo presente en la cabeza de los fosfolípidos. Hay antecedentes que muestran que IAA penetra en la monocapa de DPPC causando su expansión [118].

1.3.4 Receptores de auxinas

Hay mucha literatura que reportan acerca de la existencia de receptores para auxinas. Scherer basa su teoría de auxina y PLA₂ en dos receptores. Uno denominado ABP1 (Auxin Binding Protein 1), extracelular, que ha sido sugerido como uno de los receptores de auxinas [119, 120] e intracelular, como TIR1, que se encuentra en el núcleo [121] (Figura 1.11). Sin embargo, hasta hoy, poco se sabe sobre el mecanismo y el efecto

de las auxinas en su relación con la activación sPLA₂s y una investigación más profunda es necesaria.

Parece muy posible que los metabolitos generados por sPLA₂ α , ácidos grasos libres (AGL) y / o lisofosfolípidos, ejercen efectos en las funciones relacionadas con el transporte de vesículas de membrana, que son la base para el transporte de auxinas. Por otro lado, es difícil imaginar cómo las enzimas sPLA₂s pueden ser activadas por un receptor en el lado extracitosólico de las membranas de Golgi en dictiosomas [52]. A pesar de que ABPI también se encuentra en el lado extracitosólico de ER y de la membrana plasmática, no existe un paradigma de transmisión de señal conocida para sugerir la activación post-traducciona l de una enzima extracitosólica. En resumen, mientras que no se puedan señalar receptores, la transcripción / traducción parece ser el mecanismo de activación de sPLA₂ [122].

ABPI fue una de las primeras proteínas caracterizadas que se unen a auxina y se la vio implicada como un receptor para un número de respuestas de auxina. Se propuso que ABPI actúa en la superficie celular para activar la señalización citoplasmática. Su principal actividad aparentemente se basa en influir en los acontecimientos que ocurren en la membrana plasmática. Si embargo, aún después de casi 40 años del descubrimiento de ABPI, su función molecular sigue siendo poco clara [123].

Es una proteína que reside en el RE (esta siempre dentro del lumen de las vesículas secretoras) y que es secretada (en pequeñas cantidades) a la matriz extracelular. Tras la secreción, se convierte en extracelular, donde el pH ácido permite la unión a auxina con una alta afinidad. Es por eso que el pH es un parámetro crítico para la afinidad de ABPI por las auxinas. A un pH cercano a 7.0 (como es el pH del RE) la afinidad por auxinas es muy baja, mientras que una afinidad alta se encontró a un pH de 5,5, el cual es un pH típico de la matriz extracelular (**Figura 1.11**) [123].

Por otro lado, TIR1 es un regulador de genes inducido por auxina bien conocido. Se sabe que la regulación transcripcional iniciada por TIR1 de los genes inducidos por auxinas depende de cambios en la concentración de auxina.

Las proteínas PIN situadas en membrana plasmática son importantes en la regulación de la concentración de auxina citosólica (participan del eflujo de auxinas) [122], mientras que las proteínas AUX están involucradas en el influjo de auxinas.

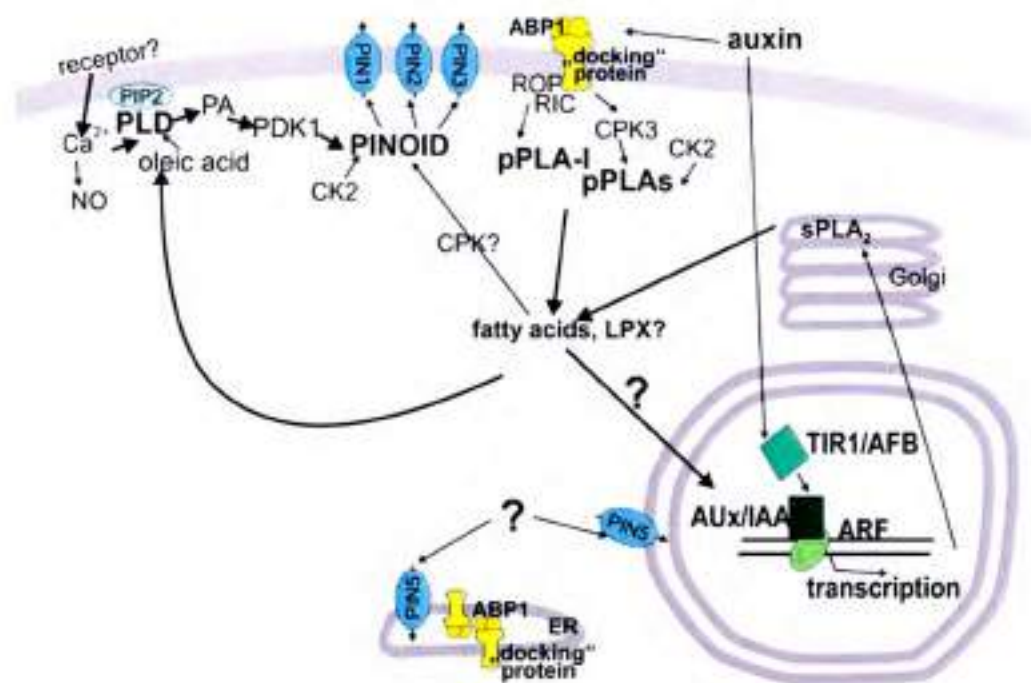


Figura 1.11 Modelo de funciones de fosfolipasas en las señales de transducción de auxinas y receptores de auxinas. TIR1 (abajo en el núcleo) y ABP1 (mitad superior, en membrana). ARF, FACTOR de RESPUESTA a AUXIN; Aux / IAA, auxina / proteínas de ácido indolacético; CDPK, proteína quinasa calcio-dependiente; CK2, caseína quinasa2; CPK3, quinasa3 dependientes de calcio; LPX, lisolípido; PA, ácido fosfatídico; PDK1, quinasa dependiente de fosfolípidos; PIN, transportador de eflujo de auxina; PINOID, proteína quinasa; PPLA, patatina-fosfolipasa A; PPLA-I, patatina relacionada fosfolipasa A-I; PLD, la fosfolipasa D; sPLA₂, fosfolipasa A₂ secretoria; Adaptado de [122].

1.4 Hipótesis

En proyectos anteriores en el grupo del Dr. Ricardo Madoery (Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC), se ha investigado la catálisis de PLA₂s de venenos en forma soluble e inmovilizada en soportes sólidos [124-127]. Recientemente, ha sido aislada, purificada parcialmente y caracterizada bioquímicamente una nueva enzima PLA₂ presente en semilla de soja (*Glycine max*) [42, 128]. La enzima desarrolló elevada actividad catalítica hacia vesículas multilaminares (VML) aniónicas de fosfolípidos de lecitina de soja. El estudio cinético con VML reveló un comportamiento michaeliano, indicando que PLA₂ soja podría actuar en modo *hopping* de catálisis interfacial [42]. Estos comportamientos interfaciales diferentes, por ejemplo con respecto a PLA₂ pancreática, podrían relacionarse con diferencias estructurales entre las SRI de sPLA₂ *Glycine max* y aquella fosfolipasa, paradigma de las sPLA₂. En ésta última, un collar catiónico que rodea el acceso al sitio activo, interactúa fuertemente con superficies lipídicas aniónicas.

Se plantea la hipótesis: “La actividad interfacial de PLA₂ de soja (*Glycine max*) está relacionada con la presencia de isoformas de PLA₂ con sitio catalítico His, y las características estructurales y catalíticas son compatibles con PLA₂s secretoras de animales y venenos”.

1.5 Objetivos

Los lisofosfolípidos, productos de reacción en la hidrólisis de fosfolípidos, son bioemulsionantes de gran interés para las industrias alimentaria y farmacéutica. La reacción catalizada por PLA₂ es la única forma de obtener *sn*-2 lisoderivados ya que la bioconversión es estereoespecífica.

Las PLA₂s de distintas fuentes difieren en la denominada *microsuperficie de reconocimiento interfacial*, la cual define las propiedades catalíticas interfaciales. El **objetivo general** en este proyecto es estudiar las propiedades de asociación interfacial de una PLA₂ de soja (*Glycine max*) de tipo secretorio (sPLA₂), a los efectos de generar un conocimiento fundamental para optimizar el potencial catalítico de esta enzima.

El **objetivo específico** es obtener información acerca de aspectos estructurales y cinéticos relacionados con las propiedades de asociación interfacial de sPLA₂ soja (*Glycine max*) que controlan el potencial catalítico de dicha sPLA₂ en la bioconversión de fosfolípidos.

En rasgos generales, a los fines de cumplir con el objetivo específico, en este trabajo de Tesis se plantearon los siguientes objetivos, a los fines de contribuir al conocimiento de las sPLA₂s presentes en *Glycine max*:

- ♪ Determinar la/s secuencia/s de la/s sPLA₂ presentes en *Glycine max* tanto nucleotídica como proteica.
- ♪ Determinar la existencia de dominios funcionales conservados entre las enzimas
- ♪ Ubicar a la/s sPLA₂/s de soja en el contexto de la superfamilia de las sPLA₂s
- ♪ Determinar las condiciones óptimas para la catálisis en la bioconversión de fosfolípidos a lisoderivados.
- ♪ Determinar la estructura 3D de sPLA₂ de *Glycine max*.
- ♪ Definir los residuos que están implicados en el reconocimiento interfacial de la sPLA₂ *Glycine max*.
- ♪ Obtener las proteínas recombinantes activas y sin aminoácidos extra en el extremo N-terminal.
- ♪ Estudiar propiedades de catálisis de las sPLA₂s de *Glycine max* utilizando sistemas micelas de membrana
- ♪ Evaluar la afinidad de sPLA₂ *Glycine max* por sustratos con diferente grupo de cabeza polar.
- ♪ Estudiar el efecto estimulador de las auxinas sobre la actividad de las GmsPLA₂s.

EXPERIMENTAL

*"Todo lugar está a distancia de ir caminando. . . .
si tienes el tiempo necesario".*

Steven Wright



CAPITULO 2. EXPERIMENTAL

2.1. Materiales: reactivos y soluciones

Dentro de los reactivos empleados se encuentran: Tritón X-100 fue adquirido a Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, EE.UU), isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG) y ampicilina de Promega (Madison, WI, EE.UU.). Ni-NTA sefarosa se adquirió a GE Healthcare, EE.UU. El ácido indol-3-acético (IAA) se adquirió a Research Organics, Inc. (Cleveland, Ohio, EE.UU.) y el indol-3-il-propiónico (IPA) se adquirió a BDH división química de laboratorio (Londres, Inglaterra). Todos los reactivos fueron de la más alta calidad para análisis. Los solventes orgánicos utilizados fueron cloroformo (CHCl₃), metanol (CH₃-OH) y etanol, todos de Merck (Argentina) de calidad HPLC. La enzima empleada como control fue PLA₂ de páncreas porcino de Sigma- Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU). Los lípidos (**Figura 2.1**) de cadena definida empleados fueron todos adquiridos de Avanti Polar-Lipids (Birmingham, AL, EE.UU).

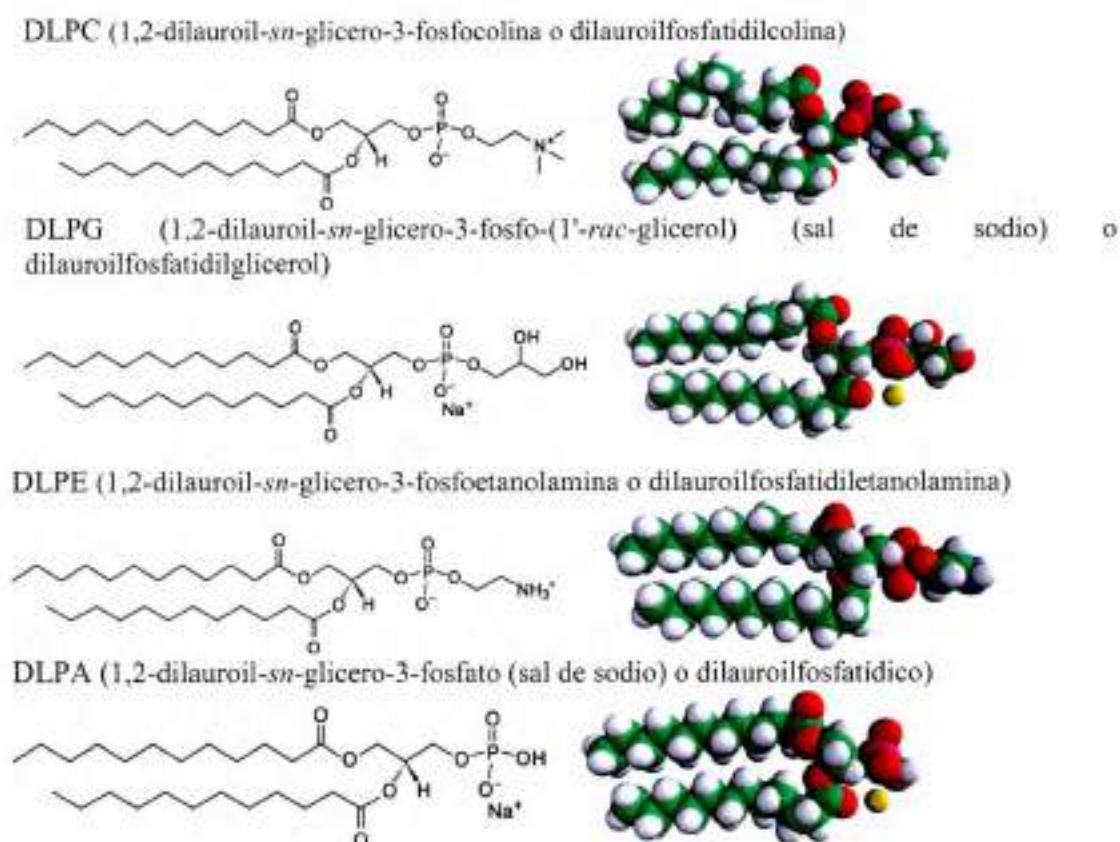


Figura 2.1 Estructuras y fórmulas de los lípidos empleados.

Todas las soluciones empleadas se realizaron con agua Mili Q (tensión superficial 72,8 mN.m⁻¹, resistividad de 18,2 MΩ).

2.2 Métodos y Fundamentación Teórica

2.2.1 Análisis Bioinformático: estudios *in silico*

2.2.1.1 Búsqueda de genes *sPLA₂* putativos en el genoma de *Glycine max*

Los métodos de búsqueda de secuencias en bases de datos se basan en el alineamiento y similitud significativa entre la secuencia problema ("*query*") y las secuencias depositadas en las bases de datos. El algoritmo más utilizado de búsqueda de secuencias es el BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), que permite la identificación de dominios y secuencias homólogas entre distintas especies. Una de las aplicaciones de BLAST más habituales es la búsqueda bioinformática (*in silico*) de genes de los que sólo se conoce la función de la proteína, utilizando como sondas genes o proteínas homólogas de otros organismos. Hay que tener en cuenta que la secuencia de aminoácidos está más conservada que la de nucleótidos, por eso se usa generalmente como sonda la secuencia de aminoácidos.

En este trabajo de Tesis, se creó una base de datos local con "*formatdb*" [129] en la cual se realizó una búsqueda TBLASTN, la cual busca secuencias de nucleótidos utilizando secuencias de proteínas como molde o templado, en la base de datos de ARNm de *Glycine max* (<http://www.plantgdb.org/GmGDB>) con el objeto de hallar los genes probables que codifican para la/las *sPLA₂*/s. Como templados se utilizaron secuencias de *sPLA₂*s reportados previamente para *Arabidopsis*, las cuales fueron descargadas de la base de datos UniProtKB (<http://www.uniprot.org/help/uniprotkb>).

2.2.1.2 Análisis de secuencias

Una vez halladas las secuencias de nucleótidos putativos de *sPLA₂*s de *Glycine max* (soja), las mismas fueron descargadas de la base de datos de *Glycine max* disponible (<http://www.plantgdb.org/GmGDB/>). Las secuencias de las proteínas para las cuales codifican los genes hallados (CDS), se identificaron deduciendo los ORFs (marco de lectura abierto) de las mismas en sus 3 marcos de lectura usando el servidor <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>. Finalmente las secuencias se sometieron a análisis funcional de proteínas utilizando *PFAM* [130] y *PROSITE* [131] para determinar la existencia de motivos conservados. Las modificaciones postraduccionales se analizaron mediante el uso de: *signalP* para la predicción de la topología [132], *ProtParam* [131]

con el objeto de determinar los puntos isoeléctricos. Las secuencias de ADN completas y la información referente a los genes (cantidad de exones, intrones, en que cromosoma se encuentra cada iso especie) fueron hallados en <http://www.phytozome.net>.

2.2.1.3 Comparación y análisis de secuencias

Para poder comparar secuencias, se debe proceder siempre primero a realizar su alineamiento, ya que se debe asegurar de que se están realizando comparaciones entre homólogos, es decir, que proceden de un ancestro común. Debe de quedar claro que **similitud** y **homología** son cosas diferentes. Similitud es parecido, y se suele medir en porcentaje (cantidad de aminoácidos "parecidos", no idénticos, ya que cuando son idénticos estamos hablando de "identidad"). El concepto de homología es evolutivo, e implica descendencia a partir de un ancestro común. La homología no se mide de forma cuantitativa, como la similitud: o se es homólogo o no se es.

Los métodos para comparar dos secuencias se pueden agrupar en dos grandes grupos:

- **Global:** comparación de dos secuencias en toda su longitud, tratando de obtener el mejor alineamiento posible. En general son aplicables a secuencias más o menos parecidas y de longitudes similares.
- **Local:** comparación de pequeños fragmentos ("palabras") de las dos secuencias en toda su longitud, tratando de obtener el mejor alineamiento posible. Son aplicables a secuencias con grados diferentes de similitud o con longitudes diferentes. La mayoría de los biólogos utilizan este tipo de métodos.

Las secuencias de las proteínas maduras fueron alineados utilizando *Clustal X* [133] mediante un alineamiento múltiple de secuencias (alineamiento de más de dos secuencias). El método de alineamiento fue global, al igual que el método empleado para analizar el grado de similitudes e identidades utilizando el software MatGAT 2,0 [134]. También se realizaron alineamientos locales por ejemplo al realizar el análisis de estas secuencias usando el servidor en línea *SequenceLOGO* [135].

2.2.1.4 Análisis filogenético

2.2.1.4.1 Secuencias empleadas para armar el árbol filogenético

Para el análisis de filogenia se emplearon las secuencias ya conocidas de sPLA₂ de plantas, las cuales fueron previamente alineadas empleando el programa *Clustal X* (versión 1.64b) [133]. Las secuencias y sus respectivos números de accesos (ID) de Genbank de proteínas son los siguientes: clavel (AF064732), maíz (EU968759), isoforma

-I (AJ238116) y -II (AJ238117) de arroz e isoformas $-\alpha$ (AY136317), $-\beta$ (AF541915), $-\gamma$ (AY148346) y $-\delta$ (AY148447) de *Arabidopsis* y tabaco (AB190177), mientras que para las isoformas de *Glycine max* son: GmsPLA₂-XIA-1 (ACU165230), GmsPLA₂-XIA-2 (ACU18951), GmsPLA₂-XIB-1 (ACU19490), GmsPLA₂-XIB-2 (ACU15282), GmsPLA₂-XIB-3 (ACU24341).

2.2.1.4.2 Programa PHYLIP

El árbol filogenético se construyó mediante análisis de parsimonia⁵ utilizando el paquete del software PHYLIP V3.63a [136]. Se empleó una PLA₂ de rata (Q9QZT3) como raíz (o grupo control; en inglés: outgroup) que es una secuencia de la que se sabe que solamente está relacionada de forma distante con las secuencias de interés a investigar. Además, permite lograr mejores resultados en el análisis ya que sólo secuencias dentro de la misma especie pero con una relación filogenética lejana puedan, si correspondiese, ser introducidas dentro del mismo grupo. La distribución de las sPLA₂s se obtuvo mediante la realización de 1000 repeticiones bootstrap.

Para exportar el documento que se genera como ".tree" al emplear el programa PHYLIP y poder observar gráficamente el árbol filogenético, se empleó el programa *Figtree v1.4.2* (Rambaut A-2013) que es una aplicación que se puede emplear en línea (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

2.2.1.5 Modelado por homología y dinámica molecular

Esta parte del trabajo de Tesis se desarrolló en colaboración con el Dr. Marcos Villareal (Departamento de Matemática y Física de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC), quien posee los conocimientos de las técnicas y los equipamientos necesarios para realizar los análisis computacionales que se mencionan en esta sección.

2.2.1.5.1 Construcción de la estructura tridimensional de GmsPLA₂-XIA-1

Se construyó un modelo inicial para la GmsPLA₂-XIA-1 empleando el servidor de I-TASSER, que combina el threading y el modelado ab initio para la predicción de la estructura [137, 138]. Este servidor ha sido clasificado como el servidor número uno, en las últimas competencias de predicción de estructura CASP [139]. El templado principal que se utilizó para el modelado de la estructura fue el reportado para la isoforma II de

⁵ El método de máxima parsimonia en la reconstrucción filogenética tiene como objetivo la búsqueda e identificación de un posible árbol filogenético que requiera el menor número de eventos evolutivos (mínimo de cambios evolutivos) para dar explicación a los procesos o fenómenos observados.

sPLA₂ de arroz (*Oryza sativa*) (AP ID: 2WG7). El templado, tiene una identidad del 40% en la secuencia y una cobertura de 0,97 (definida como el número de residuos alineados dividido la longitud de la proteína "query"). El modelo creado tiene un C-score de 1.29. El C-score evalúa la calidad del modelo, y por lo general está en un rango [140], en el que una puntuación más alta refleja un modelo de mejor calidad. En general, los modelos con un C-score > - 1,5 tienen un plegamiento correcto [137]. El C-score obtenido indica que el modelo es de alta calidad, con una desviación estimada (RMSD) de la estructura experimental de $0,18 \pm 0,15$ nm. La superposición del modelo generado con la estructura cristalina de la sPLA₂ de arroz muestra un RMSD de 0,07 nm (ver Capítulo 3, **Figura 3.6**).

2.2.1.5.2 La dinámica molecular

Los campos de fuerza que se emplearon para el modelado de la proteína fueron GROMOS56a3 [141] y AMBER99SB [142]. El modelo de agua empleado fue SPCE [143] para las simulaciones con campo de fuerza GROMOS y TIP3[144] para las simulaciones con AMBER. Los parámetros para los iones Ca²⁺ en la simulación con el campo de fuerza GROMOS fueron los propuestos por Project y col.[145] mientras que los parámetros para Ca²⁺ por defecto se utilizaron en el campo de fuerza AMBER. Las cadenas laterales de los aminoácidos fueron cargadas de acuerdo con el pKa de cada aminoácido libre en solución acuosa. Considerando un pH de 7, la carga total de la proteína fue 0. Para todos los casos se consideró la presencia de un ion Ca²⁺ y dos iones Cl⁻ para obtener un sistema eléctricamente neutro. Las interacciones electrostáticas se manejaron con la versión SPME de las sumas de Ewald [146, 147]. Los seteos para el método SPME fueron los siguientes: un espacio real de corte de 0,9 nm, un intervalo de rejilla (grid spacing) de 0,12 nm y una interpolación cúbica. En todas las simulaciones, se asumió una permitividad dieléctrica de 1 y las interacciones de van der Waals fueron separadas 1,2 nm. Las simulaciones se llevaron a cabo en el conjunto TNP utilizando el algoritmo de reescala de velocidad para el termostato [148] y el baróstato de Berendsen [149]. La proteína y el disolvente se acoplaron por separado a un baño de temperatura con una temperatura de referencia de 310K y una constante de relajación de 0.3 picosegundos. La presión se mantuvo constante mediante el acoplamiento a la presión de referencia de 1 bar con una constante de relajación de 2.0 picosegundos. Las uniones en la proteína se limitaron utilizando el algoritmo LINCS [150]; para las uniones y uniones de ángulo de las moléculas de agua se utilizó el algoritmo SETTLE [151]. El paso de tiempo para la

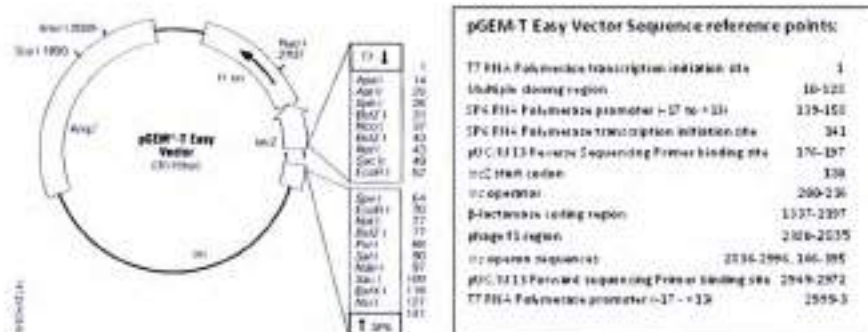
integración de la ecuación de movimiento fue 2 de femtosegundos con el campo de fuerza AMBER y 5 femtosegundos con el campo de fuerza GROMOS debido al uso de sitios virtuales (implícitos) en los átomos de hidrógeno polares de la proteína [152]. En total se realizaron siete simulaciones diferentes, con un tiempo acumulado de más de 700 nanosegundos. La lista de no unidos fue actualizada cada 20 femtosegundos. Para liberar enfrentamientos estéricos (clashes) hemos realizado 1.000 ciclos de gradiente descendente antes de la simulación. Antes de cada corrida de producción, se realizaron una serie de 4 pasos de equilibrado de 500 picosegundos cada uno, aplicando restricciones de posición a todos los átomos en la proteína. Las fuerzas de restricción fueron 1.000, 600, 200, y 75kJ/nm² en cada paso de equilibrado, respectivamente. Cada corrida, ya sea de equilibrio o de producción, se inició con un conjunto diferente de velocidades iniciales con el fin de producir diferentes trayectorias. Se analizó el contenido de estructura secundaria de la proteína utilizando el programa DSSP reportado por Kabsh y Sander [153]. El contacto entre dos átomos está definido si los mismos se encuentran separados por 0,4 nm o menos. Con esta definición, no hay moléculas de agua que puedan ser colocadas entre el par de átomos que están interaccionando. Las simulaciones y parte del análisis de las trayectorias se realizaron utilizando el paquete del software de GROMACS 4.0.7 [154, 155].

2.2.2. Construcción de las proteínas recombinantes: *GmsPLA₂-XIA-1* y *-XIB-2*

2.2.2.1 Sistema de clonado y expresión de proteínas en procariontes

La forma madura de las proteínas *GmsPLA₂-XIA-1* y *-XIB-2* se obtuvo mediante amplificación de la región del gen que codifica para la correspondiente proteína madura, sin el fragmento que corresponde al péptido señal. El gen amplificado mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) fue insertado en el vector pGEMTeasy (**Figura 2.2A**), a partir del cual luego se logró exitosamente la obtención de gran cantidad de copias en el sistema hospedador *E.coli*. Luego se procedió a la digestión del vector con las enzimas de restricción para liberar el gen y subclonarlo en el sistema de expresión PHUE el cual fue previamente digerido con las mismas enzimas de restricción (**Figura 2.2B**).

A



B

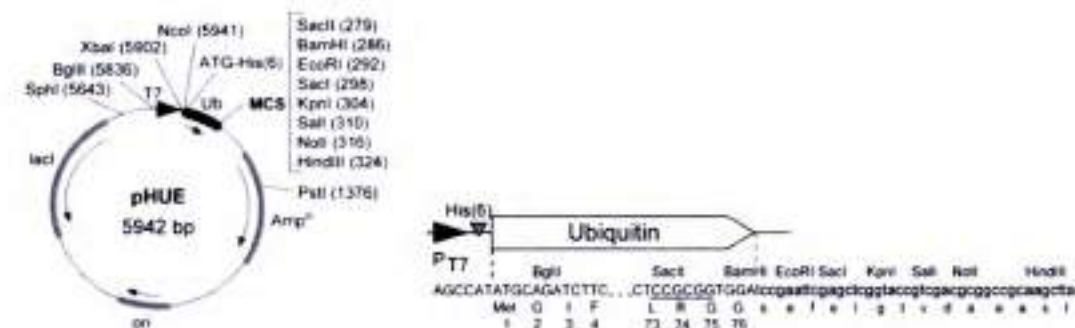


Figura 2.2 Vector de clonado pGEMTeasy y vector de expresión pHUE. **A)** Dibujo esquemático del vector pGEMTeasy. **B)** Mapa del plásmido pHUE mostrando la región codificante de ubiquitina (Ub) (caja blanca), promotor T7polimerasa (triángulo negro) y otras regiones (cajas sombreadas). Las flechas indican la dirección de la transcripción. Los sitios de las enzimas de restricción dentro del sitio de múltiple clonado (MSC) se encuentran listados y otros sitios de reconocimiento útiles en el vector también se muestran. En la parte inferior se muestra la secuencia de ADN y proteína codificada del extremo 5' y 3' de la región codificante de ubiquitina mostrando el sitio SacII diseñado (subrayado) conteniendo a los codones Leu 73, Arg 74 y Gly 75 y el polilinker 3'.

Se eligió este sistema de expresión procariota, ya que el mismo, como cualquier sistema de expresión procariota, es fácil de transformar, crece rápidamente en un medio de cultivo con requerimientos simples y tiene la ventaja de ser barato y requiere de equipamiento simple como el que se dispone en cualquier laboratorio estándar. Además, este sistema ha sido ampliamente utilizado para sobreexpresar sPLA₂s provenientes de diferentes fuentes. No obstante, las bacterias no son capaces de llevar a cabo modificaciones post-traslacionales, por lo que muchas proteínas, se producen de manera insoluble e inactiva siendo almacenadas por las células de *E.coli* como cuerpos de inclusión. Este es el caso de las sPLA₂s, las cuales no pueden ser expresadas en *E.coli* con

el plegamiento correcto debido al alto número de puentes disulfuro en su estructura. Este problema se soluciona expresando la proteína de interés fusionada a otras proteínas que aumentan su solubilidad, como es el caso de la ubiquitina (Ub) que se encuentra presente en el sistema pHUE a emplearse en este trabajo de Tesis. Este sistema permite que la proteína se exprese fusionada con colas de histidina-ubiquitina (His (6)-Ub), y se ha visto previamente que es una técnica muy buena para aumentar significativamente el rendimiento de proteínas expresadas y que son inestables [156].

2.2.2.2 PCR y obtención de plásmidos de clonado y expresión

La estrategia utilizada para producir la proteína recombinante His(6)-Ub-GmsPLA₂-XIA-1 y XIB-2, consistió en fusionar la proteína de interés con la fracción del gen que codifica para ubiquitina (Ub) la cual se encuentra subclonada en el vector de expresión pHUE construido y donado por Ann-Maree Catanzariti y col. [156]. La fusión de las proteínas de interés a Ub se puede generar utilizando el sitio SacII, que ha sido generado en el extremo 3' del fragmento de ADN de la misma. Para ello, el fragmento de DNA a ligar debe codificar para los residuos Gly75-Gly76 de Ub (**Figura 2.2B**), que son esenciales para el clivaje. Las secuencias maduras se obtuvieron mediante amplificación por PCR de los genes de interés usando cebadores diseñados como se recomienda en [156], con la extensión 5'CTC-CGC-GGT-GGT, que codifica para Leu73, Arg74, Gly75, Gly76, que contiene el sitio SacII y usando como molde o molde el ADNc de los clones donados por el Plant Genomics, J. Craig Venter Institut (JCVI) (Clon "JCVI-FlgM-10D19", Genbank BT092274, para GmsPLA₂-XIA-1 y el clon "JCVI-FlgM-7G8", GenBank BT091171 para GmsPLA₂-XIB-2). En ambos casos, la PCR se llevó a cabo utilizando 50 ng de molde y GoTaq ADN polimerasa (Promega, WI, EE.UU.). Para GmsPLA₂-XIA-1, el programa utilizado en el Termociclador fue de 33 ciclos que constan de: 10 minutos a 95°C para la desnaturalización inicial, 94°C 40s para la desnaturalización, 40s con gradiente de temperaturas de "annealing" que consta de 10 ciclos a 45°C, 8 ciclos a 48°C y 15 ciclos a 53°C, basado en el valor de la T_m de los cebadores y 60 s a 72°C para la polimerización, utilizando un cebador delantero 5' - tccCCGCGGTGGATCCGATCAGGCAAACACTGCAGCACC- 3' y un cebador inverso 5' -ttaAAGCTTAATGAGGAACGGAGTC- 3'. Para GmsPLA₂-XIB-2, el programa empleado en el termociclador fue de: 33 ciclos de 5 minutos a 95°C para la desnaturalización inicial, 94°C durante 1 min para la desnaturalización, 1 min de gradiente de temperaturas de "annealing" que consta de 10 ciclos a 48°C y 25 ciclos a

55°C, de acuerdo al valor de T_m de los cebadores y 1 min a 72°C para la polimerización, utilizando un cebador directo 5'-tccCCGCGGTGGAGCGAACATAGGAGCTGAAACC-3' que contiene una Ala en lugar de una leucina aguas abajo de la proteína Ub (**Figura 2.3B** secuencia inferior) y un cebador inverso 5'-taaAAGCTTCTATGGCTTGTGGAGAACTCTT-3'. Los productos amplificados se analizaron y se separaron empleando gel de agarosa al 1%, se escindieron y se eluyeron empleando Promega Wizard SV Gel y PCR Clean-UpSystem (Promega, WI, EE.UU). Finalmente estos fragmentos se clonaron en vector pGEM-Teasy (Promega, WI, EE.UU), y se transformaron bacterias *E.coli* XLI Blue. Los clones positivos se seleccionaron de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ADN del plásmido se purificó a partir de clones positivos con el Kit de Purificación de ADN plásmidico de The Wizard® Sistema SV 96 (Promega, WI, EE.UU.). El plásmido construido fue digerido con enzimas de restricción SacII (Promega, WI, EE.UU.) y Hind III (Promega, WI, EE.UU.), y el fragmento que codifica para la Ub-GmsPLA₂-XIA-1 y -XIB-2 fueron posteriormente purificados a partir de gel de agarosa al 1% como se mencionó anteriormente y se subclonaron en el vector de expresión pHUE. Los plásmidos resultantes se transformaron en *E.coli* BL21 (DE). El ADN del plásmido se purificó después de seleccionar los clones positivos utilizando ZR plásmido Miniprep™-Classic (Zymo INVESTIGACIÓN, CA, EE.UU) para ser enviados a secuenciar.

2.2.3 Secuenciación de nucleótidos

La exactitud de las secuencias de nucleótidos de las construcciones fue verificada mediante secuenciación de ADN de los plásmidos construidos empleando un secuenciador de ADN automatizado 3730XL (Applied Biosystems, Universidad de Chicago). Para ello se emplearon diferentes set de primers. Los primers empleados para el secuenciamiento del plásmido pGemTeasy conteniendo al gen de interés fueron: M13F y M13R. Los primers empleados para el secuenciamiento del plásmido pHUE en el que se encuentra el gen de interés fusionado a Ub fueron: T7short F y R. La secuencia de estos primers está contenida dentro de la secuencia de los vectores aguas arriba y abajo del MCS (sitio de múltiple clonado), permitiendo conocer los nucleótidos presentes aguas arriba y aguas abajo del producto de PCR o fragmento clonado.

Las secuencias completas de los constructos secuenciados se muestran en las **Figuras 2.3 A y 2.3 B**.

A

GmsPLA₂-XIA-1-pGemTeasy (355 nt)

```
...ACAACATCCAGAAAGAGTCCACCTGCACTGGTGTGGCCCTCCGGGGTGGATCCGATCAGGCAAACTGCAGCACCACATGCATTCGGGAGCAGTGCACACT
GTTGGAAATCAAATATGGCAAGTATTCGGGGTGGGDTACTGGGDTTGTGCTGGCGAGAAACATGCGATGATCTTGATGCTTGGCATGGCCATGACGACTGC
GTTGACAAAATTCGGAAATGACTCATGTGAAATGTCTAAGAAATTAAGAAATTCCTAACCAAGGAACTAAATCTGGTAAGGTTGGATTTTCCAAGGAGTGTCCC
TAAGCAGAGGCTGCACCTACGATGATAAGAGGCATGGACTTGGCCACTCTTCTAAGCAATTTGGGTGACTCCGTTCTCATTAAAGCTTAGATCCGGCTGCTAACAA
ANCCCGAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACC...
```

GmsPLA₂-XIB-2-pGemTeasy (396 nt)

```
...TTNCGTGNSTTTTGGTNCGGACGTGGCATGCTCCGGGCCCATGGCGGGCCGGGGAATTGATTTCCCGGGTGGAGCGAACATAGGAGCTGAAACCACTGG
AGTCBCTGTCTCTGTGGCAAGAGTGCAGTAGACAAATGTGAGTCAAGTTTCTGCTCAGTGCCTCCATTATTAGATATGGCAAGTACTGTGGACTTTTGTATAGT
GGATGCCCTGGAGAAAGACCTTGTGATGGCCCTTGAECCTTGTGTATAGAGCATGATCAATGTGTGTCACDCAAAAACAATGACTACCTAAGDCAAGAGTGCAGC
CAAACTTCATAAATGTATGAATAACTTAAAGAACTCAAAGGCTCCTACTTCAAAGGAACAACGTGCGATGTGGATGATGTTAAGAGTATACATGTTGTGAT
GGAGGCTGCTTACTGGCTGGAAAGGTTCTCCAAGCCATAGAAAGCTTTAAATCACTAGTGAATTCGGGGCCGCTGCAGGTCGG...
```

B

His (6)-Ub-GmsPLA₂-XIA-1-PHUE (573 nt -196 aa)

```

HdeI
1  OCCCCOCCOCC ACCCATATTC AGATCTTCTT NAAAGCCCTC ACTGACAAA
      M Q I F V K T L T G K T
51  CCAVCAACCTT TGAGTTCGAG CCCAGTGACA CCATTAGAAA TGTCAAGACC
      I T L E V E P S D T I E N V K A
101  AAATTCAGG AAGAGGAGG TATCCGACT GAGCAGCAGC GTCATATAT
      K I Q D K E G I P F D Q O R L I F
151  TCCCGCCAAA CAGCTGGAGG ATGCCCCAC TCTCTCAGAC TAAACATCC
      A G K Q L E D G R Y L S D Y N I Q
      SacII
201  AAAAGAGTC CAGCTCGAC CTGCTTCTG CCCCCTGGGG TGGTCCGAT
      K E S T L R L V L R L R G G S D
251  CAGCCAACT GCAGCAACC ATGCATTGC GAGCAATGC ACACTTTGG
      Q A N C S T T C I A E Q C D T V G
301  AATCAAATAT GCAAGTATT GCGGGTGGG GACTGGGGT TGTGCTGGC
      I E Y G K Y C G V G Y W G C A G E
351  AGAAACCATG CGATGATCTT GATGCTTCT CACTGGCCCA TGAGGACTGC
      K P C D D L D A C C M A H D D C
401  GTTGACAAAT TCGAATGAC TCAATGAAA TGTATAAGA AATTAAGAA
      V D E F G M T E V K C S K K L E N
451  TTCCATAACC AAGAACTAA AATCTGATA GATTGGATT TCCAAGGAT
      C L T R E L K S G R V G F S K E C
501  GTCCCTACAG CAGACTCCA CCTAGATGA TAAGAGCAT GGACTTGGC
      F Y S R A A P T M I R G H D L A
      HindIII
551  ATCTTGCTAA GCAATTTGG TGACTCCTT CTTGATTAQ CTTAGATCCD
      I L L S Q L G D S V P E *
```

His (6)-Ub-GmsPLA₂-XIB-2-PHUE (615 nt -210 aa)

```

ATGCGATCTTGTGGAGAC GGTCACTGGCAAAACCATGACCTTGAAGTTCGAGCCCACTGACACCAATTGAGGATGTCAAGGCAAAATTCAGACCAAGGGGATATCCC 110
      Ubiquitin
M Q I F V K T L T G A T I T L E V E P S D T I E N V K A K I G D R E F C I P
AOCGACAGCAGCGTCC GATATTTGGCCGGGAAACACTGAGAGGATGAGCCACTCTCTCAAGCTATACATCCAGAAAGATTCACCTGCAAGCTGTGTTGGCCGCC 210
      Ubiquitin
P D G G H L I P A R K Q L E D R T L R D Y M I G K E S T L H L R L R L
His
301  GCGTGGAGGAAKATATAGAGCTGAACCACTGAGATCTGCTGCTCTGCTGGCCAAAGATCGAGTGAAGATGTCAGTCAAGTCTTGTGCTGAGTGGCCCATATATAGA
      Ubiquitin
E D G A N I G R E T T G V A V S V G R E C S R Q C E E S P C S Y P F L I G
TATGCAATGACTGTTGACTTTTATATAATGATGCTGCGAGAAAGACTCTTGTATGGCCCTGAGCTGTTGATGAGCAGATGATCAAGGTGTGTGAGCAAAAACAA 440
      Ubiquitin
Y G K Y C D L L Y S S C P M E R F C D S L D A C C M K H E G Q V S A K M N
GACTACCTAGCCAGAGATGACGACCAAACTTCATAAATGTATGATATACTTAAAGAACTCAAAGGCTGCTGCAATTCAAAGGAAACAGCTGGAGTGTGGAGATGTTA 550
      Ubiquitin
D Y L S D E C S D I F I N C M N P A N S K A P T P A Q N T C O V D D V
      His
TTHAATATATCATTTTGTGAGGAGGAGGCTCTTACTGCTGGAGATGCTCCAGAAAGCAAGAGAGCTT
      Ubiquitin
I E V I H V M E R A L L A S R V L H A P A L
```

Figura 2.3. A) Secuencia de ADN de los constructos GmsPLA₂-pGEMTeasy. En rojo se muestran las secuencias nucleotídicas de las GmsPLA₂s que han sido clonadas dentro del vector pGEMTeasy. **B) Secuencia de ADN de los constructos Ub-GmsPLA₂-pHUE.** En la parte superior se encuentra graficada la secuencia para Ub-GmsPLA₂-XIA-1-pHUE. La región que codifica para ubiquitina muestra el sitio de restricción para SacII, el cual se muestra en gris. En gris claro se muestra la secuencia de ADN que codifica para la proteína madura GmsPLA₂-XIA-1 con el codón de stop y el sitio de restricción para HindIII. Los sitios de restricción están subrayados y en letra negrita. Con un triángulo se muestra el sitio donde comienza la secuencia de GmsPLA₂-XIA-1. En la parte inferior se encuentra la secuencia del constructo que contiene la proteína recombinante Ub-GmsPLA₂-XIB-2-pHUE. En la secuencia de ADN, la región que codifica para ubiquitina (verde) muestra el sitio de restricción SacII. En naranja se muestra la secuencia que codifica para la proteína madura GmsPLA₂-XIB-2, con el codón de terminación y el sitio HindIII.

2.2.4 Expresión de proteínas recombinantes GmsPLA₂s

Los genes ensamblados (Ub-GmsPLA₂-XIA-1 y Ub-GmsPLA₂-XIB-2) subclonados en el vector de expresión pHUE, fueron transformados electroquímicamente en la cepa de *E.coli* BL21 (DE3) empleando medio LB (Luria Bertani) fresco como medio de cultivo y colocado a crecer en un agitador a 37°C durante 30 minutos. Luego las bacterias transformadas con los respectivos plásmidos, se dispusieron en placas de petri conteniendo medio de cultivo LB sólido con ampicilina (100 mg/mL) e incubadas 24 hs a 37°C. Luego una colonia fue seleccionada para inocular un cultivo madre en 3 mL de LB/ampicilina (100 mg/mL) toda la noche a 37°C.

Previamente a realizar la purificación de las proteínas, se realizó un chequeo para determinar si las mismas se hallaban en la fracción soluble o en la fracción que corresponde a los cuerpos de inclusión, ya que de este dato depende la metodología a emplear para obtener las proteínas solubles. Para ello, se largan dos cultivos de 1 mL de LB con ampicilina (100 mg/mL) a partir de 200 µL del cultivo madre que se dejó toda la noche hasta una DO (densidad óptica) de 0,6-0,8 (600 nm) se tomaron 800 µL de cada uno de los cultivos y se centrifugaron a 3000 rpm, guardando el pellet que es donde se encuentran las proteínas. El otro cultivo se indujo con 1mM de IPTG, se dejó 3 hs a 37°C, luego se centrifugó a 3000 rpm y se guardó el pellet. Ambos pellets, correspondientes a la fracción sin inducir y con inducción, fueron resuspendidos en PBS1X y centrifugados a 3000 rpm. De esta forma, se obtuvieron dos fracciones: la fracción soluble y la fracción que corresponde a los cuerpos de inclusión. La **Figura 2.4** muestra una corrida electroforética en un gel de SDS-PAGE las fracciones de sobrenadante (soluble) y del pellet (cuerpos de inclusión). Como se puede observar las proteínas GmsPLA₂s se encuentran reclutadas en los cuerpos de inclusión.

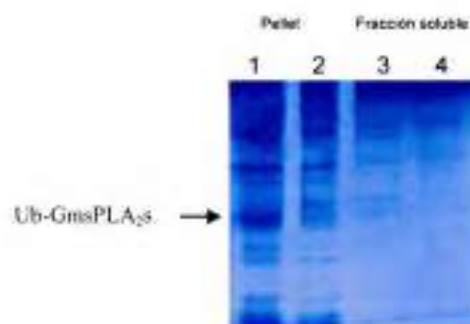


Figura 2.4 En la parte superior se muestran la fracción sobrenadante con y sin inducción y en la parte inferior, la fracción pellet con y sin inducción. Línea 1- Ub-GmsPLA₂-XIA-1 en cuerpos de inclusión con inducción, Línea 2- Ub-GmsPLA₂-XIA-1 en cuerpos de inclusión sin inducción, Línea 3- Ub-GmsPLA₂-XIA-1 en fracción soluble con inducción, Línea 4- Ub-GmsPLA₂-XIA-1 en fracción soluble sin inducción

Por lo tanto, con estos datos, se procedió a obtener las proteínas de interés fuera de los cuerpos de inclusión. Para ello, un alícuota (1 mL) del cultivo que se dejó toda la noche se inoculó en 100 mL de medio de cultivo LB/ ampicilina (100 mg/mL), el cual se colocó en un agitador a 37°C. Cuando la densidad óptica a 600 nm alcanzó un valor entre 0,6-0,8, la expresión de la proteína se indujo mediante la adición de IPTG (isopropil-L-tio-β-D-galactopiranosido) a una concentración final de 1 mM y se incubó durante 4 h a 37°C. Las células bacterianas se recogieron por centrifugación a 5000 rpm a 4°C. Dado que las proteínas de fusión se encuentran presentes en los cuerpos de inclusión, se elimina el sobrenadante quedando el precipitado (pellet) donde se encuentra la proteína agregada. El primer paso para obtener la proteína soluble, se basó en resuspender el precipitado en solución de lisis conteniendo 2 mL de sucrosa 25% en Tris/HCl 50 mM pH 8, 45,6 μL EDTA 0.44 M, 40 μL Lizosima (10 mg/mL), 1,4 μL β-mercaptoetanol, 50 μL NaCl 4M y se deja 30 min en hielo para que actúe la lizosima. Luego se realizaron 4 ciclos de frío/calor colocando la mezcla en nitrógeno líquido durante 5 minutos y luego 5 minutos a baño maría a 37°C. De esta forma la solución adquirió una consistencia gomosa debido a la liberación del ADN. Se procede a agregar 4 μL DNAsa (5 μg/μL), 4 μL RNAsa (5 μg/μL), 8,6 μL MgCl₂ 1M, se dejó actuar 30 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 10000 rpm durante 20 min. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 2 mL de solución de lavado 1, compuesta de 1 mL de solución buffer 2X (Trizma base 100 mM, β-mercaptoetanol 20 mM y 10 mM EDTA en agua MiliQ) y 1 mL de agua MiliQ. Se homogenizó y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min. Se nuevamente el sobrenadante y el pellet se trató con 4 mL de solución de lavado 2 compuesta por 2 mL buffer 2X, 0,48 g de urea, 0,08 mL de Tritón X-100 y 1,4 mL de agua MiliQ. Se homogenizó y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min, eliminándose el sobrenadante y el pellet obtenido

finalmente tratado con 2 mL de solución de solubilización de cuerpos de inclusión (8M Gdn.HCl (Cloruro de Guanidinio), 200 μ M β -mercaptoetanol) y colocado a 4°C en heladera durante 24hs, dado que con los pasos anteriores se eliminaron muchas proteínas bacterianas solubles y debris celular, pero aun la proteína de interés se encuentra en los cuerpos de inclusión.

2.3.5 Metodología de purificación de proteínas: Cromatografía de afinidad por níquel

2.3.5.1 Fundamento de la técnica

La cromatografía de afinidad es una técnica que se basa en el retraso de la elución de alguna macromolécula en particular, debido a la interacción, específica y reversible, que se presenta entre esa molécula de interés con alguna molécula particular que es inmovilizada en un soporte sólido (a esta partícula se le conoce como "ligando"), permitiendo así la separación de moléculas diferentes presentes en una misma muestra. La columna de afinidad absorbe únicamente de la muestra los componentes que presentan afinidad por los ligandos acoplados al soporte cromatográfico. La interacción de estas dos moléculas es similar a la que se presenta entre una enzima y su sustrato. Durante finales de los 60s y principios de los 70s se escribieron los primeros trabajos que tomaban en cuenta esta interacción para separar proteínas específicas. La cromatografía de afinidad ha sido una herramienta de enorme importancia para el aislamiento, purificación y caracterización de diversas macromoléculas ya que ofrece la mayor selectividad y especificidad. Cuando el compuesto retenido es eluido, se consiguen niveles de pureza considerables, gracias a la elevada selectividad de estas interacciones de afinidad. Las resinas poliméricas son química y físicamente estables, siendo resistentes a los ataques microbianos, dimensionalmente estables frente a los cambios de pH y compatibles con muchos disolventes orgánicos. Además, se ha usado ampliamente para determinar diferentes parámetros que rigen la interacción de dos macromoléculas: constantes de asociación, de disociación, concentraciones máximas y mínimas de sustratos, entre otras [157, 158]. Esta técnica permite obtener la proteína de interés concentrada en una determinada fracción/es.

Posiblemente el uso más común de la cromatografía de afinidad es para la purificación de proteínas recombinantes. En este caso, las proteínas (llamadas proteína de fusión) son modificadas genéticamente con el fin de permitir que sea seleccionada por la afinidad por el ligando de unión.

En este trabajo de Tesis doctoral se utilizó la propiedad de la hexahistidina, la cual se encuentra fusionada a las proteínas de fusión. Las etiquetas de His tienen una elevada afinidad por níquel o cobalto, los cuales se encuentran inmovilizados mediante la formación de enlaces covalentes coordinados con un quelante (sephadex) incorporado en la fase estacionaria en la columna. Para la elución, se emplea una cantidad en exceso de un compuesto capaz de actuar como un ligando de ión metálico, tal como el imidazol.

El sistema de expresión que se empleó en este trabajo de Tesis, consta de un vector de expresión el cual asegura una mayor cantidad de proteína madura que luego de la escisión con USP2cc no contiene aminoácidos extra en su extremo N-terminal. Éste vector además de ofrecer el gen que codifica para Ub, el cual asegura que no haya ningún aminoácido extra en el N-terminal de la proteína madura, adiciona 6 residuos de His en el extremo N-terminal de la Ub, permitiendo su posterior recuperación en columna de níquel. Esta metodología explota la gran afinidad que presenta el níquel por los residuos de His (y de Cys).

2.3.5.2 Purificación de proteínas GmsPLA_{2s}

Las proteínas recombinantes His (6)-Ub-GmsPLA_{2s} se purificaron mediante cromatografía de afinidad por níquel, valiéndose de la afinidad de las His presentes en la proteína recombinante por el metal inmovilizado, que en este caso es níquel, bajo condiciones desnaturalizantes.

La columna fue preparada con 0,5 mL de resina sepharosa (Chelating Sepharose™, GE Healthcare, EE.UU) la cual se lavó con 1 mL de agua MiliQ, luego se le adicionó 1mL de NiSO₄ 0,2 M y se dejó 30 minutos en vuelta al mundo girando para permitir que más moléculas de níquel interactúen con la resina. Luego se lavó con 2,5 mL de agua miliQ, 2,5 mL de solución conteniendo NaCl 0,2 M y 0,02 M de ácido acético y finalmente se equilibró con 1,5 mL de buffer de unión (Gdn.HCl 6 M). Luego se hizo pasar 1,5 mL de sobrenadante obtenido de la solubilización de los cuerpos de inclusión. Para recuperar las proteínas presentes en la muestra, las mismas se eluyen de la resina en fracciones de 0,5 mL de solución conteniendo Tris-HCl 50 mM pH 8, 6 M Gdn.HCl con gradiente conteniendo entre 50-250 mM de imidazol. Las proteínas de interés quedan retenidas en la fracción de 250 mM imidazol.

Las fracciones seleccionadas se reunieron y diluyeron 1:10 para llevar la concentración de Gdn.HCl a una concentración de 0,6 M. Luego se digirieron las muestras con enzima USP2cc deubiquitinasas a 37°C durante toda la noche (relación

molar peptidasa/enzima 1:100). La escisión se produce después de que el residuo de glicina final en el terminal carboxilo de Ub independientemente del aminoácido inmediatamente siguiente en la secuencia cambie. La proteasa permite la escisión de la Ub de la proteína deseada, así como su eliminación selectiva de la reacción de escisión, junto con cualquier proteína de fusión no escindida, y cualquier contaminante copurificado, dejando la proteína deseada como el único producto soluble que eluye en la fracción sin retener en la columna, dado que no contiene las His para ser retenida en la columna. Nuevamente se realizó un paso final de purificación para aislar el producto escindido de la mezcla de reacción de escisión mediante el uso de resina de níquel bajo las mismas condiciones que se mencionó anteriormente, excepto que ahora el buffer de unión contiene 0,6 M Gdn.HCl. En la **Figura 2.5** se puede observar un esquema de los pasos de purificación. Cabe destacar que a veces la proteína permanece adherida al níquel de la columna mediante sus cisteínas, eluyendo en fracciones como puede ser la que contiene 50 mM de imidazol. Las fracciones donde se encuentra la proteína recombinante son agrupadas y se dializan durante 4 días a 4°C frente a un tampón que contiene Tris-HCl 50 mM pH 8, cisteína 10 mM y 1 mM de CaCl₂ (buffer de renaturalización).

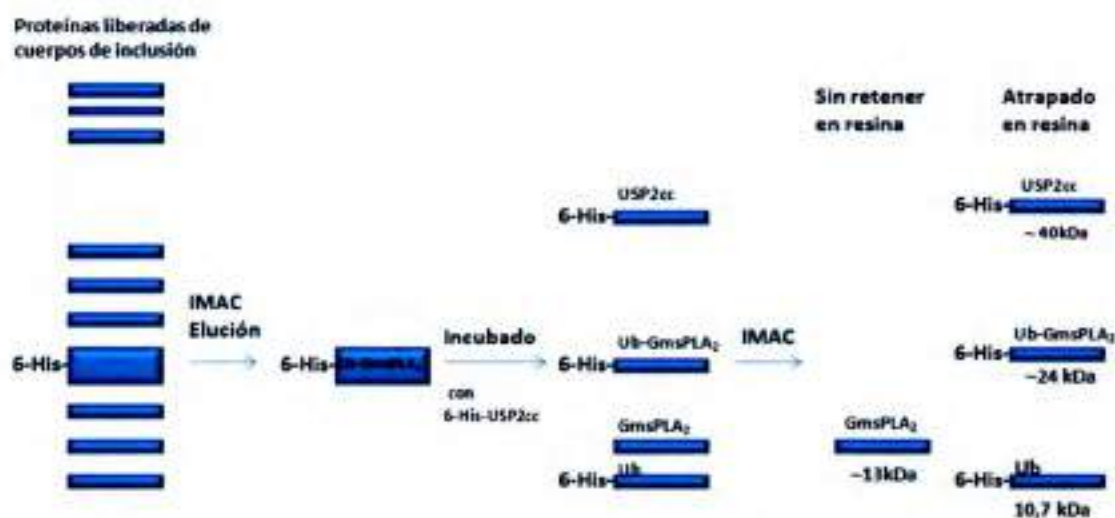


Figura 2.5 Esquema de los pasos seguidos para la purificación por cromatografía de afinidad por níquel.

Luego las muestras se concentraron hasta una concentración de aproximadamente 1mg/mL empleando una bomba de vacío. La pureza final de las GmsPLA₂s fue aproximadamente del 95% según lo determinado por electroforesis SDS-PAGE (ver Capítulo 4).

La enzima deubiquitilante, USP2cc, fue diseñada por Ann-Maree Catanzariti y col. a partir de una DUB (enzima deubiquitinasa) proveniente de ratón, la cual también se colocó en el vector pHUE, se expresó y se purificó como Poli-His-DUB. La peptidasa 6H-USP2cc se expresó en cultivos de *E.coli* BL21 (DE3) transformados con el constructo pHUsp2cc donado amablemente por Ann-Maree Catanzariti y se purificó adicionalmente mediante el uso de cromatografía de afinidad de níquel (ver ref. [156]).

2.3.6 Electroforesis SDS-PAGE

Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% en condiciones reductoras, siguiendo el método de Laemmli [159], con el fin de determinar la presencia de las proteínas de interés en las fracciones eluidas de la columna de afinidad y llevar a cabo un seguimiento de las mismas en los pasos tanto de purificación como de solubilización de cuerpos de inclusión a partir de las masas moleculares esperadas para las proteínas presentes en la mezcla. Las condiciones de corrida electroforética fueron 50 minutos a 160 mA. Las proteínas se visualizaron con tinción brillante de azul de Coomassie R-250.

2.3.7 Semi-Cuantificación de proteínas

Los geles obtenidos de las corridas electroforéticas fueron escaneados y las imágenes digitales fueron importadas. Las bandas correspondientes a las GmsPLA₂s purificadas fueron semi-cuantificadas empleando el software PhotoshopCS (Adobe Photoshop), midiendo las intensidades de las mismas, y comparándolas, de acuerdo con su escala de grises, con albúmina de suero bovino (BSA) empleada como estándar de acuerdo con <http://lukemiller.org/index.php/2010/11/analyzing-gels-and-western-blots-with-image-j>. De esta forma se pudo conocer la masa aproximada de proteína presente en la muestra y calcular las concentraciones aproximadas de proteína a emplear en cada ensayo. Cabe destacar, que a pesar de que los métodos de purificación se siguieron paso a paso, no siempre se recuperó la misma cantidad de proteína soluble activa en cada proceso completo, ya que la cantidad de proteína que se obtiene correctamente plegada es difícil de controlar. Sin embargo, en los ensayos donde se establecieron comparaciones empleando diferentes condiciones para una misma enzima, se empleó el mismo lote de proteína.

2.3.8 Espectrometría de Masa y Secuenciación de proteína

La masa molecular correcta se determinó mediante espectrometría de masa MALDI-TOF-TOF 4800 Plus (Applied Biosystems). Previamente se realizó una purificación de la muestra mediante cromatografía de HPLC semipreparativa a los fines de conocer el grado de pureza de la muestra.

La secuencia correcta del N-terminal se determinó mediante degradación de Edman's automatizada empleando un secuenciador automático de proteína 477A (Applied Biosystems) equipado con un sistema en línea de HPLC 130A. Estos estudios fueron realizados por el Laboratorio Nacional de Servicios en Péptidos y Proteínas (LANAIS PROEM) de la UBA, CONICET, Buenos Aires, Argentina.

2.4. Estrategias para el estudio cinético de sPLA₂s

En el diseño de experimentos con PLA₂s deben considerarse básicamente tres aspectos: i) sustrato (clase de fosfolípido), ii) estado fisicoquímico del mismo y iii) método de detección compatible con las características anteriores [3].

Se emplean diacil-fosfolípidos, que son derivados del L-glicerol 3- fosfato y contienen dos ácidos grasos con grupos hidroxilos esterificados en las posiciones *sn-1* (predominantemente saturado) y *sn-2* (generalmente insaturado). Los fosfolípidos se clasifican a su vez de acuerdo a las características de los grupos que conforman la cabeza polar. Dicha zona polar está compuesta de un grupo fosfato esterificado a un esqueleto glicerol y a uno de los siguientes restos polares (X): colina, etanolamina, inositol, serina o glicerol. Los fosfolípidos que presentan una sola cadena de ácido graso se denominan lisofosfolípidos y son metabolitos producidos en la hidrólisis de aquellos.

La cabeza polar influye notoriamente sobre las propiedades físicas de los fosfolípidos. Fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE) son zwitteriónicos a pH neutro, mientras que el ácido fosfatídico (PA), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol (PG) y fosfatidilinositol (PI) son aniónicos [3].

En este trabajo de Tesis se emplearon como sustrato lípidos de cadena media (**Figura 2.1**), como el di-lauroil (C12), que no se encuentran en el medio natural y son obtenidos por vía sintética.

Los fosfolípidos, compuestos anfipáticos, existen en diversos estados de agregación en medio acuoso. La clase de agregado depende de la estructura molecular del lípido, de la temperatura, proporción de agua y presencia de otros solventes. En la **Figura 2.6** se muestran de manera esquemática algunas de las formas de agregados que pueden

adoptar los fosfolípidos en agua y que fueron empleados como sustrato en diversos experimentos en este trabajo de Tesis.

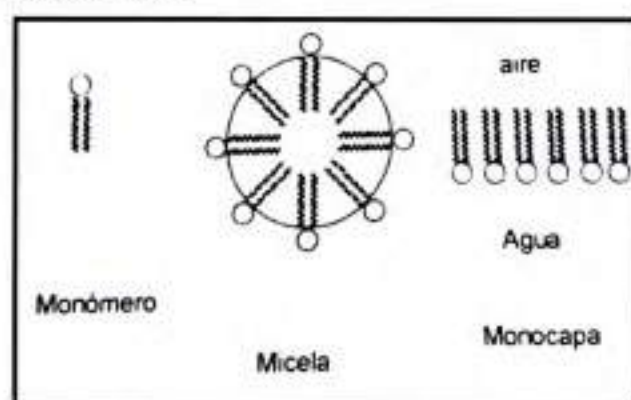


Figura 2.6 Diversos estados fisicoquímicos de fosfolípidos empleados como sustrato.

En las secciones que siguen a continuación se describe el empleo de un método hidrolítico indirecto clásico para screening y un sistema más simple y controlado como pueden ser las monocapas o las micelas para la determinación de la actividad sPLA₂ con sus características cinéticas.

El sistema de micelas mixtas fosfolípido-Tritón X-100 ha sido extensamente estudiado [160], y es en principio, el más adecuado de los sistemas experimentales para el estudio cinético de sPLA₂s debido a la mayor regularidad en el tamaño de los agregados. Se ha demostrado, además, que el intercambio de fosfolípido en la micela mixta es rápido y que el contenido de fosfolípido no constituye un factor limitante de la velocidad en la hidrólisis de fosfolípidos [161].

2.4.1 Métodos de determinación de la actividad sPLA₂

2.4.1.1 Determinación indirecta de la actividad sPLA₂

Con el objeto de chequear en las etapas iniciales de la purificación tanto la presencia como la renaturalización (o correcto plegamiento) de las GmsPLA₂s, la actividad se determinó indirectamente mediante análisis directo de la actividad hemolítica. Este ensayo consta de una placa de Petri conteniendo una mezcla de agar:PC de huevo:sangre preparado siguiendo las indicaciones como se describe en [162]. Para la preparación de las placas se tomaron 1,2 mL de eritrocitos humanos (donados por el Banco de Sangre de la Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina) los cuales se lavaron cuatro veces con solución salina (PBS1X pH 7,4), 1,2 mL de solución de PC de yema de huevo diluida 1:3 en solución salina (PBS1X pH 7,4) y 1 mL de solución 0,01 M de CaCl₂, los cuales se adicionaron a 100 mL de agar 1% (P/V) disuelto en tampón

PBS IX pH 7,4, previamente calentado a 50°C, y se adicionó azida sódica. La mezcla se dispersó en placas de Petri (20 mL en cada una) de plástico y se dejó gelificar. Luego, se realizaron huecos cilíndricos de 3 mm de diámetro en los cuales se colocaron 15µL de cada muestra a ser analizada. Después de 18 h de incubación a 37 C, se observan visualmente los diámetros de los halos hemolíticos. El halo formado es indicativo de hidrólisis indirecta de los fosfolípidos que se encuentran en la yema (y por ende de actividad sPLA₂) ya que los lisofosfolípidos liberados actúan como detergentes produciendo la hidrólisis de la membrana de los glóbulos rojos. El tampón de renaturalización se utilizó como control negativo así como la proteína de fusión, mientras que como control positivo se utilizó sPLA₂ pancreática.

2.4.1.2 Ensayo colorimétrico: cuantificación de ácidos grasos libres

La actividad sPLA₂ se determinó utilizando micelas mixtas de DLPC/Tritón X-100 (relación molar 1:4) y se cuantificó la cantidad de ácidos grasos liberados a partir de DLPC de acuerdo con [163] mediante el empleo del Kit NEFA-HR (2) adaptado (WAKO Pure Chemical Industries, Japón). La mezcla de ensayo se compuso de DLPC 5 mM, Tritón X-100 20 mM, CaCl₂ 10 mM y Tris-HCl 10 mM pH 8 en un volumen total de reacción de 30 µL. Todos los ensayos se realizaron a 37°C y a un tiempo de 5 minutos. La preparación del sustrato se llevó a cabo disolviendo cantidades apropiadas de DLPC en 1 mL de cloroformo/metanol (2:1, V/V), secando con gas N₂ y posteriormente colocando en campana de vacío durante toda la noche. La película de lípido luego se disolvió en 10 mM Tris-HCl pH 8 conteniendo 20 mM, Tritón X-100 y CaCl₂ 10 mM por agitación durante 15 min a 40°C. La reacción se inició mediante la adición de enzima purificada a partir de una solución madre. La reacción se detiene por adición de 6 µL de EDTA (ácido etildiaminotetraacético) 0,5 M. La actividad se determinó a partir de los ácidos grasos liberados como se ha descrito anteriormente, de acuerdo a las instrucciones del fabricante, con una relación alterada de reactivos/muestra (36 µL de muestra, 125 µL de reactivo A y 62 µL de reactivo B). La absorbancia del complejo que se forma (**Figura 2.7**) se midió a 550 nm utilizando ácido oleico como estándar. La actividad se expresó como µmol de ácido graso liberado por minuto por mg de proteína (µmol.min⁻¹.mg⁻¹). Todos los experimentos se realizaron al menos por duplicado y los resultados informados como la media ± SD.

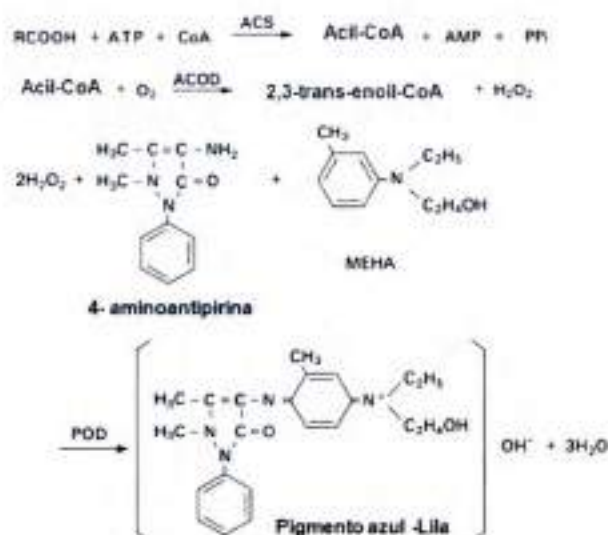


Figura 2.7. Esquema de la reacción colorimétrica que se lleva a cabo con los ácidos grasos liberados de los fosfolípidos para su posterior cuantificación. Para más información dirigirse a (http://www.wakodiagnosics.com/r_nefa.html y http://www.wakodiagnosics.com/pi/pi_hr_serise_nefa-hr%282%29.pdf).

2.4.2 Determinación de las condiciones óptimas de actividad

2.4.2.1 Medición de la velocidad inicial

Con el fin de definir el intervalo de velocidad inicial (V_0), la enzima se incubó durante 1-40 minutos a 37°C con la micela mixta de DLPC-Tritón X-100. Se retiraron alícuotas de 30 μL después del tiempo de incubación deseado y los ácidos grasos liberados se cuantificaron como se mencionó anteriormente. Se determinó que hasta 10 minutos se está trabajando en condiciones de velocidad inicial, seleccionándose un tiempo de 5 minutos para la determinación de las características bioquímicas de las GmsPLA₂s. La actividad de la enzima mostró una dependencia lineal con la concentración de 0,13 μM y 0,23 μM para GmsPLA₂-XIA-1 y GmsPLA₂-XIB-2, respectivamente. Todos los experimentos se realizaron al menos por duplicado.

2.4.2.2 Determinación de las condiciones óptimas para la catálisis

2.4.2.2.1 pH óptimos

Para definir el rango de pH óptimo para la actividad de las GmsPLA₂s, se utilizaron diferentes buffers a una concentración final de 25 mM para preparar las micelas mixtas de DLPC/Tritón X-100 (1:4): tampón MES (pH 5 y 6), tampón Trizma base (pH 7 y 8) y tampón de glicina-NaOH (pH 9). Las enzimas (2,66 $\mu\text{g/mL}$ de GmsPLA₂-XIA-1 y

1,07 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de GmsPLA₂-XIB-2, respectivamente) se incubaron con las micelas mixtas en las soluciones tampón correspondientes conteniendo CaCl₂ 10 mM durante 5 minutos a 37°C y luego se ensayaron como se menciona arriba. Con los datos obtenidos se graficó actividad vs. pH.

2.4.2.2.2 *Temperatura óptima*

Con la idea de determinar la temperatura óptima, las enzimas se incubaron con micelas mixtas de DLPC/Tritón X-100 en tampón Tris-HCl 10mM pH 8, conteniendo CaCl₂ 10mM durante 5 minutos, variando la temperatura entre 20°C y 90°C. Se determinó la cantidad de ácidos grasos generados como se describió anteriormente. Con los datos obtenidos se graficó actividad vs. temperatura (°C).

2.4.2.2.3 *Efecto de calcio en la preservación de la estructura frente a la temperatura*

Para determinar la estabilidad de la estructura de la enzima GmsPLA₂-XIA-1 (1,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$) al calentar la misma a 60°C, se ensayaron tres condiciones diferentes, siempre incubadas con micelas mixtas de DLPC/Tritón X-100 en tampón Tris-HCl 10 mM pH 8 y : i) con CaCl₂ 10 mM para determinar la actividad normal de la enzima (como control); ii) con EDTA 10 mM para quelar los iones de Ca²⁺ presentes en la muestra durante 1 minuto a temperatura ambiente previamente a la incubación con las micelas mixtas y, iii) a la enzimas pretratadas con EDTA 10 mM (punto ii), se adiciona nuevamente un exceso de CaCl₂ 10 mM y se dejó actuar durante 5 minutos con la idea de recuperar la actividad. Para cada condición ensayada se determinó la cantidad de ácidos grasos liberados como se menciona más arriba.

2.4.2.2.4 *Requerimiento de calcio óptimo*

Para la determinación del requerimiento óptimo de calcio, las enzimas se incubaron con las micelas mixtas de DLPC/Tritón X-100 en tampón Tris-HCl 10 mM pH 8,0, conteniendo concentraciones crecientes de CaCl₂ que van de 0,1 a 4 mM, durante 5 min a 37°C. Los ácidos grasos liberados se cuantificaron utilizando el kit NEFA-HR como se describe más arriba. Con los datos obtenidos se graficó Actividad vs. concentración de calcio.

2.4.2.3 *Determinación de los Parámetros cinéticos*

Para la determinación de las constantes cinéticas, las velocidades iniciales (V_0) de reacción se determinaron como se describe anteriormente empleando concentraciones de

sustrato en el rango de 0 a 6 mM y de 0 a 18 mM para GmsPLA₂-XIA-1 (1,5 µg/mL) en DLPC y DLPG, respectivamente, y de 0 a 4 mM para GmsPLA₂-XIB-2 (2,66 µg/mL) tanto en DLPC como DLPG, utilizando buffer Tris-HCl 10 mM pH 8, conteniendo NaCl 100 mM y CaCl₂ 10 mM durante 5 minutos a 37°C. Cabe aclarar que una concentración de 5 mM de CaCl₂ (bien por encima del óptimo hallado para nuestras enzimas, ver **Figura 5.1D**) en vez de 10 mM empleado rutinariamente, se utilizó para prevenir turbidez en las muestras conteniendo altas concentraciones de DLPG.

El procesamiento de los datos experimentales y la determinación de los parámetros cinéticos aparentes: K_M (Constante de Michaelis-Menten) y V_{MAX} (Velocidad Máxima) fueron llevados a cabo a partir de los datos obtenidos de las curvas de sustrato (velocidades iniciales vs. Concentración de sustrato) y posterior análisis mediante regresión no lineal utilizando el formalismo de Michaelis-Menten mediante el uso del programa Sigma Plot 10.0. La eficiencia catalítica de cada enzima se determinó mediante la relación entre V_{MAX} y K_M [87].

2.4.2.4 Determinación de la preferencia de sustrato que difieren en su cabeza polar

Para dilucidar la preferencia por sustrato de ambas GmsPLA₂s, se utilizaron sustratos con la misma longitud de cadena pero con diferentes grupos en la cabeza polar (DLPE, DLPC, DLPG y DLPA) para preparar las micelas mixtas de sustrato/Tritón X-100 en buffer Tris-HCl pH8 conteniendo CaCl₂ 10 mM. En el caso de los lípidos DLPC, DLPG y DLPA la relación sustrato/Tritón X-100 fue de 1:4, mientras que para la mezcla de DLPE/Tritón X-100, dado que mostró turbidez con esa relación, hubo que disminuir la relación lípido/detergente a 1:8. Se ensayaron dos condiciones: en presencia de NaCl 100 mM y en ausencia de NaCl. Las concentraciones de las enzimas fueron las mismas que las empleadas para la determinación de las constantes cinéticas. Para el cálculo de los valores mostrados en la Tabla 5.3, los resultados obtenidos a los 5 minutos de reacción fueron normalizados respecto al valor más alto obtenido con DLPC.

A los fines de dilucidar mediante otro enfoque la preferencia de las GmsPLA₂s por sustratos aniónicos o zwitteriónicos, se realizó un ensayo variando el porcentaje de DLPG (de 5 a 40%) adicionado a micelas mixtas de DLPC/Tritón X-100 (1:4) hasta lograr una concentración final de lípidos total de 1mM en buffer Tris-HCl pH 8 en presencia de CaCl₂ 10 mM. Se determinó la cantidad de ácidos grasos liberados a los 5 minutos de reacción. Con los datos obtenidos se realizaron las gráficas de Actividad vs. % de DLPG añadido. Se utilizó la sPLA₂ pancreática (1.5 µg/mL), paradigma de las sPLA₂.

para establecer una comparación con los resultados observados para las GmsPLA₂s. Las concentraciones de las enzimas fueron 1,5 µg/mL y 1,77 µg/mL para GmsPLA₂-XIA-1 y GmsPLA₂-XIB-2, respectivamente.

2.4.2.5 Determinación del modo interfacial de acción

Con el objeto de determinar el modo en que estas enzimas llevan a cabo la catálisis en la interfase, la actividad de GmsPLA₂-XIA-1 (1,75 µg/mL concentración final) se evaluó usando dos concentraciones diferentes de sustrato DLPC en las micelas mixtas de una manera secuencial. El experimento se basó en determinar básicamente si la enzima que está actuando sobre micelas es capaz de reconocer el nuevo agregado micelar. Esto permitiría sugerir que la enzima actúa en modo saltatorio o adherido. Para ello se preparan micelas mixtas que contienen 0,25 mM del sustrato DLPC y por otro lado micelas conteniendo 1 mM de DLPC, y se procede a ensayar el comportamiento de la enzima en las mismas por separado. Luego una reacción del tipo inicial, a una concentración de 0,25 mM de DLPC (micelas mixtas), se siguió hasta los diez minutos; a continuación, se añadió una alícuota de micelas mixtas conteniendo 0,75 mM de DLPC para llegar a una concentración final de sustrato de 1 mM en el tubo de reacción y posteriormente a los 5 minutos se midió la actividad. El buffer empleado en este ensayo fue Tris-HCl 10 mM pH 8, conteniendo CaCl₂ 10 mM. La relación molar aproximada de enzima/micela calculada a una concentración de sustrato final de 1 mM fue de 1:232.

2.4.2.6 Cálculo de la relación micela/enzima

Para conocer la relación existente entre la micela mixta y GmsPLA₂-XIA-1 empleados en los experimentos, se debe proseguir como se menciona a continuación, teniendo en cuenta algunas aproximaciones. Se debe asumir que la micela es un ensamble multimolecular con una masa molecular equivalente a la suma de las masas moleculares individuales del DLPC y Tritón. Una micela de PC/Tritón X-100 en una relación molar 1:4, posee un radio de Stokes del orden de 70 Å y una masa micelar molecular aproximada de 100 kDa equivalente a un total de 140 moléculas de fosfolípido y Tritón X-100 [164]. La masa molar promedio para los componentes de la micela-mixta se toma entonces de 650 g, sabiendo que la micela contiene una relación DLPC y Tritón de 1:4, o sea, para una concentración de 1 mM y 4 mM respectivamente equivale a 650 µg/mL de DLPC y 2600 µg/mL de Tritón X-100. Si en el experimento se emplean 30 µL de micela para la reacción, quedan conformando dicha micela: 19,5 µg de DLPC y 78 µg de Tritón, que suman un total de 97,5 µg de micela en los 30 µL de medio de reacción. Ahora bien,

asumiendo que el PM de una micela es 100.000, significa que 97,5 μg de micela equivalen a **0,000975 μmol de micelas en el medio.**

Para el caso de GmsPLA₂-XIA-1, la concentración empleada en el ensayo fue 0,0175 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y se colocó a reaccionar 3 μL , lo que significa que en el medio de reacción se colocó 0,0525 μg en un volumen final de reacción de 30 μL . Dado que la masa molecular de GmsPLA₂-XIA-1 es 12374 g/mol, 0,0525 μg es equivalente a **0,0000042 μmol de sPLA₂ en el medio de reacción.**

Finalmente, dividiendo 0,000975 μmol / 0,0000042 μmol , se obtiene la relación micela/enzima que resulta ser en este caso de: **232/1.**

2.4.2.7 Efecto de las auxinas sobre la actividad GmsPLA₂ en micelas mixtas.

La influencia de las auxinas (IAA e IPA) sobre la actividad sPLA₂s se investigó mediante incubación de las sPLA₂s (3,11 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1,11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 9,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para GmsPLA₂-XIA-1, GmsPLA₂-XIB-2 y sPLA₂ pancreática, respectivamente) durante 1 minuto con la auxina correspondiente a temperatura ambiente a diferentes concentraciones (entre 0,1 mM y 1 mM) para proporcionar el tiempo necesario para la interacción entre ambas. Una muestra control sin adición de la hormona se evaluó con el fin de calcular la tasa de estimulación. Como control negativo se empleó etanol en lugar de auxinas en la micela mixta. La solución madre de las auxinas (10 mM) se preparó por disolución de las mismas en etanol absoluto (Merck). Con el fin de realizar el ensayo enzimático, la enzima y la auxina, se añadieron a la micela mixta en presencia de agitación a 60 rpm en un mezclador a 37°C. Después de 5 minutos de incubación, la hidrólisis del sustrato se llevó a cabo y se retiraron alícuotas de 30 μL . La reacción se detuvo por adición de 6 μL de EDTA 0,5 M. Se calcularon los micromoles liberados de ácidos grasos como se describió anteriormente.

2.5 Espectroscopia de Fluorescencia de triptófano para proteínas

2.5.1 Fundamento de la técnica

La fluorescencia es la emisión de fotones debido a transiciones electrónicas entre un estado excitado de la molécula y su estado basal. Esta técnica es ampliamente utilizada para estudiar cambios en la estructura terciaria de proteínas así como su asociación a ligandos, membranas y otras macromoléculas [165]. Los datos de fluorescencia son normalmente presentados como un espectro de emisión. Un espectro de emisión es un gráfico de intensidad de fluorescencia emitida en función de la longitud de onda.

Las sustancias que presentan fluorescencia generalmente poseen electrones deslocalizados, normalmente presentes en dobles enlaces conjugados. La emisión de algunos fluoróforos es sensible a la polaridad del entorno. Por lo general se observa que el espectro de emisión se desplaza a longitudes de onda más corta (corrimiento hacia el azul) por disminución de la polaridad del medio. Por el contrario, la exposición a un ambiente más polar, resulta, generalmente, en un corrimiento del espectro de emisión hacia mayores longitudes de onda (corrimiento hacia el rojo) (**Figura 2.8**). Con frecuencia los corrimientos hacia el rojo son acompañados por una disminución de la intensidad de fluorescencia [165]. La interpretación más sencilla de este fenómeno se basa en que, por lo general, los estados electrónicos excitados de compuestos aromáticos poseen momentos dipolares que son mayores que en el estado basal. Como resultado, la absorción de un fotón induce la formación de un dipolo el cual perturba el ambiente circundante. Luego de la excitación, el solvente responde reorganizando la caja de solvatación alrededor del fluoróforo [165]. Si estos cambios en el ambiente tienden a estabilizar el dipolo excitado, su valor de energía disminuye y se observa el corrimiento hacia el rojo. Por el contrario, en un ambiente apolar, el dipolo excitado se ve desestabilizado, aumentando su nivel de energía y, en consecuencia, se observa un corrimiento hacia el azul.

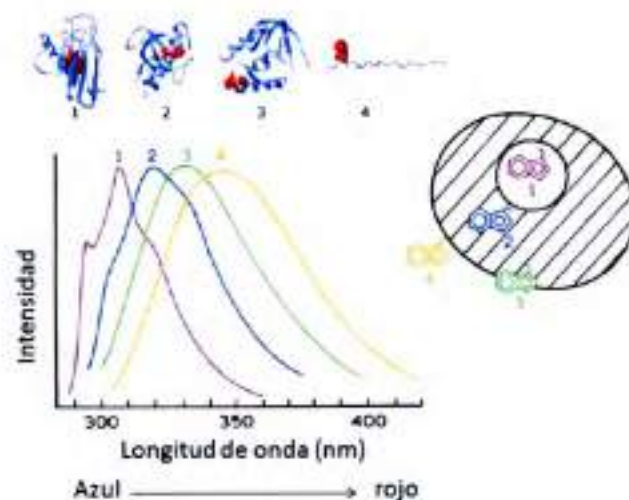


Figura 2.8 Efecto del ambiente del triptófano (*Trp*) en el espectro de emisión. El *Trp* muestra una relativamente baja ocurrencia en la secuencia de proteínas, lo cual facilita la interpretación de los datos espectrales, y posee una fluorescencia intrínseca originada por la presencia en el grupo indol de dos transiciones isoenergéticas cercanas por lo que los cambios en los espectros de emisión a menudo se producen en respuesta a las transiciones conformacionales, la unión al sustrato, o de desnaturalización, ya que son interacciones que pueden afectar el entorno local que rodea al anillo indol. Adaptado de [165].

2.5.2 Medición de la fluorescencia de triptófano de GmsPLA₂-XIA-1

En este trabajo de Tesis se empleó la espectroscopia de fluorescencia intrínseca de la proteína GmsPLA₂-XIA-1, como medición indirecta de la compactación de la estructura terciaria de la misma, ya que posee en su secuencia un único Trp (fluoróforo intrínseco) el cual brinda información acerca de lo que ocurre en la estructura nativa y la dinámica de la proteína, y por ende con su función. Así mismo, mediante el empleo de esta metodología se estudió la influencia de la presencia del calcio para la estabilidad conformacional de la proteína.

Los espectros de emisión de GmsPLA₂-XIA-1 en estado estacionario fueron realizados en un espectrofluorómetro Varian Cary Eclipse. La longitud de onda de excitación del triptófano se estableció en 290 nm, ya que aquí se obtiene la mejor relación entre la excitación de este aminoácido y mínima excitación de las tirosinas (Tyr) y fenilalaninas (Phe), los otros aminoácidos fluorescentes presentes en la secuencia primaria de las proteínas. El monocromador de excitación y emisión se fijó en 10 nm de ancho de banda. La emisión se recogió en el rango de 300 a 400 nm. El máximo de emisión de Trp en agua se produce cerca de 350 nm y es altamente dependiente de la polaridad del entorno. Para cada condición ensayada, diez espectros de emisión fueron promediados y suavizados (smoothing) de acuerdo a la rutina interna del software proporcionado por el fabricante.

La condición de ensayo con la enzima plegada y activa se logró disolviendo la enzima pura en buffer conteniendo Tris-HCl 50 mM pH 8, cisteína 10 mM y CaCl₂ 1 mM. La condición de ensayo sin calcio se logró mediante la adición a la solución conteniendo la enzima, de EDTA a una concentración final de 10 mM. La condición de desnaturalización se logró mediante el agregado de EDTA 10 mM y Gdn.HCl pH 8,5 concentración final 4 M en la cubeta. Antes de cada medición, las muestras se dejan equilibrar por 10 minutos con agitación magnética suave constante. El volumen final en la cuba de cuarzo fue de 50 μ L (paso óptico 10 mm).

2.6 Técnica de capas monomoleculares

La mayoría de los anfífilos forman monocapas en la interfaz agua/aire. Las monocapas ofrecen la posibilidad de variar la presión de superficie con la densidad de lípidos en la superficie. Con fosfolípidos de cadena media, la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas interfaciales puede ser monitoreada dado que los productos son

solubles y abandonan la interfaz [91]. Sin embargo, el sistema de monocapas es problemático en algunos aspectos. Por ejemplo, es difícil establecer la fracción total de enzima adsorbida en la interfaz, la cual se espera que sea pequeña, ya que el volumen de la fase acuosa comparado con el área superficial en la monocapa, y la adsorción de la enzima en las paredes de la cuba puede ser significativo.

Es ampliamente conocido que la actividad de las sPLA₂s está influenciada por los parámetros físico-químicos de los lípidos que forman la interfaz, por lo tanto es importante tener un control continuo, y un conocimiento preciso de la organización intermolecular del sustrato, lo cual es posible por medio de este sistema de estudio. Estos sistemas, además permiten conocer de manera precisa la actividad de las enzimas en tiempo real.

2.6.1 Estudio de las membranas lipídicas en monocapas

Las fuerzas de interacción intermoleculares de un solvente como el agua quedan desbalanceadas en una interface agua/aire. Con la finalidad de evitar el contacto con el aire y de aumentar las interacciones de tipo puente de hidrógeno, las moléculas de agua de la superficie "tiran" hacia el seno de la solución. La magnitud de esta fuerza ejercida por el agua superficial es reflejada en su tensión superficial (72,35 mN.m⁻¹ a 24°C), la cual es relativamente estable y varía menos del 3% entre 5°C y 30°C.

Cuando los lípidos de membrana son disueltos en un solvente insoluble en agua y depositados en una superficie acuosa, el solvente se evapora y los lípidos se expanden rápidamente hasta ocupar toda el área disponible. Los lípidos se disponen de manera de minimizar el contacto de sus regiones no polares con el agua y maximizar el contacto de sus cabezas polares con la misma disminuyendo así la tensión superficial. El film monomolecular resultante, con un espesor equivalente a una molécula de lípido, se denomina "monocapa" y provee un modelo simple y útil para estudiar las interacciones laterales de los lípidos en cada hemicapa de las biomembranas. Este sistema experimental demostró ser muy útil al permitir a Gortel y Grendel proponer la estructura de bicapa para las membranas biológicas [166]. Cambios en la tensión superficial pueden ocurrir como consecuencia de la adición de anfífilos como los fosfolípidos (u otra molécula anfipática) en la interface agua/aire, o por cambios de empaquetamiento que pueden modular la acción biológica de enzimas lipolíticas. El presente modelo de estudio es útil para proveer información acerca de las condiciones óptimas de superficie para la lipólisis. Además es posible estudiar la influencia de los grupos polares de los fosfolípidos o la incorporación

de auxinas sobre la actividad de las enzimas en condiciones controladas de empaquetamiento y sistema de membrana.

Cuando el área superficial disponible para la monocapa es reducida por la acción de barreras móviles (Figura 2.9), las moléculas anfipáticas comienzan a mostrar efectos repulsivos entre sí.

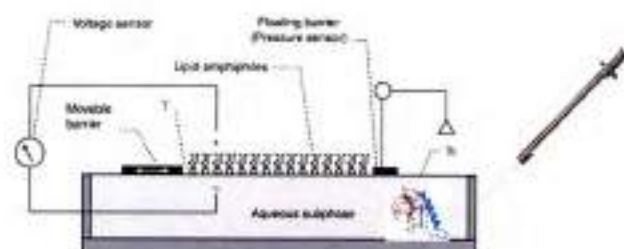


Figura 2.9 Esquema de un equipo de monocapas y formación de una monocapa lipídica.

Este análogo en dos dimensiones de la presión es llamado presión de superficie (π) y se expresa mediante la siguiente relación: $\pi = \gamma_0 - \gamma$ donde γ_0 es la tensión de superficie en ausencia de la monocapa y γ es la tensión superficial en presencia de la misma [166].

A medida que se varía el área interfacial (acercando las barreras móviles) cambia la concentración superficial de lípido y por lo tanto existe un cambio en γ (y por ende de π). Una gráfica de π en función del área molecular promedio se llama **isoterma de presión lateral-área molecular** (o isoterma de compresión o isoterma π -A) (Figura 2.10).

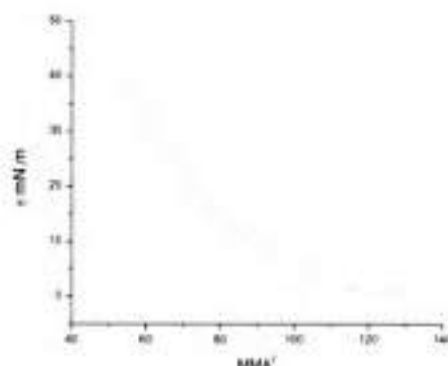


Figura 2.10 Esquema de una isoterma de presión lateral-área molecular promedio.

Este tipo de gráficas proveen información acerca del área superficial de las moléculas en la monocapa y como son afectadas por la naturaleza de la subfase y la presión lateral aplicada [167].

Las moléculas que forman la monocapa pueden existir en diferentes estados, análogos a los estados líquido, sólido y gaseoso en las tres dimensiones, las cuales en monocapas se designan de la siguiente manera: líquido-condensada (LC), líquido-expandida (LE) y gaseoso. Cada estado se caracteriza por un cierto grado de orden de los lípidos, resultante de las fuerzas intermoleculares del film y entre el film y la subfase [168].

Cuando la monocapa es comprimida lateralmente, la presión lateral o de superficie aumenta y la monocapa puede sufrir o no cambios de estado inducidos por la presión, dependiendo del lípido que se trate. Si se continúa comprimiendo, la presión llegará a un punto máximo llamado "*presión de colapso*" la cual constituye la mayor presión a la cual puede ser sometida la monocapa sin que exista expulsión de las moléculas para formar una nueva fase.

2.6.2 Equipos de monocapas empleados

Los experimentos en monocapas planas en interfaz agua-aire realizados en el presente trabajo fueron llevados a cabo con dos de los equipos existentes en el laboratorio del Dr. Maggio del CIQUIBIC.

2.6.2.1 Equipo de monocapas circular

Para los experimentos de actividad sPLA₂, se empleó el equipo de monocapas circular el cual es un equipo Monofilmeter (Mayer Feintechnik, Gottingen, Alemania) incluido en una jaula de Faraday (**Figura 2.11**). Posee una cuba de teflón circular especialmente diseñada (Maggio, 1994) y dividida en compartimentos que ofrecen diferente áreas superficiales, con una profundidad de 0,5 cm separadas entre sí por tabiques radiales de 0,5 cm de espesor.

A su vez, estos compartimentos pueden conectarse entre sí mediante pequeñas hendiduras en los tabiques que los separan y que permiten una conexión fluida entre las superficies de los compartimentos adyacentes sin intercambio de subfase. Posee dos barreras de teflón que son manejadas mecánicamente a velocidad controlada y permiten variar el área de la superficie (**Figura 2.9**). Mediante el uso de este equipo se puede medir en forma simultánea la presión de superficie y la diferencia de potencial de superficie en función de área y del tiempo.



Figura.2.11 Equipo de monocapas circular.

2.6.2.2 Equipo de monocapas KSV

Es un equipo Minitrough (KSV NIMA_Biolin Scientific AB, Västa Frölunda, Sweden) computarizado. Se utilizó una cuba de teflón rectangular de un solo compartimento con un área total de compresión de 215 cm^2 (180 mL de subfase). El área de la interfaz puede ser regulada por dos barreras móviles de teflón hidrofóbicas a velocidad controlada. Este equipo puede medir la presión de superficie ya sea en función del área promedio por molécula en una monocapa o del tiempo, y puede realizar estas mediciones de forma continua.

La presión de superficie (π) en ambos equipos se determinó por el mismo método de Wilhelmy [169] utilizando una placa de platino platinizada de 1 cm de ancho, que se limpió por calentamiento a la llama de un mechero tipo Bunsen entre experimentos. La precisión de las mediciones fue de $\pm 0,5 \text{ mN.m}^{-1}$.

En ambos equipos, para las determinaciones realizadas, se utilizó como subfase una solución de: Tris-HCl 10 mM, CaCl_2 20 mM, NaCl 100 mM, pH 8. Todos los ensayos se realizaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.6.3 Isoterma de adsorción de Gibbs: isoterma de penetración

Las isotermas de adsorción de Gibbs (*isoterma de penetración*) de las auxinas a una interfaz agua-aire limpia o cubierta con fosfolípidos, se realizó en una cuba de 35 cm^2 y una de 18 cm^2 de superficie (53 mL de volumen de subfase total) en el equipo de

monocapas circular. Se inyectó el volumen de hormona necesario para lograr la concentración requerida en la subfase, empleando una jeringa Hamilton. Todas las isotermas se realizaron en las mismas condiciones y con agitación magnética constante. Previamente a la inyección de la hormona en la subfase para obtener las isotermas de penetración en lípidos, la monocapa fue acondicionada con el fosfolípido de interés colocando la cantidad necesaria hasta alcanzar una π deseada de $13 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Previo a la inyección de la hormona, se comenzaron a registrar los parámetros requeridos. Aún cuando ambas auxinas, IAA e IPA (**Figura 1.9**) particionan a la interfaz de lípidos, las mismas no muestran actividad superficial hacia superficie libre de lípidos (datos no mostrados).

Cuando se realiza este tipo de experimentos llevados a cabo empleando monocapas a área constante, un aumento en la presión de superficie tras la adición de un anfifilo a la subfase, en este caso una hormona, es interpretado en términos de penetración física de al menos parte de molécula del anfifilo en la monocapa. A partir de los resultados de las gráficas de π en función del tiempo para diferentes concentraciones de auxina adicionada a la subfase se obtienen los datos para graficar $\Delta\pi$ en función de la concentración.

2.6.4 Isoterma de compresión de Langmuir

Las isotermas de compresión (π/A) se obtuvieron mediante compresión de las monocapas de DLPC puro o mezcla DLPC/auxina (relación molar 8:2), ambas preparadas a una concentración final de $1 \text{ nmol}/\mu\text{L}$ en solución de cloroformo:metanol (2:1), usando el equipo de monocapas KSV Microtrough. Para la formación de la monocapa lipídica se inyectan pequeñas gotas de la solución stock de lípido o de la mezcla lípido-hormona a estudiar, sobre diferentes zonas de la interfaz agua-aire limpia de manera de conocer el volumen exacto de solución empleada (soluto). Este proceso se conoce como "siembra" y es importante que el solvente empleado para preparar la solución stock de lípidos, sea volátil e insoluble en agua, para que se favorezca la dispersión de soluto en la interfaz agua-aire y se evapore rápidamente del sistema. La siembra ($10 \mu\text{L}$), se realiza sobre la cuba de 215 cm^2 (180 mL), la cual está fabricada de un material hidrofóbico (por ejemplo: politetrafluoroetileno PTFE), empleando una jeringa Hamilton de vidrio y metal, con la cual se forma una pequeña gota (no más de $5 \mu\text{L}$) en el extremo de la aguja y luego esta se apoya suavemente sobre la superficie acuosa. La monocapa se deja relajar durante 5 min a $0 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ para permitir que se evapore el solvente orgánico empleado y que se

estabilicen las moléculas en la superficie. El área de la interfaz sembrada, se puede variar moviendo unas barreras, las cuales son del mismo material que las cubas. De esta manera se puede modificar el área promedio de cada molécula lipídica modificándose también la presión lateral o de superficie. En este caso, la monocapa es comprimida a una velocidad de compresión isométrica constante de $5 \pm 1 \text{ \AA}^2 \cdot \text{molec}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ hasta la presión de colapso. La presión de superficie y el área de la monocapa fueron medidas continuamente y los datos registrados automáticamente en el equipo KSV (KSV, Helsinki, Finlandia) en función del tiempo.

Las isothermas de las diferentes mezclas lipídicas y lípido puro utilizadas fueron desarrolladas con el objeto de conocer el área que ocupan los lípidos a las diferentes π , dato necesario para luego poder realizar el cálculo de la actividad de la enzima en la monocapa.

2.6.4.1 Cálculo de MMA corregido.

Las auxinas son moléculas anfipáticas (ver **Figura 1.9**) pequeñas que no son capaces de formar monocapas coherentes por sí solas, por lo que no se observa una isoterma. Por lo tanto, para el cálculo del área molecular promedio del lípido (MMA^2), la proporción de auxinas en la mezcla no se tuvo en cuenta. Si aplicamos la corrección en el cálculo, ya que verdaderamente se esparcieron 0,8 nmol de DLPC, utilizando la siguiente fórmula, podremos obtener el área que realmente está ocupando el lípido en la mezcla en presencia de las diferentes auxinas:

$$\text{MMA corregida: } \frac{A(\text{cm}^2) \times 1 \times 10^{16}}{\text{Vol inyectado} \times 0,0000000008 \times 6,022 \times 10^{23}}$$

2.6.5 Medición de la actividad sPLA₂s

Para medir la actividad sPLA₂, se utilizó la técnica de monocapas, la cual permite monitorear la degradación de sustrato manteniendo la organización de la monocapa controlada a una presión de superficie determinada y constante [170]. Para ello se trabaja con un sistema de compensación de área, en el cual a partir de un reservorio de sustrato, se suministran moléculas al reservorio de reacción en la medida que el fosfolípido va siendo degradado, de forma de mantener la misma cantidad de moléculas de sustrato en la interfaz donde ocurre la reacción, y por lo tanto la misma presión de superficie de la monocapa.

Para realizar la medición de la actividad sPLA₂ empleando el equipo de monocapas circular monofilmmeter, el mismo se acondicionó para trabajar manteniendo la π del sistema constante con compensación de área mediante el empleo de las barreras mecánicas. Para ello el pilón circular original se sustituyó por uno especialmente diseñado. El seguimiento se realizó con una grabadora de XYY doble canal (Yokogawa Corp. Japan). La enzima sPLA₂ hidroliza el sustrato DLPC dando como producto lisoPC y ácidos grasos de cadena corta (10 átomos de carbono). Estos productos de la catálisis son solubles en agua y se desorben rápidamente de la superficie cuando son generados, desplazándose a la subfase donde no interfieren en la degradación del sustrato y no perturban la medición de actividad completándose la misma al 100% [137], permitiendo así considerar una cinética de orden cero para esta reacción.

La medición de la actividad enzimática se realizó empleando dos compartimentos, como se mencionó anteriormente, uno de 18 cm² y otro de 35 cm² de superficie (total 53 mL de subfase), conectados entre sí mediante una pequeña hendidura. En ambos reservorios se coloca la solución de subfase para la enzima, mientras que en el compartimento de reacción, se siembra (1-10 μ L de solución 1 nM) la monocapa de lípidos puro (o mezcla de lípido-hormona) hasta alcanzar la π deseada, en este caso de 13 mN.m⁻¹, la cual se mantiene constante mediante compresión mediada por las barreras. Dado que la siembra del lípido o lípido-hormona se prepara en una solución cloroformo/metanol (2:1), se deja transcurrir 5 min para permitir la evaporación del disolvente. En la **Figura 2.10**, se muestra un esquema del equipo/metodología empleada.

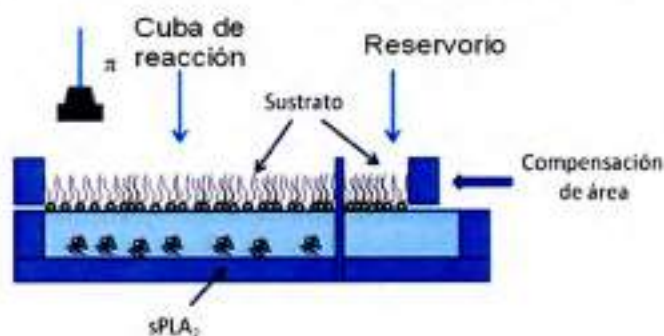


Figura 2.10. Esquema de medición de actividad sPLA₂ en equipo de monocapas circular.

La cantidad deseada de enzima (no más de 50 μ L) se inyecta en la subfase del compartimento de reacción (18 a 35 mL) bajo agitación magnética continua a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Un compartimento adyacente (conectado al compartimento de reacción a través de una

rendija estrecha y poco profunda) sirve como un depósito de sustrato con el fin de mantener la presión de superficie constante durante la reacción enzimática.

El área que se compensa es luego referida al número de moléculas de sustrato hidrolizadas considerando el área que ocupa cada una de ellas. Es decir, la actividad enzimática de las sPLA₂s en monocapas de DLPC o DLPC/auxina se determina midiendo continuamente la disminución del área de la superficie ocupada por el sustrato con el transcurso de tiempo de la reacción [34, 35] a una presión de superficie constante (π) usando un baróstato de superficie.

La actividad de las enzimas se calcula como el número de moléculas de lípidos degradados por minuto por unidad de área de superficie (**Fórmula 2.1**) y se expresa como moléculas/cm²/min, y corresponden a la pendiente de la porción lineal de las curvas de tiempo (**Figura 2.11**).

$$V = \frac{\Delta a \text{ (cm}^2\text{)} \cdot 1,0 \times 10^{16} \text{ (molec/cm}^2\text{)}}{T \text{ (min)} \cdot A^2 \pi \text{ (cm}^2\text{)} \cdot A^2 \text{ cuba (cm}^2\text{)}}$$

En donde:

V es la velocidad de hidrólisis (molec.min⁻¹.cm⁻²) x10¹⁷

Δa es el cambio de área en cm² durante la reacción enzimática

t es el tiempo en min

1,0 x 10¹⁶, es el factor de corrección para pasar de área de cm² a Å²

A² π (cm²) es el área ocupada por el lípido a una presión de superficie dada

A² cuba (cm²) es el área que tiene la cuba al inicio de la reacción

Fórmula 2.1 Ecuación del cálculo de actividad en monocapas.

En la **Figura 2.11** se observa un esquema representativo de la medida de actividad sPLA₂ en sistema de monocapas. En estos experimentos, también se determinó el periodo de latencia o *lag time*, que es anterior a la etapa catalítica y es el tiempo requerido por el sistema para lograr un estado máximo de actividad en la interfaz e incluye una serie de eventos pre catalíticos.

El *lag time* o periodo de latencia se obtiene experimentalmente del punto de intersección (flecha verde, **Figura 2.11**) entre una recta originada por extrapolación en el eje del tiempo, a cero porcentaje de degradación, y una recta correspondiente a la pendiente de la curva de actividad enzimática a velocidad constante de degradación (región lineal), en referencia al tiempo cero en el que se inyecta la enzima (flecha negra, **Figura 2.11**). El porcentaje de moléculas degradadas entre el comienzo y declinación de la actividad se define como extent y representa el porcentaje de sustrato disponible para su degradación. Los ensayos de periodo de latencia "*lag time*" y la dependencia de la

actividad de la enzima con la concentración empleada de la misma, se desarrollaron a una presión constante de la superficie lateral de $13 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$.

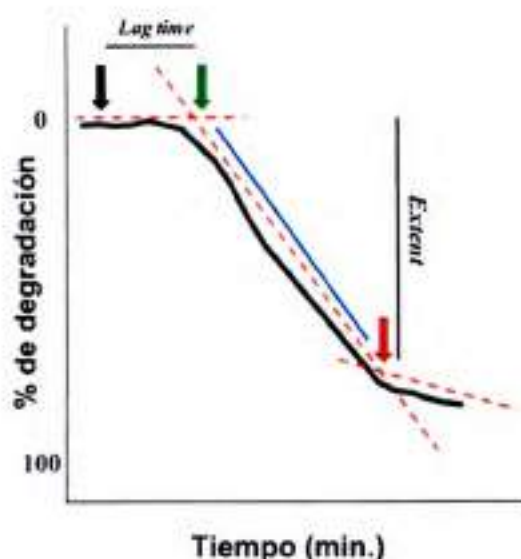


Figura 2.11 Esquema de medición de actividad fosfolipasa en equipo monocapas.

Las concentraciones de enzima utilizadas en el ensayo para determinar la presión superficial óptima fueron $0,12 \text{ mg/mL}$ y $0,145 \text{ mg/mL}$ para GmsPLA₂-XIA-1 y GmsPLA₂-XIB-2, respectivamente. Para la curva de la actividad frente a la concentración de sustrato, las concentraciones de enzima utilizadas fueron entre $0,026 \text{ mg/mL}$ a $2,5 \text{ mg/mL}$ para GmsPLA₂-XIA-1 y entre $0,073 \text{ mg/mL}$ a $0,145 \text{ mg/mL}$ para GmsPLA₂-XIB-2. Todos los experimentos se realizaron por duplicado y los resultados fueron los valores medios \pm SD.

2.6.6 Efecto de auxinas sobre la actividad sPLA₂.

Para estudiar el efecto estimulador de las auxinas sobre la hidrólisis de lípidos llevada a cabo con diferentes sPLA₂s, se empleó la técnica de monocapas de Langmuir. Como sustrato se utilizó DLPC, que es un lípido de cadena media, que permite medir la actividad en tiempo real con una cinética de orden cero [169, 171], ya que la disminución del área de la monocapa a presión de superficie constante, se produce gracias a una rápida desorción de los productos de cadena media en la subfase acuosa después de la hidrólisis del sustrato.

Las monocapas de DLPC y DLPC/auxina (8:2) se obtuvieron de manera similar a lo mencionado más arriba, empleando como subfase tampón Tris-HCl 10 mM pH 8 conteniendo NaCl 100 mM y CaCl₂ 20 mM). Inicialmente, la monocapa se comprime

hasta que se alcanza una presión de superficie constante de $13 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. En este punto, la compresión se detiene y la monocapa se deja estabilizar hasta que el área molecular alcanza un valor constante, lo que significa que no hay fuga de lípido o lípido/auxina. Luego de la inyección de la enzima ($0,085 \mu\text{g}/\text{mL}$ de GmsPLA₂-XIA-1 y $0,148 \mu\text{g}/\text{mL}$ de GmsPLA₂-XIB-2 y $0,027 \mu\text{g}/\text{mL}$ de PLA₂ de páncreas) en la subfase del compartimiento de reacción, se registran los cambios en el área total de la monocapa con el tiempo a una presión de superficie constante. Mediante un ajuste por cuadrados mínimos lineal apropiado de los datos de la grafica de Área vs. Tiempo registrado se determinó la actividad expresada como: $\text{molécula}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Dado que no conocemos la cantidad exacta de enzima activa presente en la muestra directamente involucrada en la catálisis, no llamaremos a la actividad como actividad específica sino como actividad enzimática aparente. Todos los experimentos se realizaron por duplicado y los resultados fueron los valores medios \pm SD.

2.7 Estimación de lipofilicidad de auxinas en base a la estructura química.

Log P es una herramienta del programa ACD/ChemSketch versión 14.01 (de ACD, Advanced Chemistry Development Inc., ACD/Labs, Toronto, ON, Canadá, 2013) el cual es un servidor on line (www.acdlabs.com) que se empleó para realizar la predicción de la lipofilicidad de moléculas no ionizadas.

P o **Kow**, es el Coeficiente de partición octanol/agua. **Kow** es una constante que provee una medida de la naturaleza lipofílica de compuestos orgánicos y está basada en la distribución de un compuesto neutro entre dos solventes o fases inmiscibles. La partición en octanol/agua es uno de los sistemas de solventes más usados para comparar lipofilicidad ya que aporta una aproximación acerca de la partición de determinados compuestos entre biomembranas y el fluido intra y extracelular. Es usado generalmente en forma logarítmica (Log P o Log Kow) como descriptor cuantitativo de lipofilicidad.

Un valor de Log Kow superior a 1 indica una relativa hidrofobicidad, mientras que por debajo de 1 indica relativa hidrofílicidad.

ANÁLISIS IN SILICO
DE $s\text{PLA}_{2s}$ DE *GLYCINE*
MAX

*"Todo lo que hacen los seres vivos
puede ser entendido a través de los
saltos y contorsiones de los átomos".*

Richard Feynman (1963)

CAPÍTULO 3. ESTUDIOS *IN SILICO* DE PLA₂

3.1 Marco General

Al inicio de este trabajo de Tesis ninguna proteína sPLA₂ de *Glycine max* había sido investigada en detalle a nivel bioquímico y estructural. Si bien en estudios previos realizados en el laboratorio del Dr. Ricardo Madoery (Facultad de Ciencias Agropecuarias) se detectó actividad PLA₂ en extracto de semillas de soja, la misma no pudo ser obtenida en su forma "pura" a los fines de determinar su identidad. Estos datos, sumados a que no se había descifrado hasta ese momento el genoma de soja, llevaron a la realización de un análisis bioinformático exhaustivo con el objeto de determinar las posibles secuencias de genes que codifican para sPLA₂s en soja. Esto permitiría en un futuro poder contar con las proteínas recombinantes, las cuales serían objeto de estudio más adelante en esta Tesis.

En este capítulo, se describe la realización de la búsqueda de posibles genes que codifiquen para sPLA₂s empleando herramientas bioinformáticas "*in silico*" y el análisis de las secuencias con el objeto de hallar las diferencias y similitudes a nivel de dominios así como llevar a cabo un análisis comparativo para dar respuesta a algunas de las hipótesis planteadas.

Además se realizaron estudios mediante dinámica molecular a los fines de determinar la estructura 3D de una de las GmsPLA₂s, la influencia del calcio en la estabilidad estructural, los aminoácidos que están involucrados en el reconocimiento interfacial ("*i-face*") y preferencia por interfases.

La búsqueda bioinformática llevada a cabo, y que dio lugar al hallazgo de 5 genes putativos que codificarían para sPLA₂ funcionales, fue esencial para el uso de la reacción de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) a los fines de poder amplificar los genes que codifican para las sPLA₂ de *Glycine max*, en vectores de clonado y expresión, con el objeto de obtener las proteínas para luego caracterizarlas en detalle, como se verá más adelante en los capítulos 4, 5, 6 y 7 de este trabajo de Tesis.

3.2 Resultados y Discusión

3.2.1 Búsqueda e identificación de genes putativos para sPLA₂ de *Glycine max*

Se realizó una búsqueda en una base local TBLASTN conteniendo la base de datos de ARNm de *Glycine max* y se obtuvieron las secuencias nucleotídicas de las sPLA₂ putativas (sPLA₂s). Para realizar la búsqueda, se empleó como templatado a las

secuencias publicadas previamente para *Arabidopsis*, AtsPLA₂-α y AtsPLA₂-β (Uniprot ID: Q8S8N6 y Q8GZB4, respectivamente), ya que es la planta modelo más simple de estudiar dado que fue la primera en conocerse su genoma, y por ende de la que mayor información se conoce hasta el momento. La búsqueda permitió identificar cinco isoformas de sPLA₂s en soja, las cuales fueron denotadas como GmsPLA₂-XIA-1, GmsPLA₂-XIA-2, GmsPLA₂-XIB-1, GmsPLA₂-XIB-2 y GmsPLA₂-XIB-3 (GenBank ID: BT092274, BT094641, BT095220, BT091171 y BT099163, respectivamente). En la **Tabla 3.1** se observa la lista con los nombres y números de acceso a los que corresponde cada transcripto en la base de datos de <http://www.plantgdb.org/GmGDB/>.

Tabla 3.1 Resultados arrojados por la búsqueda de secuencias nucleotídicas.

<i>GmsPLA₂</i>	Número de acceso
<i>GmsPLA₂-XIA-1</i>	<i>PUT-169a-Glycine_max-254404PlantGDB-assembled Unique Transcript</i>
<i>GmsPLA₂-XIA-2</i>	<i>PUT-169a-Glycine_max-223767PlantGDB-assembled Unique Transcript</i>
<i>GmsPLA₂-XIB-1</i>	<i>PUT-169a-Glycine_max-27105#PlantGDB-assembled Unique Transcript</i>
<i>GmsPLA₂-XIB-2</i>	<i>PUT-169a-Glycine_max-206710#PlantGDB-assembled Unique Transcript</i>
<i>GmsPLA₂-XIB-3</i>	<i>PUT-169a-Glycine_max-51521#PlantGDB-assembled Unique Transcript</i>

Cabe aclarar que los genes hallados coincidieron, 3 meses más tarde, con ARNm putativos hallados en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information), ingresados por investigadores del JCVI (Instituto J. Craig Venter) quienes participaron, entre otros, en el secuenciamiento del genoma de soja, por lo que los números de acceso son los que corresponden a cada secuencia anotada.

3.2.2 Análisis de las secuencias sPLA₂s de *Glycine max*.

La longitud completa de las secuencias de ADNc halladas para cada uno de los cinco genes sPLA₂s putativos de soja se encontró que fue de: 789 (GmsPLA₂-XIA-1), 875 (GmsPLA₂-XIA-2), 826 (GmsPLA₂-XIB-1), 762 (GmsPLA₂-XIB-2), 821 (GmsPLA₂-XIB-3) nucleótidos, con marcos de lectura abiertos (ORF) que consistían en 417, 417, 474, 471, y 477 nucleótidos que codifican proteínas de 138, 138, 157, 156, y 158 aminoácidos para GmsPLA₂-XIA-1,-2 y GmsPLA₂-XIB-1, -2, y -3, respectivamente, (incluyendo el péptido señal). Se observó que los genes que codifican para GmsPLA₂-XIA-1 y GmsPLA₂-XIB-1 se encuentran en el cromosoma I, GmsPLA₂-XIA-2 y

GmsPLA₂-XIB-2 se localizan en el cromosoma VII y el gen de GmsPLA₂-XIB-3 en el cromosoma VIII (**Figura 3.1**). Aunque GmsPLA₂-XIB-1, -2 y -3 tienen 3 intrones y 4 exones, los genes de GmsPLA₂-XIA-1 y -2 tienen 2 intrones y 3 exones, respectivamente (**Figura 3.1**). Estos hechos indican que durante el curso de los acontecimientos que se sucedieron en la evolución podría haber ocurrido divergencia y duplicación.

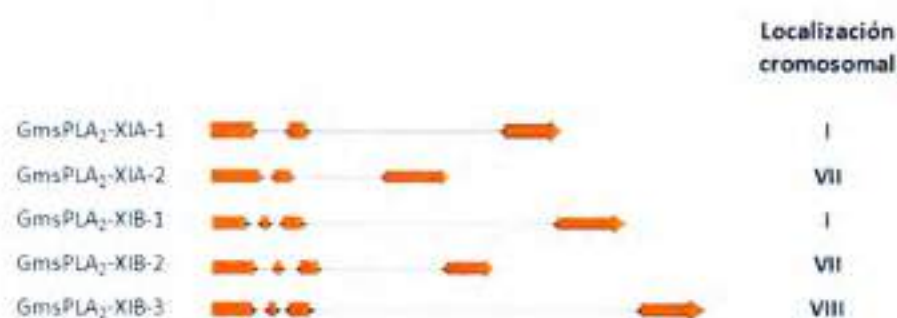


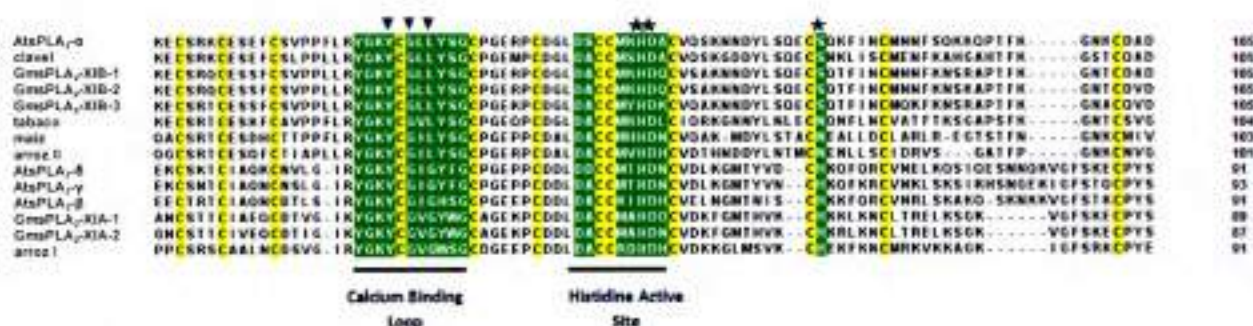
Figura 3.1. Representación de los genes de GmsPLA₂. Las cajas indican los exones y las líneas los intrones.

La comparación entre las secuencias de aminoácidos de estas nuevas GmsPLA₂s con otras sPLA₂s de plantas conocidas hasta el momento, indicó la presencia de motivos conservados de aminoácidos entre ellas. Todas las secuencias de GmsPLA₂s que se encontraron en soja tienen un *dominio PA2c* (**Figura 1.4 y 3.2A**) que contiene el sitio de unión a Ca²⁺ y el motivo del sitio activo que contiene el par His/Asp altamente conservado [172] y que corresponden a la posición 49 y 50 en GmsPLA₂-XIA-1 y GmsPLA₂-XIB-2, respectivamente.

Sin embargo, hay una diferencia que sigue siendo poco clara en el caso de la díada catalítica His/Asp de sPLA₂s de plantas en comparación a lo que se conoce en sPLA₂s de animales [66]. Si bien se ha propuesto que moléculas de agua asisten en la coordinación del Ca²⁺ en el sitio activo compuesto por His48 y Asp49 en la sPLA₂ pancreática bovina [173], y que el papel de Asp99 en esta sPLA₂ [174, 175] y Asp64 en la sPLA₂ de veneno de abeja podría participar en el modelo catalítico llamado “hidroxilo-imidazol-carboxilato” [176], esto no parece estar conservado en las sPLA₂ de plantas. Éste residuo catalítico importante se encuentra sustituido por un residuo His o Asn en las enzimas del grupo XIA y por una Ser o Asp en enzimas que pertenecen al grupo de XIB [66] como se muestra en el alineamiento (**Figura 3.2A**). Mansfeld y col. demostraron que Ser, Asn o His en sPLA₂s de plantas podrían adoptar el rol catalítico asignado a Asp en sPLA₂s de

animales [66]. A pesar que al comparar las secuencias de aminoácidos se observa una baja homología, tanto el sitio catalítico como el sitio de unión a Ca^{2+} están conservados (Figura 3.2B). Otros residuos relevantes dentro del sitio de unión a Ca^{2+} son dos Tyr y dos Gly que participan en la red de enlaces de hidrógeno y que se sabe están conservados ya sea en sPLA₂s de animales como de plantas [20].

A



B



Figura 3.2. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las sPLA₂s de plantas reportadas incluyendo las secuencias halladas en *Glycine max*. (A) El alineamiento se realizó utilizando el programa Clustal X (versión 1.64b) y editado con el programa Jalview. Los triángulos denotan los residuos de aminoácidos involucrados en la unión de calcio y las estrellas denotan los residuos de aminoácidos posiblemente involucrados en la catálisis. En amarillo están marcados los residuos de cisteínas. (B) Sequence logo (<http://weblogo.brekeley.edu>) de los motivos conservados de sPLA₂s de plantas. La altura de cada letra es proporcional a su frecuencia. La altura de la pila de aminoácidos (stack) entera (eje y) se ajustó para que signifique el contenido de información de las secuencias en la posición (medida en bits). El eje x representa a las 41 posiciones (correspondientes desde las posiciones en el alineamiento del 31 al 41) de los dominios más conservados (sitio activo His, sitio de unión a Ca^{2+}).

Las proteínas maduras contienen 12 residuos cisteína conservados que mantienen las mismas posiciones en todas las sPLA₂s de plantas [66] (Figura 3.2A) y pueden formar seis puentes disulfuro estructurales. La His (posición 49 tanto para GmsPLA₂-XIA-1 como para GmsPLA₂-XIB-2 (Figura 3.2A) se sugirió que podría desempeñar un papel crucial en el ataque nucleofílico del enlace *sn*-2 del glicerofosfolípido como se ha observado para otras sPLA₂s conocidas hasta el momento [2, 26, 78].

La existencia de péptidos señal en el extremo N-terminal de estas proteínas refuerza la naturaleza secretora de estas enzimas, como se sugirió para otras sPLA₂s de

plantas [20, 38, 66]. La posible existencia y potenciales posiciones de escisión de los péptidos señal del N-terminal en las sPLA₂s putativas presentes en *Glycine max* se predijeron mediante el uso de la herramienta *SignalP* disponible online en la web. El análisis informático sugirió que la secuencia señal que precede los aminoácidos N-terminal de la enzima madura contienen 24, 25, 29, 28 y 30 residuos de largo, dando lugar a una proteína madura de 114, 115, 128, 128, y 128 aminoácidos, y cuyas masas moleculares deducidos son 12,3 kDa, 12,6 kDa, 13,9 kDa, 13,9 kDa, 14 kDa, para GmsPLA₂-XIA-1, GmsPLA₂-XIA-2, GmsPLA₂-XIB-1, GmsPLA₂-XIB-2 y GmsPLA₂-XIB-3, respectivamente.

El punto isoeléctrico estimado (*pI*) para cada enzima putativa se ha calculado con la herramienta *ProtParam*. Los valores obtenidos fueron 6,93, 7,42, 5,76, 5,76 y 6,78 para GmsPLA₂-XIA-1 y -2, GmsPLA₂-XIB-1, -2 y -3, respectivamente. Como se puede observar, cuatro de las sPLA₂s putativas son más bien ácidas o neutras (GmsPLA₂-XIA-1, GmsPLA₂-XIB-1, -2 y -3), como es el caso reportado para la sPLA₂ aislada de veneno de *Bothrops diporus* (ex-neuwiedii) [177-179], algunas sPLA₂s de la subfamilia *Crotalinae* [180] y sPLA₂s de arroz (isoforma I y III) [20]. Por otro lado, el *pI* observado para GmsPLA₂-XIA-2 es ligeramente alcalino, similar al de todas las sPLA₂s halladas en *Arabidopsis* [20]. Las sPLA₂s de clavel y tomate [20] mostraron también tener un *pI* casi neutro. El papel funcional de los *pIs* en las diferentes sPLA₂s claramente no ha sido dilucidado todavía.

3.2.3. El análisis filogenético y la clasificación de las isoformas GmsPLA₂

Con la idea de conocer la clasificación de las nuevas isoformas halladas en *Glycine max* dentro de la superfamilia de las sPLA₂s de plantas, todas las secuencias de sPLA₂s de plantas conocidas hasta el momento fueron alineadas utilizando el programa Clustal X con el fin de determinar el grado de similitud e identidad. Al comparar los datos, se observó una estrecha relación evolutiva entre las sPLA₂s provenientes de diferentes plantas. Las Figuras 3.2A y 3.2B muestran las partes más importantes del alineamiento de las secuencias seleccionadas reportadas para plantas. Para determinar si las sPLA₂s de *Glycine max* pueden asignarse a los grupos XIA u XIB existentes, se analizó el alineamiento basado en similitudes de las catorce secuencias de aminoácidos de proteínas identificadas recientemente como sPLA₂s en seis especies de plantas, con el fin de proponer el árbol filogenético. Tales secuencias fueron seleccionadas manualmente a partir de la bibliografía (véase Experimental, sección 2.2.1.4.1).

El análisis mostró que las enzimas sPLA₂s de *Glycine max* se clasificaron en dos grupos distintos, según la clasificación realizada por Six y Dennis [2]. De acuerdo con el sistema de numeración de la superfamilia PLA₂ [2, 23, 78] estas categorías se corresponden a los subgrupos XIA y XIB. GmsPLA₂-XIB-1, -2 y -3 pertenecen al grupo XIB, junto con AtsPLA₂- α , isoforma II de la PLA₂ de arroz, clavel, tabaco y maíz. Por otro lado, GmsPLA₂-XIA-1 y -2 se encuentran formando parte del grupo XIA, que incluye AtsPLA₂- γ , AtsPLA₂- β , AtsPLA₂- δ e isoforma I de arroz (Figura 3.3).

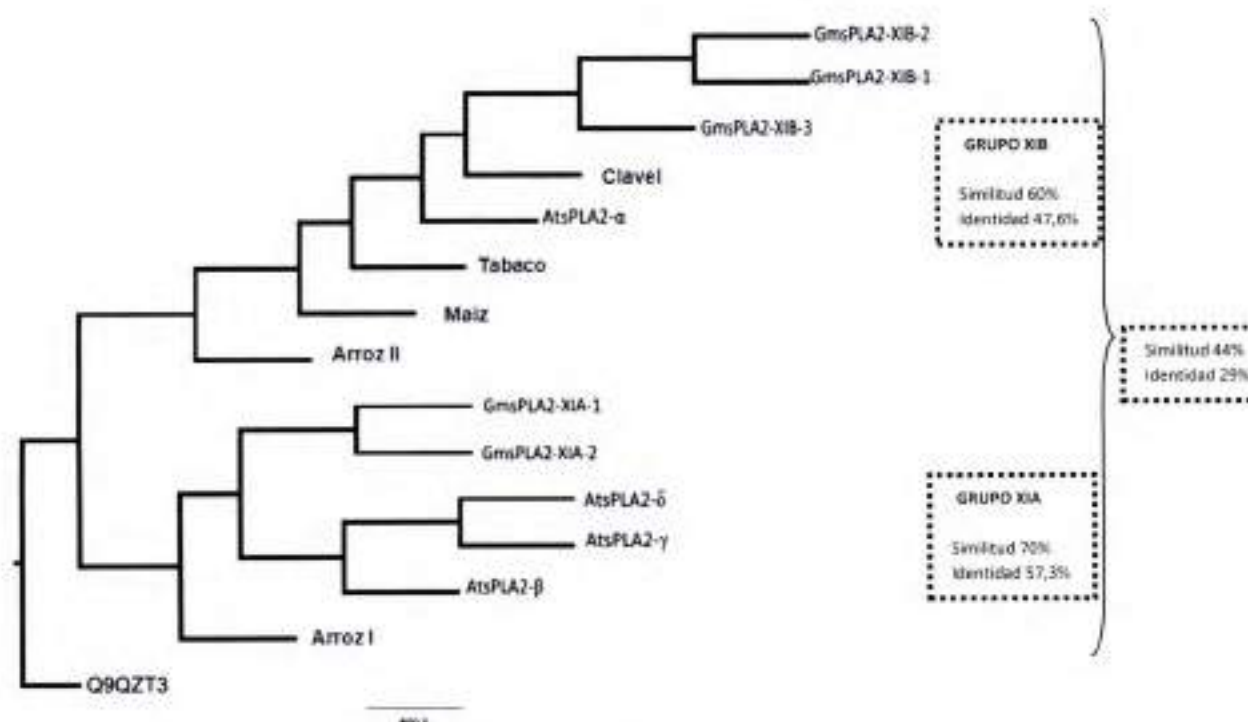


Figura 3.3 Árbol Filogenético de la superfamilia sPLA₂ incluyendo a las nuevas GmsPLA₂s de *Glycine max*. Se observa la distribución de todas las sPLA₂s de plantas dentro de la superfamilia. Las secuencias y sus respectivos números de accesos (ID) de Genbank de proteínas son los siguientes: clavel (AF064732), maíz (EU968759), isoforma -I (AJ238116) y -II (AJ238117) de arroz, isoformas - α (AY136317), - β (AF541915), - γ (AY148346) y - δ (AY148447) de *Arabidopsis* y tabaco (AB190177). Para las isoformas de *Glycine max* son: GmsPLA₂-XIA-1 (ACU165230), GmsPLA₂-XIA-2 (ACU18951), GmsPLA₂-XIB-1 (ACU19490), GmsPLA₂-XIB-2 (ACU15282), GmsPLA₂-XIB-3 (ACU24341). Como raíz se empleó una PLA₂ de rata (Q9QZT3).

Como fue descrito por Mansfeld y col. [66], las enzimas de estos subgrupos difieren en el tercer aminoácido que coordina al Ca²⁺, siendo un residuo Gly en esa posición para las enzimas del subgrupo XIA y un residuo Leu para las enzimas del subgrupo XIB (Figura 3.2A). Como se mencionó anteriormente, la díada catalítica

His/Asp que se encuentra en sPLA₂s de animales no se encuentra en plantas. En lugar del residuo Asp adicional de la díada situado aguas arriba del par conservado His/Asp, las enzimas de las plantas que pertenecen al grupo de XIA contienen un residuo His o Asn, y las enzimas de grupo XIB contienen un residuo Ser o Asn [66], como se mencionó anteriormente. El rol biológico/funcional de estas diferencias halladas sobre las propiedades catalíticas concernientes a la especificidad por lípidos (ya sea por diferencias sutiles en la afinidad por un lípido con una cabeza polar o cadena hidrófoba de la posición *sn*-2) o empatía especial para un estado físico en particular en el sustrato de lípidos organizado, en comparación con lo informado para sPLA₂s de animales, aun no ha sido dilucidado en plantas.

Al comparar el grado de identidad entre las secuencias de aminoácidos completa de las sPLA₂s dentro de cada grupo, se observó que el mismo es de aproximadamente 47,6% y 57,3% para el grupo XIA y XIB, respectivamente; mientras que la identidad entre los dos subgrupos es de alrededor del 29%, lo cual justifica la subdivisión en estos dos grupos. El grado de similitud entre las secuencias de aminoácidos más alta se observó al comparar GmsPLA₂-XIA-1 y GmsPLA₂-XIA-2, siendo del 94,9%. Entre GmsPLA₂-XIB-1 y GmsPLA₂-XIB-2 el grado de similitud fue de aproximadamente 93,6%. En la **Tabla 3.2**, se puede observar el grado de identidad entre las diferentes isoformas de sPLA₂s presentes en *Glycine max*. Todos los cálculos de identidad se realizaron empleando las secuencias de las proteínas maduras.

Tabla 3.2 Grado de identidad existente entre las isoformas sPLA₂ halladas en *Glycine max* expresado en %.

	GmsPLA ₂ -XIB-1	GmsPLA ₂ -XIB-2	GmsPLA ₂ -XIB-3	GmsPLA ₂ -XIA-1	GmsPLA ₂ -XIA-2
GmsPLA ₂ -XIB-1		93,6	80,4	28,3	28,8
GmsPLA ₂ -XIB-2			79,7	28,5	28,3
GmsPLA ₂ -XIB-3				28,8	29,2
GmsPLA ₂ -XIA-1					94,9
GmsPLA ₂ -XIA-2					

3.2.4 Modelado por homología de GmsPLA₂-XIA-1

La secuencia de aminoácidos de una proteína (estructura primaria), determina únicamente una estructura de la proteína en su ambiente nativo. El conocimiento de esta estructura es vital para entender la función de la misma. Las estructuras de las proteínas

contienen más información que las secuencias y están más conservadas a lo largo de la evolución. Es decir, dos proteínas que tienen secuencias similares no necesariamente comparten la misma función, pero si esas proteínas tienen la misma estructura seguramente tendrán la misma función (o similar). En la técnica denominada modelado por homología, la información procedente de las estructuras conocidas se usa para reconstruir modelos aproximados de secuencias similares, es decir, para predecir la estructura de una proteína una vez conocida la estructura de una proteína homóloga. Esta es, actualmente, la única vía para predecir estructuras de proteínas de una manera fiable cuando se ve dificultada su cristalización, como es el caso de las sPLA₂s.

Con el fin de conocer la estructura 3D de GmsPLA₂-XIA-1 y obtener información adicional referente a la importancia del calcio para mantener la estabilidad de la estructura, la preferencia por una determina interfaz y conocer los aminoácidos que conforman la "i-face", se recurrió al modelado por homología y la dinámica molecular.

<i>GmsPLA₂-XIA-1</i>	25	S	DQANCSTICI	AEQCDTV- GI	KYGKYGCVGY	WGCAGEKPCD
<i>2wg7A</i>	2	NIGDLLG-A	KDGGCSRTCE	SQFCTIAPLL	RYGKYCGILY	SGCPGERPCD
<i>GmsPLA₂-XIA-1</i>				S S	S S S	
<i>2wg7A</i>			S S	S S	S S S	
<i>GmsPLA₂-XIA-1</i>	65	DLDACCMAHD	DCYDKF- - GM	THVKCHKKLN	NCLTRELKSG	KVGF5- KECP
<i>2wg7A</i>	53	ALDACCMEVD	HCVDTHTDDY	LNTMCNENLL	SCIDRVS - - -	GATFPGNKCN
<i>GmsPLA₂-XIA-1</i>		hhhhhhhhhh	hhhh	hhhhhhhh	hhh	
<i>2wg7A</i>		hhhhhhhhhh	hhhh	hhhhhhhh	hhh	
<i>GmsPLA₂-XIA-1</i>	112	YSRAAFTMIR	GMDLAILLSQ	L - - - -		
<i>2wg7A</i>	100	YGGTASYVRG	VIEAVFVAGK	ILHKRD		
<i>GmsPLA₂-XIA-1</i>		hhhhhhhhhh	hhhhhhhhhh	h		
<i>2wg7A</i>		hhhhhhhhhh	hhhhhhhhhh	hhhh		

Figura 3.4 Alineamiento de *GmsPLA₂-XIA-1* y isoforma II de la sPLA₂ de arroz. Con "h" se indica los aminoácidos que seguramente formaran hélices y con "s" los que formarán estructuras tipo bucles.

Al carecer nuestro laboratorio de los conocimientos acerca del manejo de las técnicas y del equipamiento requerido, los experimentos de las secciones que se mencionan a continuación se realizaron en colaboración con el Dr. Marcos Villareal (Departamento de Matemática y Física de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC), quien cuenta con los conocimientos, la experiencia y los equipos necesarios para poder realizar los análisis pertinentes.

Para conocer la estructura 3D de GmsPLA₂-XIA-1 se empleó como template la estructura de sPLA₂s de arroz "*Oryza sativa*" (ID: 2wg7A), ya que al compararlas la identidad de secuencia que comparten es del 34% con un e-value de 6.40 e-40. En la **Figura 3.4** se muestra el alineamiento.

Como se puede observar en la **Figura 3.5**, la superposición de las estructuras terciarias de las sPLA₂s de arroz y GmsPLA₂-XIA-1 obtenida mediante modelado por homología está muy bien conservada en las regiones que son esenciales para la actividad catalítica.

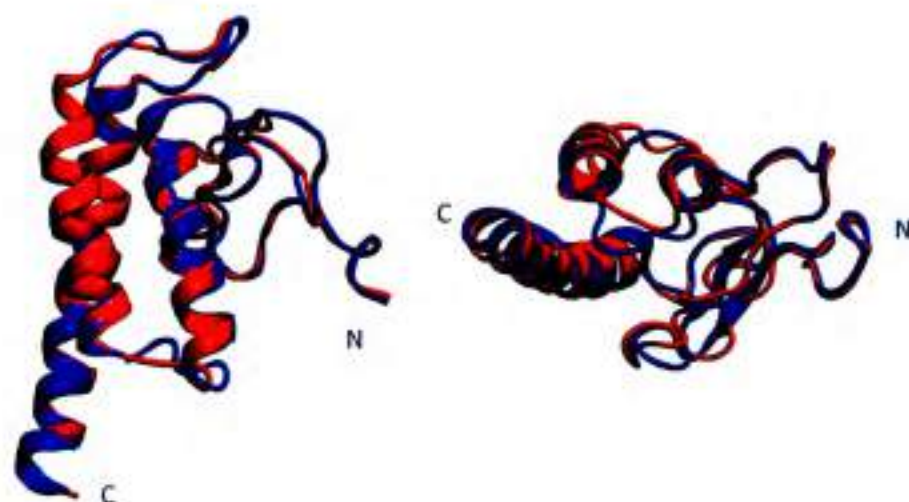


Figura 3.5 Comparación entre el template y la estructura modelada. Las vistas de frente y de perfil de las proteínas de arroz (modelada en azul PDB ID: 2wg7A) y soja GmsPLA₂-XIA-1 (modelada en rojo). Este modelado es la estructura de comienzo para las simulaciones de Dinámica Molecular.

Cabe aclarar que solo se ha realizado el Modelado por Homología y la Dinámica Molecular para GmsPLA₂-XIA-1, por lo que no se llevarán a cabo análisis comparativos de las estructuras, los aminoácidos que conforman la "*i-face*", ni estabilidad por calcio ni preferencia por interfaz para ambas enzimas.

3.2.4.1 Dinámica molecular de GmsPLA₂-XIA-1 en agua

Con el fin de refinar el modelo obtenido mediante el modelado por homología y tener una idea de la dinámica estructural de la proteína, se realizaron simulaciones de dinámica molecular de la secuencia madura completa de la proteína GmsPLA₂-XIA-1. La estrategia que se empleó consistió en realizar simulaciones aplicando dos campos de fuerza diferentes. Cada corrida con cada campo de fuerza se inició con un set de velocidades iniciales diferentes. Esta estrategia no es comúnmente empleada, por lo que

se dará una breve explicación del por qué su aplicación en este trabajo de Tesis. Como no existe un estándar de oro en los campos de fuerza, se decidió utilizar dos opciones diferentes y obtener una imagen consenso a partir de las simulaciones. La repetición empleando diferentes "semillas" nos ayuda a explorar el espacio conformacional alrededor de la estructura inicial de forma más eficiente que lo que se lograría con una sola corrida larga con el mismo tiempo adicionado [181].

El promedio en la desviación media de la raíz cuadrada (RMSD) para las cuatro simulaciones del C_{α} de la estructura inicial se muestra en la **Figura 3.6**. Las curvas para las corridas individuales se muestran en la **Figura 3.7**. En tres de las cuatro simulaciones, la proteína permanece dentro de los 0,22 - 0,29 nm de la estructura inicial. Estos valores se obtienen por lo general cuando se simulan las proteínas derivadas de datos experimentales de RMN o rayos X. Teniendo en cuenta estos resultados se puede decir que el modelo obtenido es un buen modelo de la proteína.

En la **Figura 3.7** se observa que una de las simulaciones realizadas con el campo de fuerza AMBER, comienza a aumentar la RMSD cerca de 50 ns y alcanza un valor de casi 0,44 nm. Una observación más fina de esta trayectoria muestra que en este punto el Ca^{+2} se pierde de la proteína. Esto indicaría que el Ca^{+2} juega un papel fundamental en el mantenimiento de la proteína en estado plegado en su estructura nativa. Por esta razón se decidió estudiar más a fondo el efecto del Ca^{+2} . Teniendo en cuenta que el Ca^{+2} se pierde, en los cálculos que subsiguieron sólo se tuvo en cuenta los primeros 50 ns de esta simulación.

La **Figura 3.8** muestra la fluctuación media de la raíz cuadrada (RMSF) de los C_{α} , que es un indicador de la flexibilidad del esqueleto de la proteína. La curva muestra la media ponderada de las cuatro simulaciones de la holo proteína, e indica que las regiones más móviles son el N- y C-terminal, seguido de los bucles en los residuos 74-85, 53-62, 34-37 de GmsPLA₂-XIA-1. Estos bucles conectan las dos últimas α -hélices, la primera con la segunda hélice, y la última hoja- β con la primera hélice. En la **Figura 3.9** se muestran las curvas individuales de RMSF. Los datos demuestran que no hay grandes diferencias entre las corridas y los campos de fuerza, lo que indica que la flexibilidad que se infirió es robusta y muy probable.

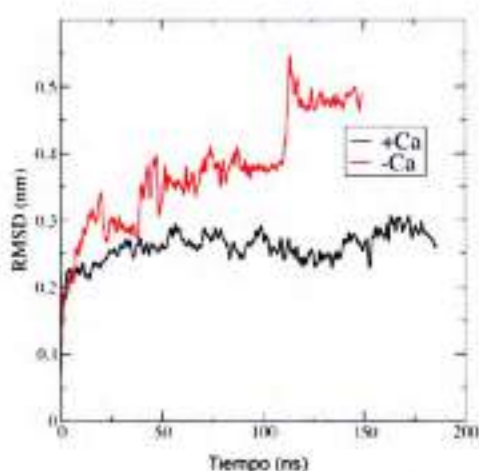


Figura 3.6 Desviación de la raíz cuadrada media (RMSD) del C α de la estructura inicial de GmsPLA $_2$ -XIA-1. La curva negra es el promedio de las cuatro corridas de la proteína con Ca $^{2+}$, mientras que la curva roja corresponde a la media de las dos corridas de la proteína sin el Ca $^{2+}$.

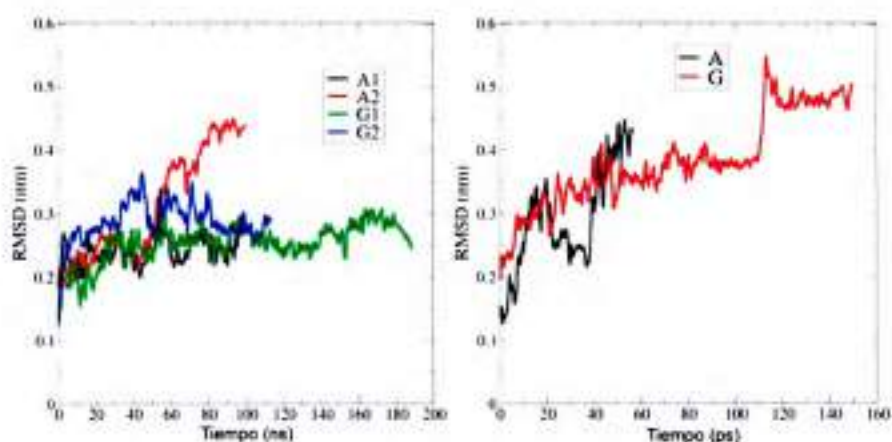


Figura 3.7 Desviación de la raíz cuadrada media (RMSD) para las simulaciones individuales con iones Ca $^{2+}$ (izquierda) y sin ellos (a la derecha) en el sitio activo. Las curvas marcadas con la letra A son simulaciones con el campo de fuerza Amber99SB, mientras que la etiqueta G son para las simulaciones con el campo de fuerza Gromos53a6. Cabe mencionar que la segunda repetición con el campo de fuerza Amber (curva A2 en rojo) perdió el Ca $^{2+}$ a 50 ns.

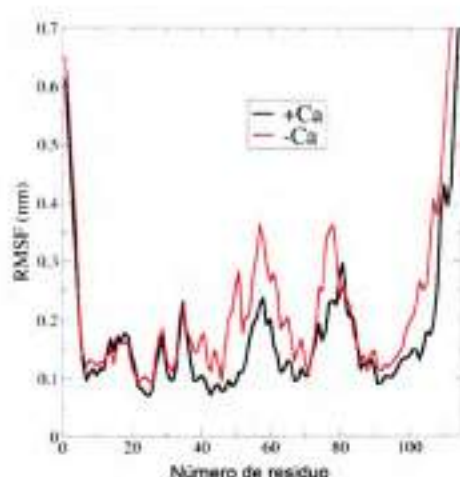


Figura 3.8 Raíz cuadrada media de las fluctuaciones de los C^{α} (RMSF). La curva en negro es la media ponderada de las cuatro corridas de la GmsPLA₂-XIA-1 en presencia de Ca^{2+} , mientras que la curva roja corresponde a la media ponderada de las dos corridas de la proteína sin iones Ca^{2+} . Las curvas rmsf individuales se muestran en la **Figura 3.9**.

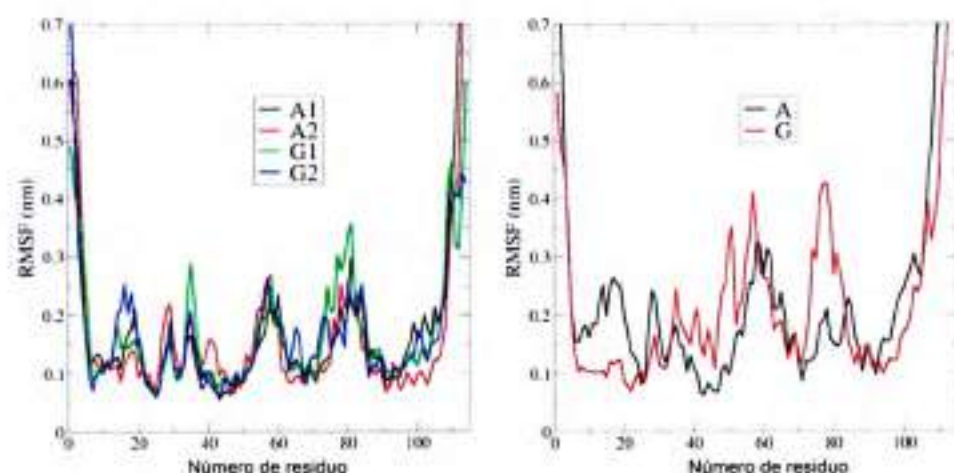


Figura 3.9 Raíz cuadrada media de las fluctuaciones de los C^{α} (RMSF). RMSF para las simulaciones individuales con iones Ca^{2+} (izquierda) y sin ella (a la derecha) en el sitio activo. Las curvas marcadas con la letra A son simulaciones con el campo de fuerza Amber99SB, mientras que la etiqueta G son para las simulaciones con el campo de fuerza Gromos53a6. Sólo se consideran los primeros 50 ns de simulación.

La **Tabla 3.3** muestra el promedio ponderado de la estructura secundaria de la proteína GmsPLA₂-XIA-1. Al igual que otras sPLA₂s de plantas, la estructura secundaria es principalmente α -hélice, con sólo una pequeña porción en hoja- β . También hay abundantes regiones donde se observan giros- β y curvas. En este aspecto estructural se observaron diferencias entre los resultados obtenidos por los diferentes campos de fuerza empleados. El campo de fuerza AMBER da consistentemente un mayor contenido de α -hélice, mientras que para GROMOS hay menos residuos con estructuras secundarias y se

incrementa el número de curvas. La diferencia en el número de residuos en α -hélice entre los dos campos de fuerza se centra principalmente en la hélice terminal, en la que el campo de fuerza AMBER retiene más la estructura inicial que es completamente helicoidal. Dado el bajo número de contactos con el resto de la proteína y la alta exposición al agua de esta hélice terminal, es posible plantear que esta hélice no sea tan estable como las otras y sufra más transiciones a las estructuras tipo ovillo. Por lo tanto, los resultados obtenidos con el campo de fuerza GROMOS son más prometedores. Sin embargo, consistentemente, estas diferencias entre los campos de fuerza son pequeñas ya que representan sólo el 5%.

Tabla 3.3 Estructura secundaria^a de la proteína GmsPLA₂-XIA-1 en presencia (+Ca²⁺) y ausencia (-Ca²⁺) de calcio en el sitio activo.

		+Ca ²⁺	-Ca ²⁺
Helix	(Hélice)	47	44
Turn	(Giro)	13	16
Bend	(Dobléz)	20	18
Beta bridge	(Puente β)	3	2
Beta sheet	(Hoja β)	4	6
Coil	(Ovillo)	27	28

^a la estructura secundaria fue calculada con el programa DSSP.

Con el fin de analizar la estructura terciaria de la proteína GmsPLA₂-XIA-1 se realizó un reclutamiento de las estructuras muestreadas en todas las trayectorias [182]. En este análisis, las estructuras fueron agrupadas por similitud medida por el rmsd, el cual se estableció en 0,2 nm para este caso. El centro de los cuatro primeros grupos se muestra en la **Figura 3.10**. Juntos, estos cuatro grupos representan el 97% de las estructuras muestreadas. Las principales diferencias que se observaron entre los centros de los grupos se encontraron principalmente en los residuos 99 a 114 (últimos residuos de la tercera α -hélice) y los residuos 74-85 (el bucle que une las dos últimas α -hélices). El grupo principal que incluye a un 42% de la población tiene los últimos 7 residuos en ovillo al azar. Estos residuos están en α -hélice completa en la estructura inicial, así como en la estructura cristalina de la sPLA₂ de arroz. El segundo grupo, con un 29% de la población, también ha perdido la α -hélice en el mismo segmento de la última α -hélice, y muestra un punto de quiebre en esta α -hélice que ocurre en el residuo 99. Este quiebre puede deberse a la presencia de un residuo Gly en la posición 98, que es conocido por su baja helicidad intrínseca (o alta flexibilidad conformacional). En el tercer grupo (con una población del

16%) la α -hélice terminal se forma completamente. El cuarto grupo tiene los residuos terminales en una conformación similar a la del primer grupo, pero tiene una conformación diferente que comprende los residuos 74-85. Esta observación indica que la α -hélice terminal es más bien una región dinámica y tiene tres conformaciones principales, una totalmente helicoidal, otra con los últimos siete residuos en ovillo al azar y la tercera con un quiebre más un ovillo al azar. Como se señaló anteriormente, este comportamiento puede atribuirse al número bajo de contactos de esta región, su gran área expuesta al solvente, y la presencia del residuo flexible Gly98.

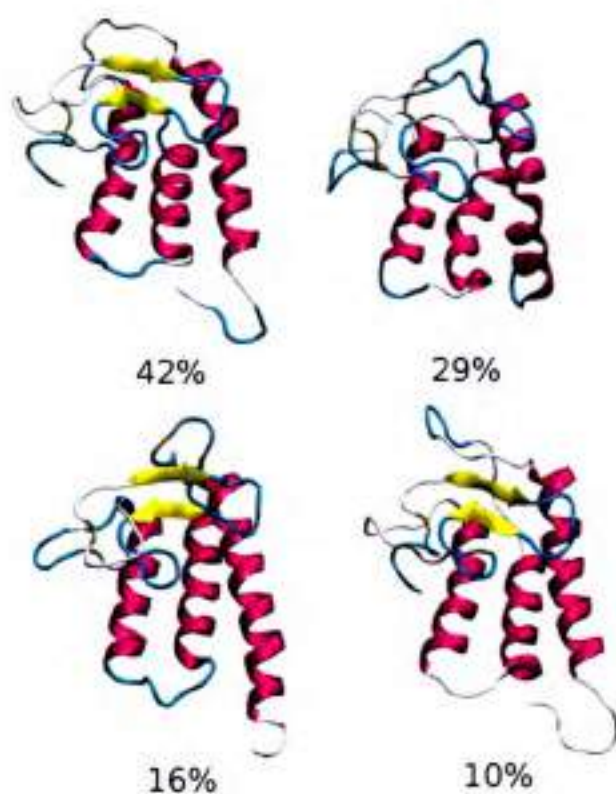


Figura 3.10 Centros de los grupos que se encuentran utilizando un límite de corte de 0,2 RMSD nm. Las α -hélices se muestran en magenta, las hojas- β en amarillo, los giros en celeste, y los residuos en la ovillo son de color blanco. Las figuras se han generado mediante el uso del programa de VMD. Los porcentajes representan la distribución de las posibles conformaciones en la dinámica de la población muestreada.

El sitio activo de la proteína contiene un ión Ca^{2+} que comúnmente se encuentra presente en otras sPLA₂s de plantas [45, 66]. El ion Ca^{2+} es un cofactor esencial en el mecanismo de catálisis llevado a cabo por estas enzimas y es un requisito para la actividad de la misma. En GmsPLA₂-XIA-1, el ión Ca^{2+} es coordinado por los carbonilos del esqueleto de Tyr25, Gly27 y Tyr30 (Figura 3.11). El carboxilo

de la cadena lateral del Asp50 junto con tres moléculas de agua completa la coordinación del ión Ca^{+2} . Una de las moléculas de agua hace un puente entre el ión Ca^{+2} y la His49. El residuo His49 es conocido por ser parte del sitio catalítico de todas las sPLA₂s conocidas independientemente si son provenientes de animales o de plantas, y se localiza en una cavidad que es accesible desde la “*i-face*”, mediando desde allí la hidrólisis del sustrato. El par His/Asp constituye el centro activo y el bucle de unión al calcio es esencial para el funcionamiento apropiado de la enzima [65]. Todas las sPLA₂s catalizan la hidrólisis a través del mismo mecanismo de donación de un protón de una molécula de agua seguido del ataque nucleófilo sobre el enlace *sn*-2 del glicerofosfolípido. Una molécula de agua se activa por la presencia de la diada His/Asp con dependencia absoluta de la coordinación del ion Ca^{2+} [78, 183]. Esto se correlaciona con el mecanismo catalítico propuesto llamado “mecanismo de Ca^{+2} coordinado por un oxianión” [184], en donde están implicadas dos moléculas de agua. Estas dos moléculas de agua presentes en la estructura rodeando el sitio de unión de Ca^{+2} , sugieren que es esencial que una molécula de agua pueda unirse al sitio activo His a través de la reorientación y la activación en el mecanismo catalítico. La segunda molécula de agua parece estar implicada en el mecanismo catalítico, conectando el agua que coordina el Ca^{2+} con la His del sitio activo. En la **Figura 3.12** se muestra el número de contactos entre el ión Ca^{+2} y la cadena lateral de la proteína para las simulaciones individuales.



Figura 3.11 Sitio activo de la GmsPLA₂-XIA-1. El esqueleto de la proteína se muestra en dibujos animados. El ion de calcio está en verde, y los residuos 25-31 y 46-51 están en palos. También hay tres moléculas de agua que coordinan al ion Ca²⁺.

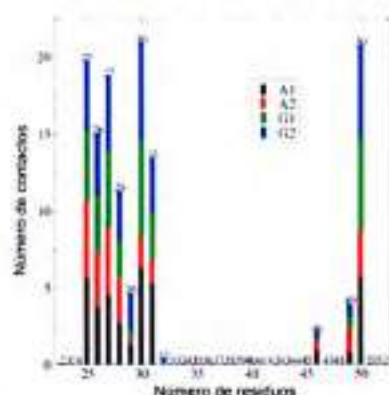


Figura 3.12 Número de contactos entre el ión calcio y los residuos de cadenas laterales. Un contacto se define si un átomo de la cadena lateral se halla a una distancia por debajo de 0,5 nm del ion de Ca²⁺. El número en cada barra indica el número de residuos.

3.2.4.2 Dinámica Molecular en ausencia de ion calcio

Con el fin de evaluar el efecto del ion Ca²⁺ en la estabilidad de la estructura de la proteína, se realizaron simulaciones de la GmsPLA₂-XIA-1 en ausencia de este catión en el sitio activo, observándose una desviación de la estructura con respecto al modelo inicial, como se muestra claramente en la **Figura 3.6**. Además, se observó que las fluctuaciones de los C_α, son más pronunciadas (**Figura 3.8**). Este aumento en la flexibilidad es más evidente en la α-hélice terminal y los bucles que conectan las α-hélice. La proteína está estrechamente conectada por una red de puentes disulfuro, ya que contiene seis puentes disulfuros que conectan las cisteínas 6-33, 10-39, 15-86, 26-46, 45-70 y 52-63. La posición y el número de residuos de cisteína se observó que están conservadas tanto para las sPLA₂s de plantas (**Figura 3.3A**) como para las de animales. Luego de esta observación, se podría concluir diciendo que las cisteínas son importantes tanto para la estabilidad estructural de la enzima como para la actividad. Como la mayoría de los residuos que participan en estos puentes disulfuro están entre los primeros 50 aminoácidos de la secuencia de la proteína, esta región se ve menos afectada por la ausencia de Ca²⁺ (**Figura 3.8**), siendo la estructura secundaria la que se ve ligeramente afectada por la eliminación de Ca²⁺ (**Tabla 3.3**). Que la proteína retenga una porción mayor de la estructura secundaria después de la eliminación de los iones de Ca²⁺ puede ser debido al alto número de puentes disulfuro que estabilizan la estructura nativa como ya se ha mencionado, o también se podría simplemente pensar que el tiempo que dura la simulación no fue lo suficientemente largo como para observar un desplegamiento

completo. Teniendo en cuenta todos los datos, los resultados de las simulaciones indicarían que el ion Ca^{2+} juega un rol importante no sólo en el ciclo catalítico, sino también en la flexibilidad general de la estructura nativa. Este hallazgo está sostenido por la necesidad de la presencia de ion Ca^{2+} para lograr el plegamiento correcto (indicado por su actividad enzimática) observado en la proteína recombinante expresada (véase más abajo y Capítulo 4).

3.2.4.3 Fluorescencia intrínseca de triptófano de GmsPLA₂-XIA-1

Con el fin de demostrar aún más la importancia de la presencia del ion Ca^{2+} en la estructura de la proteína, se investigó el efecto de este catión empleando la fluorescencia intrínseca de la proteína como una medida indirecta de la compactación de la estructura terciaria de la misma. Se aprovechó la particularidad de que GmsPLA₂-XIA-1 tiene un único residuo Trp en el dominio de unión a Ca^{2+} en la posición 31 de su secuencia (**Figura 3.14**). La emisión de fluorescencia intrínseca del estado estacionario ya se ha utilizado para determinar los dominios más expuestos de las enzimas lipolíticas donde el Trp está involucrado [185]. Tanto la posición del espectro de emisión de fluorescencia de Trp como su intensidad son muy sensibles a las condiciones de entorno, como la exposición al solvente, presencia de atenuadores solubles o grupos vecinos [165]. El espectro de la enzima nativa indica que el residuo Trp se encuentra en un ambiente moderadamente hidrofóbico. Con la enzima en una conformación enzimática activa en presencia de 1 mM de Ca^{2+} , el máximo de emisión está centrado en 335 nm lo cual es indicativo de un entorno bastante menos expuesto al solvente acuoso del dominio en el que el Trp se encuentra localizado. Cuando se secuestra el calcio presente en el medio mediante la adición de EDTA, el máximo de emisión muestra un corrimiento a 337 nm y se observa una reducción de la intensidad de fluorescencia. En condiciones desnaturalizantes en presencia de una alta concentración de Gdn.HCl, el perfil de fluorescencia muestra el típico comportamiento del Trp en agua con un máximo de emisión a 352 nm (**Figura 3.13**).

El desplazamiento batocrómico del máximo de emisión de Trp sugiere un aumento de exposición de dicho residuo a un ambiente más polar. Además, se observó una disminución en la intensidad de la señal la cual puede estar causada por un decaimiento de la energía de transferencia desde los residuos Tyr al Trp (**Figura 3.14**).

En conclusión, se sugirió que el cambio de fluorescencia refleja la exposición de la proteína a un entorno más acuoso. Los datos de fluorescencia son indicativos de que el

Ca^{2+} induce un aumento en la compactación de la proteína como se demostró con el modelo obtenido mediante dinámica molecular en la sección anterior.

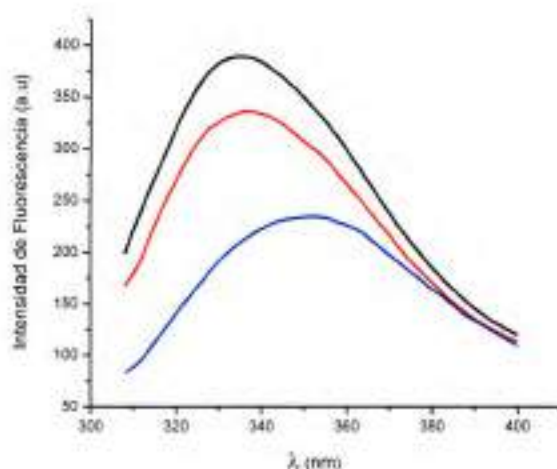


Figura 3.13 Efecto del Ca^{2+} sobre el espectro de emisión de fluorescencia del único residuo triptófano de GmsPLA₂-XIA-1. Línea negra, GmsPLA₂-XIA-1 activa y plegada con 1 mM Ca^{2+} . Línea roja, GmsPLA₂-XIA-1 equilibrada con 10 mM EDTA. Línea azul, GmsPLA₂-XIA-1 en condiciones desnaturizantes en presencia de 10 mM EDTA y 4M Gdn.HCl pH 8,5.

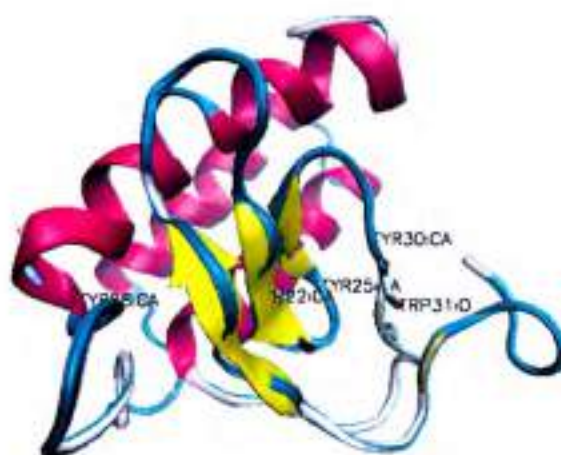


Figura 3.14 Representación de las Tyr 22, 25, 30 y 88, presentes en la estructura de la proteína GmsPLA₂-XIA-1 y su cercanía al Trp 31.

3.2.4.4 Dinámica Molecular en disolvente mixto

Con la finalidad de obtener una perspectiva putativa de la cara de la membrana de la proteína (la llamada "*i-face*"), se realizaron simulaciones de dinámica molecular de la proteína GmsPLA₂-XIA-1 en un disolvente que es una mezcla de agua con 30% de

alcohol isopropílico empleando el campo de fuerza GROMOS. La idea central del método es que las regiones de la proteína que se ponen en contacto con la membrana necesitan perder, total o parcialmente, la solvatación de las moléculas de agua con el fin de interactuar con una superficie más hidrófoba, tal como la interfaz de la membrana. Las regiones con una alta tendencia a desolvatarse pueden determinarse (spotted out) por el aumento en la concentración local de las moléculas de alcohol isopropílico en comparación con la mayor parte de disolvente en el seno de la solución. Este razonamiento es similar al utilizado en la detección de puntos calientes para la unión de fármacos a superficies de proteínas [186]. Con esto en mente, se realizó una simulación de 60 ns de la proteína en la mezcla de disolventes. Antes de calcular la densidad del isopropilo, la estabilidad de la proteína se controló mediante la medición de los RMSD, el RMSF, y el contenido de estructura secundaria. Todos estos parámetros mostraron que la estructura simulada en disolvente mixto se comporta de manera similar a la estructura en agua (Figura 3.15).

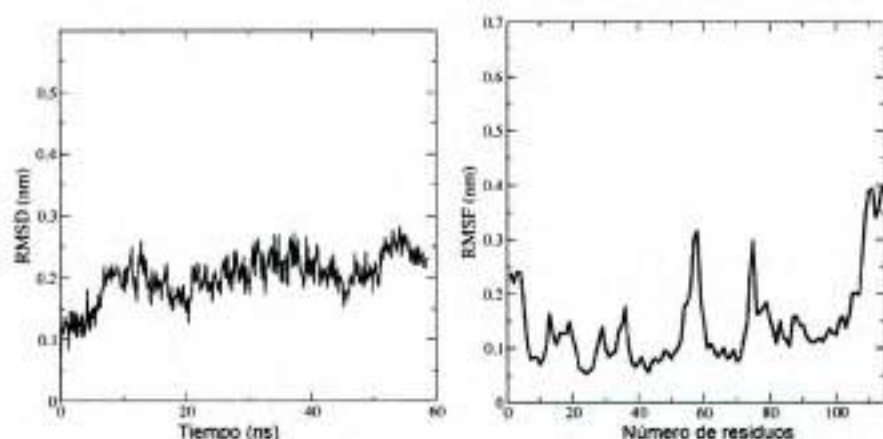


Figura 3.15 RMSD (izquierda) y RMSF (derecha) para la simulación de la proteína en mezcla de alcohol isopropílico-agua.

La Figura 3.16 muestra una isosuperficie de densidad igual a 10 veces la densidad media del alcohol isopropílico en el seno de la solución. En esta figura, se pueden distinguir dos parches diferentes, un parche delgado que está principalmente en la parte superior de la primera α -hélice y se corre hacia abajo del bucle en los residuos 74-85, y un parche grueso que rodea la α -hélice C-terminal. Este último parche directamente contacta con la His49 catalítica por lo que se lo propuso como la “*i-face*” de la membrana de la enzima. Los residuos que se encuentran en esta cara de la membrana son VAL18, GLY19, VAL28, HIS49, HIS64, LEU101, ALA102, ILE103, LEU104, LEU105 y LEU108. Hay que tener en cuenta que la mayoría de estos residuos son hidrofóbicos

como se esperaba que sea para una superficie de unión a la membrana, por lo que este constituiría un entorno hidrofóbico que rodearía al sitio activo. Las cadenas laterales hidrofóbicas de los residuos que putativamente están formando la "i-face" serían capaces de particionar al corazón hidrofóbico, lo que permite la unión interfacial de la enzima, excluyendo las moléculas de agua de la región que rodea al sitio activo lo que permitiría la difusión del sustrato al bolsillo del sitio activo para ser hidrolizado. Como se sabe, las sPLA₂s deben penetrar la interfaz de fosfolípido para poder ejercer su acción. Por lo tanto, la unión exitosa a la superficie agregada donde se ubica el sustrato es un requisito previo en el ciclo catalítico, y esta propiedad también puede determinar algunas características específicas de la actividad enzimática. Sin embargo, hay un número limitado de residuos cargados en la topografía plana de la "i-face" que podría modular adicionalmente la interacción con la interface del sustrato de una forma en la que aún no ha sido totalmente dilucidada [187].



Figura 3.16 Vista superior y lateral de la isosuperficie de densidad que equivale a diez veces el valor de la densidad del alcohol isopropílico. La proteína GmsPLA₂-XIA-1 se muestra en los dibujos animados con el mismo código de color que se empleó en la Figura 3.10. El ion calcio es de color verde y los residuos en el sitio catalítico se observan como palos.

3.3 Conclusiones

Los resultados de la búsqueda TBLASTN demostraron claramente la existencia de genes codificantes para cinco isoformas de sPLA₂s dentro del genoma de *Glycine max*. A pesar de poseer un nivel de identidad relativamente bajo entre las secuencias, el análisis

realizado comparando las mismas demostró que poseen residuos de aminoácidos conservados, al igual que las secuencias informadas para otras sPLA₂s de plantas. El motivo catalítico, el sitio de unión a Ca²⁺ y el dominio del sitio activo se mostraron conservados. Además, los estudios de alineamiento de secuencias mostraron la existencia de residuos conservados en las enzimas de plantas que están ausentes en sPLA₂s de animales. Sin embargo, la relación entre la estructura de la proteína y la modulación de la "calidad interfacial de la interfaz" en la actividad catalítica aún queda por ser dilucidada para las enzimas de plantas.

Las cinco sPLA₂s identificadas en *Glycine max* se agruparon consistentemente en dos categorías mediante análisis filogenético, el cual mostró claramente que se las puede agrupar junto a otras sPLA₂s de plantas en dos subgrupos llamados XIA y XIB basado en las diferencias en sus pesos moleculares y cambios en la secuencia primaria, especialmente en las regiones -N y -C terminal. Por otra parte, existen diferencias marcadas en los aminoácidos que son esenciales para la catálisis. El papel del residuo Asp en la díada His/Asp en sPLA₂s de animales que es responsable de la actividad catalítica, ha sido reemplazado por un residuo His o Asn en las GmsPLA₂-XIA-1 y -2, y por Ser o Asn en las GmsPLA₂-XIB-1, -2 y -3; la cual es una característica distintiva de las sPLA₂s procedentes de plantas.

Se construyó un modelo de la proteína GmsPLA₂-XIA-1 basado en homología a partir de la estructura conocida para la isoforma II de arroz (*Oryza sativa*), con el fin de dilucidar su estructura. Las simulaciones de dinámica, que llevaron un tiempo total de más de 700 ns, se llevaron a cabo en agua pura (en presencia o ausencia de Ca²⁺ en el sitio activo), y en una mezcla de alcohol isopropílico-agua. El plegamiento inicial se mantuvo globalmente, lo que sugiere que, efectivamente, la estructura de GmsPLA₂-XIA-1 es muy similar a la de la isoforma II de arroz. No obstante, se observó una flexibilidad conformacional en los últimos residuos de la hélice C-terminal. Es posible que tras la interacción con las membranas, se recupere el estado completamente helicoidal.

A pesar de estar altamente conectados por una red de seis puentes disulfuro, los datos de la dinámica molecular sugieren que la eliminación del ion Ca²⁺ del sitio de unión desestabiliza la estructura. La apoproteína es más flexible, pero sólo hay una ligera pérdida de la estructura secundaria.

Los datos de fluorescencia son indicativos de que el Ca²⁺ induce un aumento en la compactación de la proteína como se demostró mediante el modelo obtenido por dinámica molecular.

Las simulaciones realizadas empleando el disolvente mixto permitieron identificar los aminoácidos putativos de la “*i-face*”, la cual comprende los residuos *VAL18*, *GLY19*, *VamAL28*, *HIS49*, *HIS64*, *LEU101*, *ALA102*, *ILE103*, *LEU104*, *LEU105* y *LEU108* y contacta directamente con la His49 del sitio catalítico.

PROTEÍNAS RECOMBINANTES

*“No malgastar ideas claras
con proteínas impuras”*

Severo Ochoa

CAPITULO 4. PROTEÍNAS RECOMBINANTES: Clonado, expresión y purificación de sPLA₂s de Glycine max

4.1 Introducción

En el grupo de investigación del Dr. Madoery del Departamento de Fundamentación Biológica de la Facultad de Ciencias Agropecuarias (UNC), se realizaron purificaciones de extractos de semilla de soja encontrándose actividad de PLA₂, compatible con las características de secretoria. Luego de numerosos intentos en obtener la proteína pura hasta homogeneidad empleando diferentes métodos cromatográficos con el objeto de determinar su identidad, sumado a secuenciaciones de proteínas que no dieron resultados alentadores, se postuló la posible existencia de isoformas con las mismas masas moleculares que estarían impidiendo su secuenciación. En el capítulo 3 se menciona el hallazgo de 5 isoformas para sPLA₂ en soja, lo cual se correlaciona perfectamente con dicha suposición.

Estos hechos han sido en este trabajo de Tesis el motivo por el que se planteó obtener la proteína pura en forma "recombinante" mediante técnicas de biología molecular. Con el fin de obtener información funcional y estructural de estas nuevas fosfolipasas, seleccionamos GmsPLA₂-XIA-1 y GmsPLA₂-XIB-2 como representante de las isoformas identificadas ya que las mismas presentan sutiles diferencias en sus secuencias lo que podría llegar a traducirse en diferencias a nivel catalítico y de preferencia por sustrato.

En este capítulo se abordará el clonado, la expresión, la purificación y la secuenciación de estas dos proteínas recombinantes que serán más adelante estudiadas en detalle a nivel estructural y funcional en este trabajo de Tesis, con el objeto de caracterizarlas cinéticamente y determinar diferencias y similitudes a nivel funcional.

4.2 Resultados y discusión

En las siguientes secciones se describirán y discutirán los resultados de experimentos que fueron realizados con el objeto de obtener las enzimas GmsPLA₂s recombinantes funcionales, empleando técnicas de biología molecular (sistemas de clonado y expresión), expresión de proteínas en sistemas bacterianos y purificación de las mismas empleando cromatografía de afinidad por níquel.

4.2.1 Clonado de las proteínas recombinantes

4.2.1.1 Clonado de GmsPLA₂-XIA-1 y GmsPLA₂-XIB-2

Las isoformas de sPLA₂s presentes en el genoma de soja presentan similitudes unas con otras a nivel nucleotídico. Esta característica complica la amplificación de los genes a partir de ARNm obtenido a partir de semillas de soja. Por lo tanto, para poder proseguir con el clonado de las secuencias a los fines de obtener las proteínas correctas, en vez de usar ARNm como molde, se emplearon clones de los genes, los cuales han sido obtenidos y donados por investigadores del J. Craig Venter Institute (JCVI). La estrategia empleada para subclonar los productos en los vectores de clonado y de expresión se muestra en el Capítulo 2 Experimental sección 2.2.3.

Cabe destacar que la presencia de un residuo adicional en el extremo N-terminal de este tipo de enzimas puede modificar o incluso inhibir la actividad de la misma, por lo que un N-terminal nativo es necesario [145, 148, 188]. No obstante, si el residuo Met no es removido podrían observarse efectos de desorden de la estructura [189, 190] con pérdida de hasta el 90% de la actividad [142]. Así mismo, la aminopeptidasa de *E.coli* reduce su eficiencia para clivar la Met si el residuo adyacente a la metionina inicial es voluminoso, tal como ocurre con el Asn. Para sPLA₂s de plantas, se carece de esta información.

Para superar este potencial problema, se fusionó la enzima GmsPLA₂-XIA-1 y -XIB-2 con ubiquitina en el sistema de expresión PHUE. Este sistema está diseñado principalmente para obtener una proteína recombinante sin un residuo adicional en el extremo N-terminal y con un alto rendimiento de expresión, como se observó para algunas proteínas [156]. En nuestro caso a su vez permitió un alto rendimiento de expresión en cuerpos de inclusión. Por lo tanto, la secuencia de los genes que codifican para las proteínas maduras GmsPLA₂-XIA-1 y -XIB-2 se fusionó a la secuencia que codifica para ubiquitina en los sitios SacII y HindIII presentes en el vector PHUE (ver Experimental sección 2.2.3.1). Este motivo ubiquitina es luego removido eficientemente por una peptidasa que reconoce ubiquitina.

La peptidasa deubiquitinasa esta fusionada también a una colita de 6 His (6xHis-USP2cc), la cual permite que la misma sea removida de la muestra mediante cromatografía de afinidad por níquel luego de ser empleada, de manera que sólo obtengamos en la fracción eluida la proteína de interés.

4.2.1.2 Secuenciación de nucleótidos

La secuenciación de los nucleótidos, permitió corroborar que los productos de PCR insertados en ambos vectores, de clonado y expresión, se encuentran en la orientación correcta, es decir, que se insertaron con sus secuencias completas sin pérdida o agregado de nucleótidos y que no ocurrieron eventos de mutación.

La exactitud de las secuencias de nucleótidos de las construcciones: GmsPLA₂-XIA-1-pGemTeasy, GmsPLA₂-XIB-2-pGemTeasy, Ub-GmsPLA₂-XIA-1-PHUE y Ub-GmsPLA₂-XIB-2-PHUE se verificó mediante secuenciación de ADN (servicio contratado al centro de secuenciación de ADN de la Universidad de Chicago). Las secuencias se corresponden con las esperadas.

4.2.2 Expresión y purificación de GmsPLA₂s

Para obtener las proteínas recombinantes Ub-GmsPLA₂-XIA-1-PHUE y Ub-GmsPLA₂-XIB-2-PHUE se transformaron bacterias *E.coli* BL21 (DE3) con dichos constructos. La expresión de la proteína recombinante se logró induciendo mediante el agregado al medio de cultivo de IPTG. Las proteínas acumuladas en los cuerpos de inclusión se aislaron mediante solubilización en cloruro de guanidinio 8M (Gdn.HCl). En la **Figura 4.1** se puede observar en un gel de SDS-PAGE las proteínas obtenidas en los diferentes pasos de purificación hasta la liberación de las GmsPLA₂s de los cuerpos de inclusión. Los geles mostraron bandas similares para ambas proteínas (GmsPLA₂-XIA-1 196 aa y GmsPLA₂-XIB-2 210 aa).

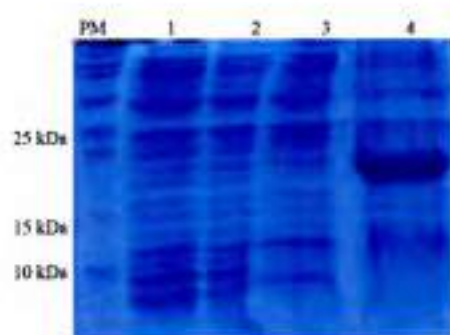


Figura 4.1 Gel SDS-PAGE 15% representativo de la obtención de GmsPLA₂s de cuerpos de inclusión. Proteínas liberadas en los sucesivos pasos de lavado realizados para obtener la enzima de los cuerpos de inclusión. Línea PM marcador de peso molecular, 1 (primer paso), 2 (lavado 1) y 3 (lavado 2) muestran proteínas liberadas en los sucesivos pasos de lavado. Línea 4 banda correspondiente a la proteína liberada de los cuerpos de inclusión luego del tratamiento con Gdn.HCl.

A pesar de observarse que la proteína es liberada de los cuerpos de inclusión casi pura, se requiere una primera etapa de purificación de las proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad por níquel en condiciones desnaturalizantes. Como se muestra en la **Figura 4.2A** (línea 1), a modo de ejemplo, se detectó una banda de aproximadamente 24 kDa en la mezcla la cual se asignó a las proteínas de fusión. La proteína madura se obtuvo casi pura (95%), luego de una segunda etapa de purificación por cromatografía de afinidad por níquel, previa digestión con USP2cc (ver sección 2.3.5.2). En la **Figura 4.2A** (línea 2) y **4.3A** (línea 2) se muestran las 3 bandas principales que se obtienen luego de la escisión con USP2cc. La banda de 24 kDa corresponde a la proteína de fusión, la banda de aproximadamente 13 kDa a la proteína recombinante y otra banda de aproximadamente 10 kDa a la ubiquitina (ver sección 2.3.5.2).

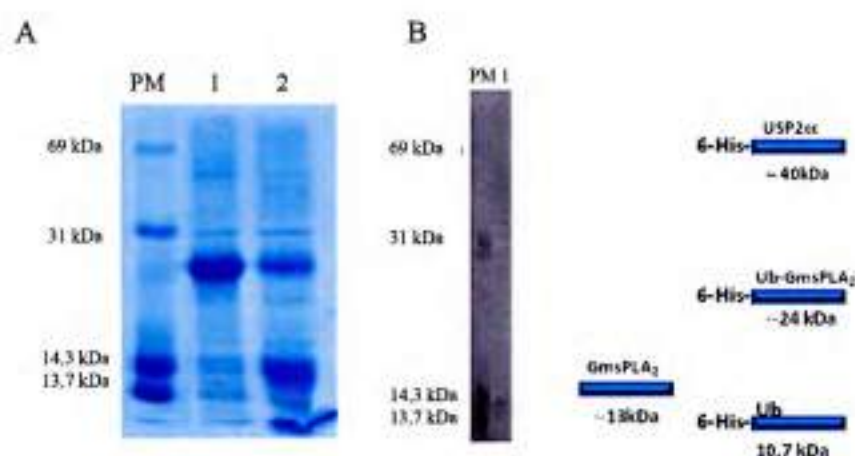


Figura 4.2 Purificación de *GmsPLA₂-XIA-1*. Análisis de **A)** SDS-PAGE de la purificación de la enzima *GmsPLA₂-XIA-1*. La primera línea de PM de la izquierda muestra los patrones de peso molecular del marcador de proteínas empleado; línea 1 muestra la proteína recombinante Poli-Histag ubiquitina-*GmsPLA₂-XIA-1* eluida de cuerpos de inclusión y sin tratamiento con peptidasa USP2cc; línea 2 muestra las proteínas liberadas (*GmsPLA₂-XIA-1* (PM 11,8 kDa) y la ubiquitina (PM 10 kDa)) al tratar la proteína recombinante (PM 24 kDa) con peptidasa USP2cc. **B)** SDS-PAGE que muestra la fracción correspondiente a la proteína recombinante que se purificó y eluyó por cromatografía de afinidad de níquel en la línea 1.

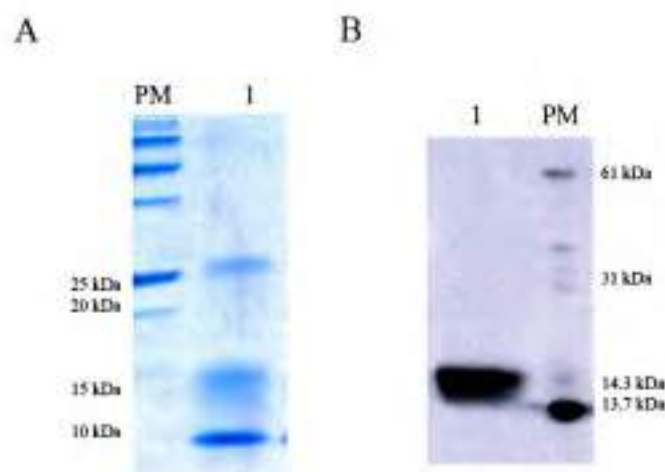


Figura 4.3 Purificación de *GmsPLA₂-XIB-2*. A) La primera línea corresponde al marcador de peso molecular y línea 1 bandas de proteínas obtenidas luego de la digestión con USP2cc. B) Línea 1 banda de aproximadamente 13 kDa correspondiente a la proteína purificada a partir de cromatografía de afinidad y línea 2 corresponde al marcador de peso molecular.

Las etapas de purificación se siguieron mediante un ensayo de medición indirecta de la actividad sPLA₂ por la aparición de halos en placas de PC de huevo-agar-sangre (ver sección 2.4.1), usando el buffer de renaturalización como control negativo, PLA₂ pancreática como control positivo y la proteína de fusión para demostrar que las proteínas son inactivas cuando la ubiquitina se encuentra presente delante del N-terminal de la sPLA₂ de interés (**Figura 4.4**). Las proteínas de fusión no mostraron actividad en ninguno de los sistemas ensayados, ya que la presencia de la Ub delante del N-terminal de la proteína hace que la misma pierda su actividad.

Para asegurar un correcto plegamiento de la proteína *GmsPLA₂-XIB-2*, el aminoácido Leu inmediatamente después del residuo final Gly situado en el extremo carboxi-terminal de Ub se mutó por una Ala, de acuerdo a lo que describió Othman y col. [188].

La renaturalización es dependiente de la composición del sistema redox que se utilice. El plegamiento óptimo se consiguió mediante diálisis de la proteína en buffer de renaturalización conteniendo Tris-HCl, cisteína y CaCl₂. La presencia de Ca²⁺ en todas las etapas de purificación fue completamente necesaria para el plegamiento correcto de la proteína con actividad enzimática.



Figura 4.4 Ensayo de Agar-Huevo (PC)-Sangre. 1- Buffer (control negativo), 2-50 μ L de sPLA₂-XIA-1, 3- 15 μ L de sPLA₂ pancreática, 4-15 μ L de sPLA₂-XIA-1, 5- Ub-sPLA₂-XIA-1(proteína de fusión).

4.2.2.1 Electroforesis SDS-PAGE

Mediante corrida electroforética de geles de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturizantes, se pudo aproximar la masa molecular de las enzimas y emplear esta técnica para seguir a las enzimas en los pasos de purificación por su masa molecular esperada. En las **figuras 4.2B y 4.3B** se puede observar que las GmsPLA₂s recombinantes purificadas (GmsPLA₂-XIA-1 y -XIB-2) mostraron bandas únicas de aproximadamente 14kDa y que se obtuvieron con un grado de pureza de aproximadamente el 95%.

La proteína ya purificada y activa se envió a secuenciar.

4.2.2.2 MASA y Secuenciación del N-terminal de GmsPLA₂-XIA-1 y -XIB-2

Previo a la secuenciación del N-terminal de las proteínas GmsPLA₂s recombinantes, se determinó la masa molecular de las mismas como se menciona en Experimental (sección 2.3.8) mediante HPLC semi-preparativa para confirmar que las muestras realmente presentan una única entidad.

El análisis de espectrometría de masas indicó que las mismas tienen una masa molecular de 12.363,7 Da (GmsPLA₂-XIA-1) y 13.852,1 Da (GmsPLA₂-XIB-2). Estos datos son consistentes con la masa molecular teórica calculada a partir de la secuencia que fue de 12,374 Da y 13,859 Da, para GmsPLA₂-XIA-1 y -XIB-2 respectivamente. Por lo tanto, los datos de espectrometría de masas coinciden con las masas moleculares esperadas.

Luego se realizó degradación de EDMAN con el objeto de conocer los primeros 10 aminoácidos del N-terminal de la proteína madura. La secuenciación N-terminal de los diez primeros residuos de las enzimas puras GmsPLA₂-XIA-1 y GmsPLA₂-XIB-2

permitió verificar que no hay aminoácidos extras en dicha región, lo que hubiese podido afectar la actividad enzimática según lo informado para algunas sPLA₂s recombinantes [188, 191]. La **Figura 4.4** muestra las porciones N-terminal en la secuencia completa para ambas GmsPLA₂s, donde subrayados se muestran los 10 primeros aminoácidos secuenciados.

GmsPLA₂-XIA-1

S D Q A N C S T T C I A E Q C D T V G I K Y G K Y C
 G V G Y W G C A G E K P C D D L D A C C M A H D
 D C V D K F G M T H V K C H K K L K N C L T R E L
 K S G K V G F S K E C P Y S R A A P T M I R G M D
 L A I L L S Q L G D S V P H '

GmsPLA₂-XIB-2

A N I G A E T T G V A V S V G K E C S R Q C E S S F C S V
 P P L L R Y G K Y C G L L Y S G C P G E R P C D G L D A C
 C M K H D Q C V S A K N N D Y L S Q E C S Q T F I N C M N
 N F K N S K A P T F K G N Y C D V D D V I E V I H V V M E A
 A L L A G R V L H K P '

Figura 4.4 Secuencia de las proteínas maduras de las GmsPLA₂s. Las letras subrayadas son los primeros 10 aminoácidos que fueron secuenciados.

4.3 Conclusión

En este Capítulo, dos de las GmsPLA₂s, GmsPLA₂-XIA-1 y GmsPLA₂-XIB-2, se han clonado, expresado en sus formas maduras y purificado exitosamente, obteniéndoselas con un 95% de pureza.

Ambas enzimas mostraron tener las masas moleculares y las secuencias aminoacídicas esperadas. Se corroboró que ambas enzimas no poseen aminoácidos extras en el extremo N-terminal que puedan disminuir o anular su actividad, por lo que las proteínas obtenidas serán empleadas para estudiar y caracterizar sus propiedades catalíticas, como se describe en los capítulos siguientes.

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE GmsPLA₂S

*“Comprender la diversidad no es complicado,
es ponerle ganas y entusiasmo. . .es entender
que cada uno de nosotros , aunque iguales
somos diferentes y eso nos hace
únicos, respetables, humanos e irrepetibles”.*

Marlén

CAPÍTULO 5. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ACTIVIDAD sPLA₂

5.1 Introducción

En los últimos años muchas sPLA₂s de plantas han sido purificadas, caracterizadas [20, 73], su estructura dilucidada [45, 66] y sus funciones celulares estudiadas [4, 36, 40]. No obstante, más información se requiere en comparación a todo lo que se sabe acerca de sPLA₂s de origen animal. Hasta el momento ninguna sPLA₂ de soja (*Glycine max*) ha sido estudiada detalladamente, por lo que es necesaria una caracterización completa de sus propiedades catalíticas.

El interés en estas sPLA₂s radica en su potencial uso biotecnológico como ya se ha mencionado, como biocatalizadores, ya que los lisoderivados producto de la hidrólisis son poderosos bioemulsificantes, más potentes que la lecitina. Sería importante contar con una enzima de origen vegetal como la soja, ya que tanto la enzima como el sustrato industrial (fosfolípidos de lecitina de soja) tendrían la misma procedencia. No obstante, a pesar de que estas nuevas enzimas podrían satisfacer los requerimientos que exigen las regulaciones de los alimentos conocidas como Kosher y Halal, al presente no hay reportes de sPLA₂s de plantas que puedan ser empleadas para tal aplicación. Las sPLA₂ de microbios siguen siendo aceptadas para tal fin, a pesar de que carecen de selectividad al promover la formación de productos secundarios (poseen actividad PLA₁ y lipasa). Sin embargo, cabe pensar que contar con una enzima de origen vegetal y altamente específica sería óptimo.

En este capítulo se abordará la caracterización de dos isoformas de sPLA₂s de *Glycine max*. Las características cinéticas de las GmsPLA₂s (XIA-1 y XIB-2), dado que éstas actúan en interfaces, se llevará a cabo empleando sistema de micelas mixtas. El objetivo se basó en determinar las condiciones óptimas para la catálisis, los parámetros cinéticos y establecer una relación entre las diferencias halladas en la actividad catalítica con las diferencias estructurales y secuenciales halladas, ya que podrían estar afectando de alguna manera esas condiciones óptimas o la preferencia para actuar sobre un sustrato u otro. Por otro lado, se determinó el modo de acción interfacial de la enzima sobre el sustrato a hidrolizar y el efecto del ión Ca²⁺ sobre la estabilidad térmica.

5.2 Resultados y discusión

5.2.1 Propiedades catalíticas de los GmsPLA₂s recombinantes

Las propiedades de las micelas dependen del largo de la cadena hidrocarbonada y grupo polar del fosfolípido, las condiciones de temperatura, pH y la presencia de otros solutos. El progreso de la reacción cuando se trabaja con fosfolípidos de cadena corta y en presencia de detergente es de pseudo orden cero.

Se utilizaron sistemas de micelas mixtas Tritón X-100:DLPC a los fines de uniformizar la forma de presentar al sustrato (ver sección 2.4).

Las propiedades catalíticas de GmsPLA₂-XIA-1 y -XIB-2 se investigaron con respecto al tiempo, pH, temperatura y requerimiento de calcio, con el fin de caracterizar las condiciones óptimas para la catálisis llevada a cabo por las enzimas.

5.2.1.1 Determinación de la condición de velocidad inicial.

La **Figura 5.1A** muestra la curva de ácidos grasos libres liberados vs. tiempo. A partir de estas curvas se estimaron las condiciones de velocidad inicial, verificándose que se cumplen tales condiciones hasta los 5 minutos del progreso de la hidrólisis.

5.2.1.2 Determinación de pH óptimo

Las sPLA₂ vegetales han sido clasificadas como grupo His catalítico [2]. Por esta razón, como tal residuo debe contener el nitrógeno con su par de electrones libres para formar el oxianión del estado de transición es que el pH de la solución tampón del medio de reacción debe ser neutro o ligeramente básico.

Mediante el empleo de micelas mixtas de DLPC:Tritón X-100 en presencia de calcio 10 mM como sustrato se determinó que el pH óptimo se encuentra entre 6 y 8 para GmsPLA₂-XIA-1 y entre 6 y 7 para GmsPLA₂-XIB-2, ambos con un óptimo alrededor de pH 7 (**Figura 5.1 B**). Estos resultados son muy similares a los encontrados para otras sPLA₂s provenientes de vegetales. Las sPLA₂s de tabaco y olmo tienen pH óptimos en el intervalo de 8-10 y 8-9, respectivamente [25, 31, 32, 37, 38, 72, 74, 192-195]. En *Arabidopsis* los rangos de pH óptimos para las actividades son de 6-11, 6-7, 7-9, y 8-9 para AtsPLA₂- α -, β -, γ -, y δ - respectivamente [20]. Una situación similar se encontró para casi todos los sPLA₂s de animales. El pH óptimo para sPLA₂ de páncreas es de 8 [196, 197] similar al reportado para veneno de abeja [198]. Para PLA₂ no pancreática humana el pH óptimo está entre 8-10 [199]. Cabe mencionar que diferentes sustratos se han utilizado para determinar el valor de pH óptimo de las diferentes sPLA₂s reportadas en la literatura.

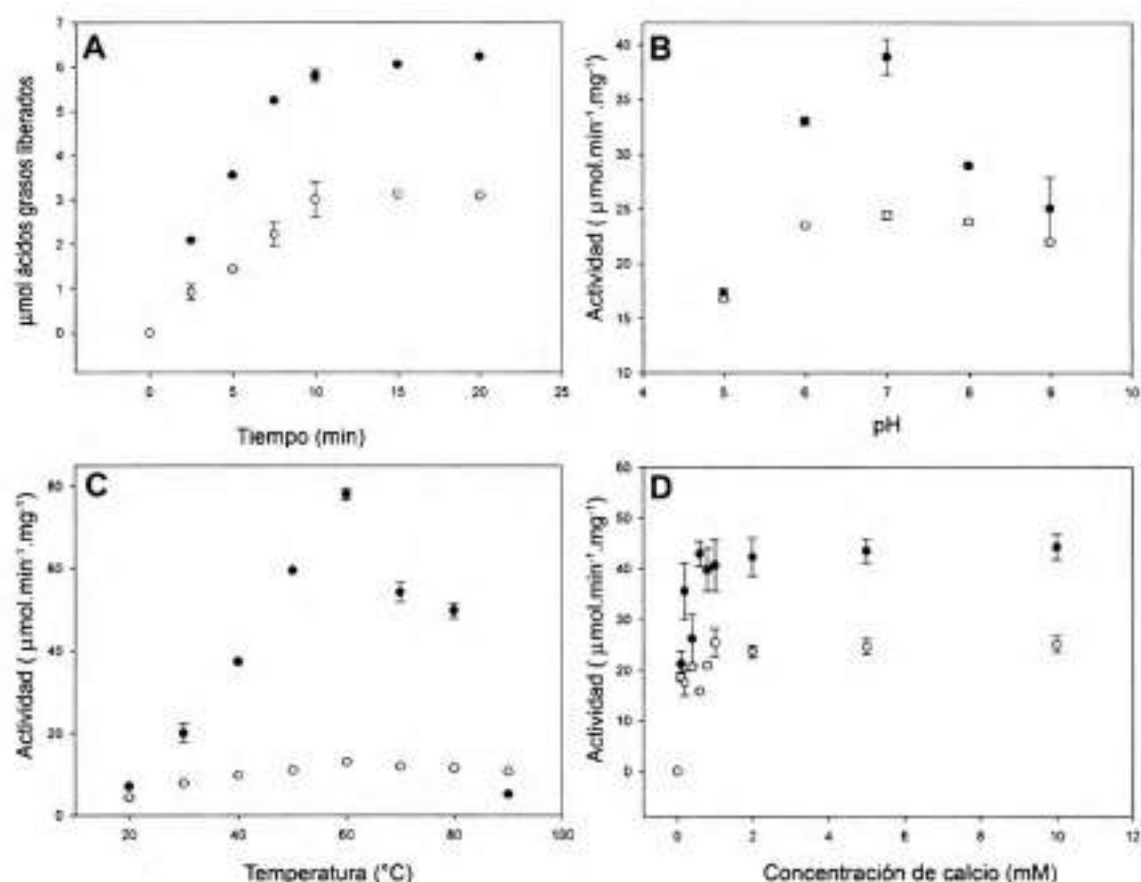


Figura 5.1 Parámetros cinéticos de las proteínas recombinantes sPLA₂s de *Glycine max*. **A)** Curva de tiempo de la hidrólisis de micelas mixtas de DLPC: Tritón X-100 llevada a cabo por GmsPLA₂-XIA-1 y -XIB-2. **B)** Dependencia de la actividad enzimática con el pH de ambas enzimas. **C)** Temperatura óptima para la catálisis de las GmsPLA₂s. **D)** Actividad hidrolítica de las enzimas GmsPLA₂s en función de la concentración de Ca²⁺. Círculos rellenos (●) corresponden a GmsPLA₂-XIB-2 y círculos vacíos (○) a GmsPLA₂-XIA-1.

5.2.1.3 Temperatura óptima

Ambas enzimas demostraron poseer una elevada estabilidad térmica, con valores óptimos de alrededor de 60°C (Figura 5.1C). Esto demuestra que estas enzimas son altamente resistentes a la desnaturalización con la temperatura, condición atribuible posiblemente a los 7 puentes disulfuro presentes en sus secuencias y que se postula que intervienen en la estabilidad de las sPLA₂s [200, 201]. La dependencia con la temperatura fue mayor para GmsPLA₂-XIB-2 en comparación con GmsPLA₂-XIA-1.

5.2.1.4 Concentración de ión calcio óptima

Las enzimas clasificadas dentro del grupo con residuo His en el sitio activo, son PLA₂ extracelulares, pequeñas con requerimiento milimolar de Ca²⁺. Estas enzimas tienen

adyacente al grupo His un residuo Asp que es el ligando del ión Ca²⁺, el cual forma el oxianión positivamente cargado que estabiliza el estado de transición negativamente cargado de la reacción de hidrólisis catalizada por PLA₂. Esta es la causa de la dependencia milimolar de calcio de estas sPLA₂s [2].

Para corroborar este hecho, se realizaron ensayos con agregado de concentraciones crecientes de Ca²⁺. La concentración óptima requerida de Ca²⁺ para la actividad de GmsPLA₂-XIA-1 y GmsPLA₂-XIB-2 se encuentra en el orden micromolar (menor a 1 mM) alcanzando un máximo de actividad con 0,5 mM de Ca²⁺, concentración a la que se encuentra saturada (**Figura 5.1D**). Este requerimiento de calcio micromolar es mas bien inusual para las enzimas sPLA₂s que en su mayoría poseen un requerimiento en el rango milimolar (de mayor concentración, entre 5-10 mM) [2]. El mismo comportamiento se observó para sPLA₂s de *Arabidopsis* AtsPLA₂-β, γ,-δ [20]. Es importante destacar que estas GmsPLA₂s no exhibieron actividad en ausencia de Ca²⁺, cuando a las muestras conteniendo la enzima se le adicionó EDTA en exceso, a fin de eliminar posibles trazas del mismo en el sistema de incubación. En contraste, para AtsPLA₂-α se observó que la actividad se ve incrementada con la concentración de calcio hasta alcanzar un plateau a 10 mM de ClCa₂ y la sPLA₂ de olmo exhibió una actividad óptima entre 10-15 mM [20, 31, 73]. Sin embargo, para alcanzar el 50% de la actividad máxima fue suficiente con 0,5 mM de ClCa₂, para estas dos enzimas. La actividad máxima para la sPLA₂ de tabaco se detectó por encima de una concentración de calcio 1 mM. Este comportamiento es similar al observado para la mayoría de las sPLA₂s animales, que requieren concentraciones milimolares de Ca²⁺ y no tienen actividad en su ausencia [20, 197].

5.2.1.5 Efecto de ión calcio en la estabilidad térmica de GmsPLA₂-XIA-1

Ya se mencionó en el Capítulo 3 la importancia de la presencia del ion Ca²⁺ para la estabilidad térmica de las sPLA₂ de *Glycine max*. En esta sección se demuestra que si la enzima es sometida a calor en ausencia de Ca²⁺ o en presencia de EDTA, se pierde la actividad a una temperatura de 60°C, incluso cuando el ion de Ca²⁺ se reincorpora al medio después del calentamiento (**Tabla 5.1**). Como se sugirió anteriormente a partir de la realización de experimentos de dinámica molecular y de fluorescencia (Capítulo 3), la presencia de ion Ca²⁺ tiene un rol clave en la preservación del plegamiento global nativo de GmsPLA₂-XIA-1 y por lo tanto para la conformación correcta para la lipólisis .

GmsPLA₂-XIB-2 también demostró ser resistente a las altas temperaturas (datos no mostrados) y mantener su actividad aún después de 5 minutos de ser calentada a 60°C. Sin embargo, no pudo corroborarse la importancia del calcio en la estabilidad de la misma empleando el método de fluorescencia como en el caso de GmsPLA₂-XIA-1, ya que carece de triptófanos en su secuencia. No obstante, deberíamos esperar que ambas tengan el mismo comportamiento debido al alto porcentaje de similitud entre sus secuencias.

Tabla 5.1 Efecto del ión Ca^{2+} en la estabilidad térmica de GmsPLA₂-XIA-1.

Condición de Incubación	Actividad residual (nmol/min.mg)
Ca^{2+} 5 mM	35,2 ± 2,2
Ca^{2+} 0 mM	0,0
EDTA 10 mM + Ca^{2+} 10 mM	0,0

5.2.1.6 Modo de la catálisis de GmsPLA₂-XIA-1

Para determinar si GmsPLA₂-XIA-1 actúa en micelas mixtas en el modo "hopping o saltatorio" o "scooting o adherido", se investigó el efecto de la concentración de sustrato (DLPC) sobre la actividad lipolítica como se observa en la gráfica de nmol de ácidos grasos liberados (**Figura 5.2**) vs. diferentes concentraciones del sustrato DLPC en micelas mixtas. Se registró un notorio aumento de actividad cuando a los quince minutos de transcurrida la reacción se observó en micelas mixtas que contenían 0,25 mM de DLPC después de que a los 10 minutos se adicionó 0,75 mM de sustrato DLPC (para lograr 1 mM de concentración final), lo que indica de manera inequívoca que la enzima fue capaz de "ver" el incremento de la concentración de sustrato. Este comportamiento es compatible con un modo de acción de catálisis saltatorio. La relación molar micelas/enzima es 232/1, condición que se vio que favorece un modo de catálisis adherida para sPLA₂ pancreática [1], sin embargo, en las condiciones ensayadas para la enzima de *Glycine max* se observó que tiende a actuar en el modo de catálisis saltatorio. La diferencia observada podría deberse a la capacidad de la enzima para saltar de una micela a otra bajo condiciones experimentales adecuadas como se menciona en [1].

Se sabe que cuando la relación de micelas/enzima es alta, la enzima que trabaja en modo adherido no es capaz de "ver" el sustrato recién agregado. Sin embargo, en tales condiciones experimentales y dependiendo del fosfolípido utilizado como sustrato, la calidad de los agregados lipídicos utilizados para el ensayo, el tipo de PLA₂ empleada y la

relación enzima/agregado, uno u otro modo de catálisis podría verse favorecido [69]. En general, las condiciones que favorecen la adsorción de la enzima a la micela/agregado llevarán a que la enzima actúe en el modo adherido, como es el caso de la sPLA₂ de páncreas actuando adsorbida sobre los agregados constituidos por fosfolípidos aniónicos. Contrariamente, si las condiciones experimentales se manipulan para interrumpir, de alguna manera, la interacción superficial entre la enzima y el sustrato/agregado, la hidrólisis tendrá lugar en el modo de "saltatorio" [1].

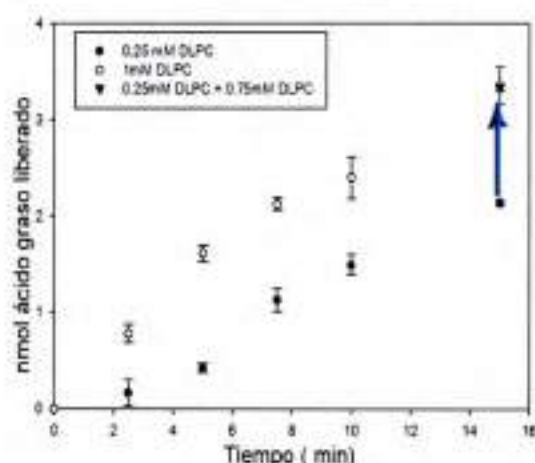


Figura 5.2 Estudio del modo de catálisis de GmsPLA₂-XIA-1. La flecha muestra el salto en la medición de la actividad a los 15 min, después de la adición a la micela que contiene 0,25 mM de DLPC de más micelas (0,75 mM de DLPC) para completar 1 mM DLPC micela a los 10 min de tiempo de reacción

Dado que entre ambas enzimas existe alto grado de homología, es de esperar que ambas tengan el mismo comportamiento, tendiendo ambas a trabajar bajo el modo saltatorio bajo las condiciones experimentales empleadas.

5.2.2 Los parámetros cinéticos de las GmsPLA₂s recombinantes.

Se estudió el efecto de la concentración de DLPC y DLPG sobre la velocidad de la reacción de hidrólisis llevada a cabo por GmsPLA₂-XIA-1 y -XIB-2, con el fin de obtener los parámetros cinéticos aparentes. En condiciones experimentales de velocidad inicial (consumo de sustrato inferior a 5 %), empleando solución tampón Tris-HCl (pH 8.5) conteniendo 5 mM CaCl₂ and 100 mM NaCl, los datos de velocidad inicial en función de la concentración para ambas isoformas GmsPLA₂s, produjeron gráficas hiperbólicas compatibles con una cinética de tipo michaeliana (**Figura 5.3**).

La actividad de GmsPLA₂-XIA-1 y -XIB-2 hacia micelas mixtas de DLPC/Tritón X-100 (relación molar 1:4), mostró una K_M aparente de 0,23 mM y 0,07 mM y una V_{MAX} de 10,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ y 19,7 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, respectivamente, (Figura 5.3 y Tabla 5.2). Cuando el sustrato presente en las micelas mixtas fue DLPG, la K_M aparente y V_{MAX} para ambas enzimas fueron 13,9 mM y 1,86 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ para GmsPLA₂-XIA-1 y 1,1 mM y 6,69 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ para GmsPLA₂-XIB-2.

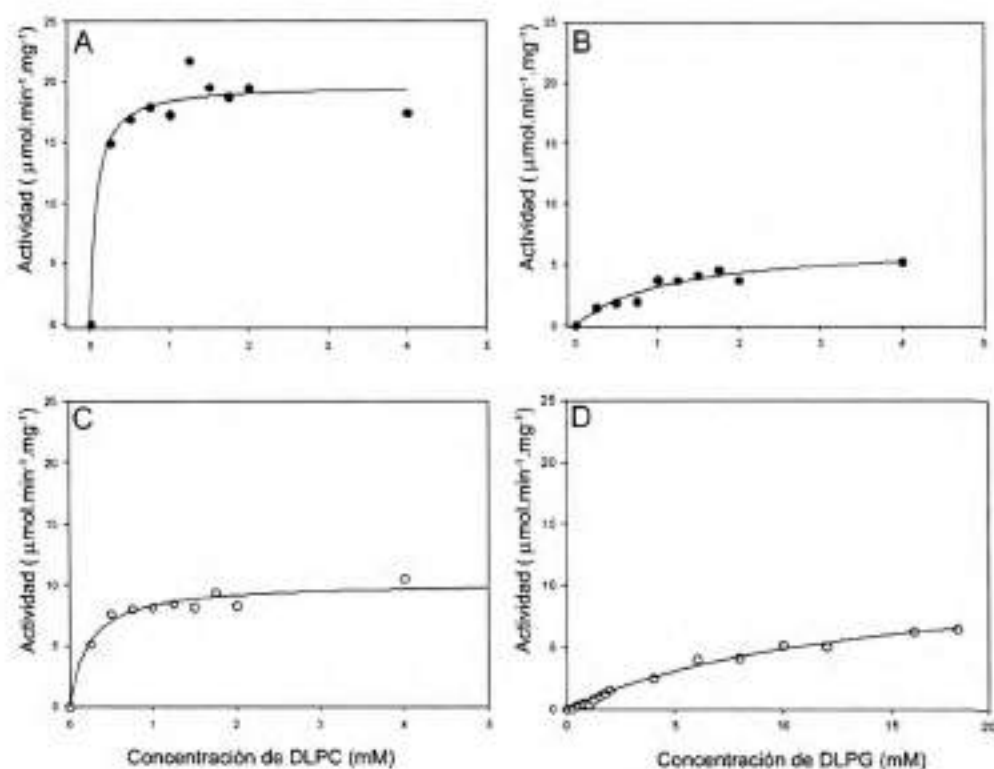


Figura 5.3 Parámetros cinéticos de GmsPLA₂-XIA-1 y -XIB-2 en micelas mixtas de lípidos: Tritón-X100 (relación 1:4). Dependencia de la velocidad inicial de hidrólisis con la concentración inicial de sustrato en presencia de NaCl 100mM. A, B) Velocidad inicial frente a la concentración de sustrato para GmsPLA₂-XIB-2 y C, D) Velocidad inicial vs. Concentración de sustrato para GmsPLA₂-XIA-1. Círculos rellenos (●) corresponden a GmsPLA₂-XIB-2 y círculos vacíos (○) a GmsPLA₂-XIA-1.

Tabla 5.2 Constantes aparentes de ambas sPLA₂s recombinantes de *Glycine max* cuando el sustrato es DLPC y DLPG en micelas mixtas en presencia de 100 mM NaCl.

Sustrato	GmsPLA ₂ -XIA-1			GmsPLA ₂ -XIB-2		
	K_M	V_{MAX}	V_{MAX}/K_M	K_M	V_{MAX}	V_{MAX}/K_M
DLPC	0,23 ± 0,05	10,21 ± 0,06	1.479,5	0,07 ± 0,06	19,71 ± 1,40	9.376,3
DLPG	17,98 ± 4,20	13,87 ± 1,87	25,7	1,13 ± 0,35	6,69 ± 0,89	197,3

Units: K_M , mM; V_{MAX} , $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$; V_{MAX}/K_M , $\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$.

Los valores de K_M aparentes obtenidos para las GmsPLA₂s utilizando fosfolípidos de cadena corta como sustrato no fueron marcadamente diferentes al compararlos con los obtenidos para sPLA₂s de animales [202] o para otras plantas [73], aunque se emplearon diferentes sistemas de sustrato. Los valores de K_M para las sPLA₂s animales caen entre 0,18 a 3,2 mM cuando se utilizó 1,2-dioctanoil-sn-glicero-3-fosfocolina y 0,12 mM para la sPLA₂- α de *Arabidopsis* [73].

Las eficiencias catalíticas (o constante de especificidad o también llamada performance catalítica) para ambas isoformas se calcularon como la relación de V_{MAX} respecto a K_M (V_{MAX}/K_M , ver ref.[203]). Los valores obtenidos se muestran en la **Tabla 5.2**. Estrictamente, la eficiencia catalítica es k_{cat}/K_M , pero asumiendo que estamos comparando enzimas a igual concentración $[E]$, como $V_{MAX}=k_{cat}\cdot[E]$, se puede usar directamente V_{MAX} para calcular la eficiencia catalítica como V_{MAX}/K_M .

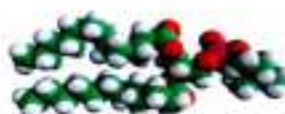
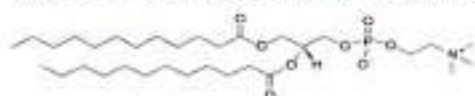
5.2.3 Especificidad por fosfolípidos con diferente cabeza polar de GmsPLA₂s

Para realizar este estudio, se seleccionaron cuatro sustratos que poseen la misma composición en la cadena hidrocarbonada pero que difieren en la estructura del grupo polar de la cabeza. Se sabe que cambios en la cabeza polar de fosfolípidos pueden producir cambios significativos en las características de la interfaz y afectar consecuentemente la actividad de la enzima. Diferencias notables en la actividad de la enzima para hidrolizar diferentes fosfolípidos podrían deberse a una diferencia específica (a nivel de secuencia o estructura), o más bien a cambios que pueden operar en las características biofísicas de la interfaz. El uso de detergente no iónico para la preparación de las micelas mixtas empleadas como sistemas de membrana organizados, ofrece la ventaja de presentar el sustrato de fosfolípido en una matriz uniforme y homogénea [204]. Los efectos de carga sobre el grupo presente en la cabeza polar del fosfolípido sustrato de la hidrólisis de GmsPLA₂-XIA-1 y -XIB-2 se examinó midiendo la velocidad inicial. Los sustratos empleados fueron DLPC, DLPG, DLPE y DLPA (**Figura 5.4**) en micelas mixtas con Tritón X-100.

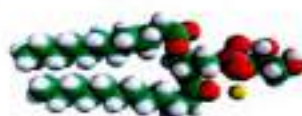
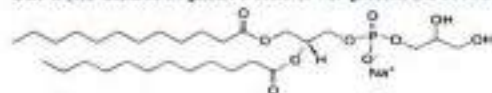
Las mediciones se realizaron en presencia y ausencia de NaCl 100 mM. La actividad de GmsPLA₂-XIA-1 en ausencia de sal mostró una preferencia por lípidos zwitteriónicos como PC y PE en comparación con los fosfolípidos aniónicos tales como PG y PA (**Figura 5.5 A y Tabla 5.3**). En presencia de NaCl 100 mM se observó una clara preferencia de la enzima por PC, pero PE y PG también mostraron reactividad (**Figura**

4.9B), aunque menor. Casi el mismo comportamiento se observó para GmsPLA₂-XIB-2, ya que se observó que esta enzima prefiere PC, ya sea en presencia o ausencia de sal.

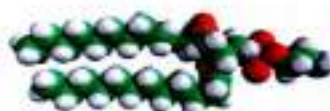
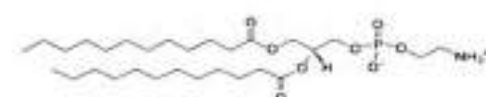
DLPC (1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfocolina o dilauroilfosfatidilcolina)



DLPG (1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-sn-glicerol) (sal de sodio) o dilauroilfosfatidilglicerol)



DLPE (1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina o dilauroilfosfatidiletanolamina)



DLPA (1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfato (sal de sodio) o dilauroilfosfatidico)

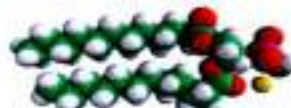
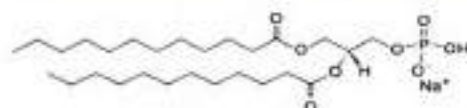


Figura 5.4 Esquema de fosfolípidos empleados en los ensayos de actividad Estructuras y fórmulas.

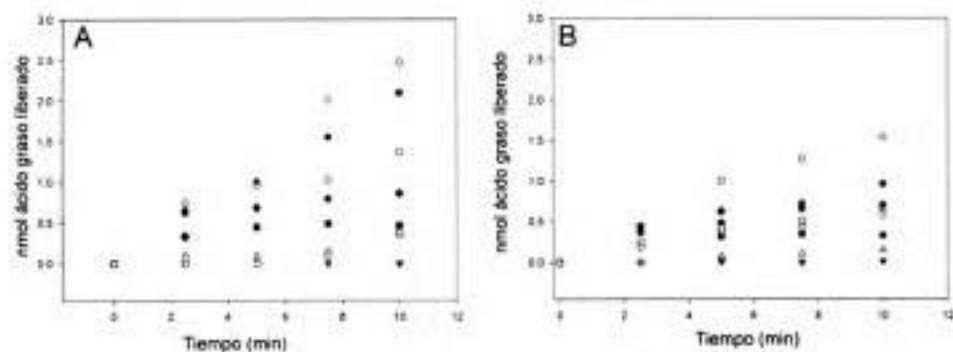


Figura 5.5 Evolución temporal de la hidrólisis de sustratos con diferentes grupos de cabeza en ausencia A) o B) presencia de la sal, por GmsPLA₂-XIA-1 (símbolos llenos) y GmsPLA₂-XIB-2 (símbolos vacíos) utilizando micelas mixtas. (● ○) DLPC, (◇ ◆) DLPE, (■ □) DLPG y (▼ △) DLPA

En presencia de una concentración de sal elevada (Figura 5.5B), GmsPLA₂-XIB-2 mostró una ligera preferencia por PE sobre PG, pero esta preferencia no se observa en ausencia de NaCl. Cuando el sustrato es PA, en todos los casos, la actividad fue muy

pobre o cercana a cero. El comportamiento de actividad en presencia de NaCl para GmsPLA₂-XIB-2 fue similar al reportado para AtsPLA₂-α [73]. Por otra parte, la eficiencia catalítica fue mayor cuando el sustrato utilizado en el ensayo fue DLPC (Tabla 5.3).

Tabla 5.3 Influencia de sal en la actividad sPLA₂ de *Glycine max*. Producto liberado expresado en nmol a los 5 minutos de reacción cuando se utilizan diferentes sustratos en presencia y ausencia de NaCl.

Sustrato	0mM NaCl				100 mM NaCl			
	GmsPLA ₂ -XIA-1		GmsPLA ₂ -XIB-2		GmsPLA ₂ -XIA-1		GmsPLA ₂ -XIB-2	
	nmol liberado	%	nmol liberado	%	nmol liberado	%	nmol liberado	%
DLPC	1,43 ± 0,03	100	7,30 ± 0,64	100	3,26 ± 0,05	100	10,44 ± 0,45	100
DLPE	1,38 ± 0,03	96,5	4,95 ± 0,01	67,8	1,59 ± 0,07	48,8	6,53 ± 0,64	62,6
DLPG	0	0	3,29 ± 0,68	45,1	1,23 ± 0,08	37,7	3,45 ± 0,05	33,1
DLPA	0,13 ± 0,02	5,1	0	45,1	0,33 ± 0	10,1	0,13 ± 0,03	1,2

Los porcentajes están relacionados con cada máximo de productos generados para ambas enzimas en cada condición ensayada.

Independientemente de la presencia o no de sal en el medio, ambas enzimas, GmsPLA₂-XIA-1 y -XIB-2, mostraron una marcada preferencia por PC, lo que indica que este grupo de enzimas tiene un comportamiento distinto al descrito para la sPLA₂ pancreática [86, 205-207]. Esta alta selectividad por PC podría estar relacionada con la función biológica de estas enzimas, ya que PC es uno de los lípidos más abundantes en las membranas plasmáticas de las plantas junto con PE [73]. Estos resultados son comparables con los obtenidos para otras sPLA₂ de plantas: tabaco mostró preferencia por PC más que por PG y PE en micelas mixtas en presencia de colato de sodio [38]; *Arabidopsis*, AtsPLA₂-α y -β también prefieren sustratos zwitteriónicos como PC y PE, observándose una ligera preferencia de PE sobre PC, utilizando micelas mixtas con Tritón-X100 [20]. Por otro lado, AtsPLA₂-γ hidroliza en un 90% PE y en un 10% PC, lo que indica una fuerte preferencia por PE sobre PC como sustrato, observándose un comportamiento similar para AtsPLA₂-δ [37].

En un experimento realizado mediante simulación llevado a cabo por el Dr. Marcos Villareal, se evaluó la preferencia de binding de GmsPLA₂-XIA-1 por POPG en relación a POPC. La misma mostró una afinidad marcada hacia superficies aniónicas (Figura 5.6). Este resultado coincidió con lo observado para sPLA₂ pancreática, la cual actúa más eficientemente sobre superficies aniónicas. No obstante, este resultado se contradice con lo observado para las GmsPLA₂s y dado que todo dato obtenido mediante

simulación debe corroborarse experimentalmente, se realizaron estudios para determinar si bajo ciertas condiciones experimentales se lograba desviar la preferencia hacia PG.

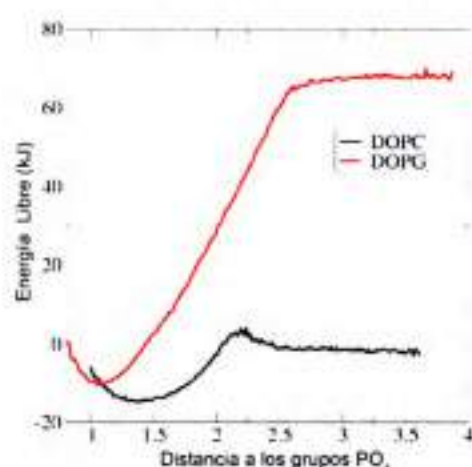


Figura 5.6 Potencial de fuerza media para la interacción de la proteína con membranas zwitteriónicas y aniónicas. La interacción con membranas aniónicas aparece más favorable con respecto a las neutras.

Mansfeld y col. reportaron que la adición de fosfolípidos aniónicos aumentan la velocidad inicial de la reacción de las sPLA₂ de plantas contra fosfolípidos zwitteriónicos [73]. Así, se evaluó el comportamiento de la actividad de GmsPLA₂-XIA-1 y -XIB-2 al adicionar porcentajes crecientes de DLPG a micelas mixtas de DLPC. Por el contrario, se observó una disminución en la actividad a medida que la proporción de DLPG en la micela mixta aumentó (**Figura 5.7**). Como control, se comparó el efecto de la sPLA₂ de páncreas hacia lípidos aniónicos, la cual mostró ser más activa en micelas mixtas ricas en PG (**Figura 5.7**) [205]. De acuerdo con el comportamiento general observado, comparativamente, sPLA₂ de páncreas es más activa contra fosfolípidos aniónicos en comparación con sPLA₂s de plantas de acuerdo a los resultados reportados por otros autores [86, 206, 207].

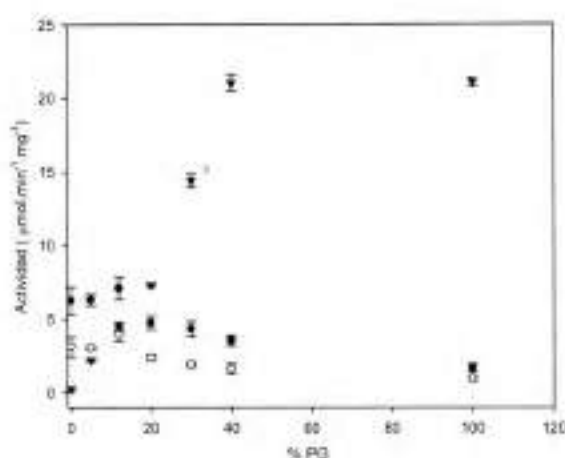


Figura 5.7 Micelas mixtas de DLPC/Tritón X-100 con porcentajes crecientes de DLPG: Comportamiento de la PLA₂ pancreática (▼), GmsPLA₂-XIA-1 (○) y GmsPLA₂-XIB-2 (●) en micelas mixtas de DLPC.

5.3 Conclusión

El presente estudio se centró en la búsqueda de las similitudes y diferencias en la actividad enzimática de las GmsPLA₂s recombinantes purificadas al compararlas entre ellas y con las demás sPLA₂s de plantas y animales. Las enzimas recombinantes GmsPLA₂-XIA-1 y -XIB-2 purificadas, resultaron ser enzimas funcionales ya que hidrolizaron fosfolípidos cuando se ofreció el sustrato en forma de micelas mixtas (lípidos/Tritón X-100).

Las PLA₂s con residuo His en el sitio activo tienen pH óptimo ligeramente básico. Esto es así porque el nitrógeno de la His debe tener el par de electrones libres para formar el oxianión del estado de transición de la reacción de hidrólisis. Por otra parte, el oxianión formado se estabiliza con la carga positiva del calcio. Así, un pH óptimo de actividad ligeramente básico y una dependencia de calcio menor a 1 mM son las características a resaltar para estas sPLA₂s de *Glycine max*. No obstante, a pesar de que las condiciones óptimas determinadas para la actividad de estas nuevas enzimas descritas de *Glycine max* resultaron ser similares a las observadas para otras sPLA₂s de plantas o animales. Demostraron poseer una temperatura óptima alta de 60°C.

Desde que las sPLA₂s de animales y plantas actúan sobre sustratos similares pero en diferentes entornos de membrana y con diferentes consecuencias biológicas, notables diferencias en la especificidad por sustrato podrían esperarse al momento de establecer una comparación. Es así que, según los resultados obtenidos, las velocidades de hidrólisis para ambas enzimas resultaron ser más altas cuando el sustrato presente en la micela mixta fue zwitteriónico y disminuyó cuando en la misma se encontraban fosfolípidos

cargados negativamente (aniónico). Este hecho podría ser funcionalmente importante, ya que estas enzimas son secretadas al espacio extracelular en donde actúan sobre las membranas enriquecidas en PC/PE, los cuales son los componentes mayoritarios presentes en casi la misma proporción en membrana de plantas [208]. Otra fuente podría ser las membranas ricas en PE de los microorganismos como las bacterias o los hongos [209], los cuales invaden el espacio extracelular.

Todos estos resultados sugieren que el fosfolípido neutro aumenta la afinidad de GmsPLA₂s en micelas mixtas de sustrato/Tritón ya que ambas mostraron un valor de K_M aparente pequeño para PC en comparación con los obtenidos para micelas mixtas de PG. También se observó un aumento en la V_{MAX} aparente, lo que demuestra que el tipo de grupo que se encuentra en la cabeza del lípido afecta la etapa catalítica. Todas estas propiedades catalíticas son consistentes con enzimas sPLA₂s. Por otra parte, se comprobó que el PG se comporta como un inhibidor cuando se mezcla con PC ya que se observó una disminución en la velocidad de hidrólisis de la enzima hacia micelas mixtas, contrariamente al comportamiento bien definido que se observó para la PLA₂ pancreática que es más activa cuando el sustrato ácido o anfifílico cargado negativamente está presente en la interfaz [1, 86].

Otra característica nueva y cinéticamente importante es que éstas son las primeras sPLA₂s de plantas recombinantes reportadas que muestran una tendencia a actuar en el modo de hidrólisis saltatorio.

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD $s\text{PLA}_2$ EN MONOCAPAS

“Tambien es una paradoja que la tierra se mueva alrededor del sol, y que el agua se componga de dos gases altamente inflamables. La verdad científica resulta siempre paradójica, si la juzgamos por nuestra experiencia cotidiana, que sólo capta el carácter ilusorio de las cosas”.

Karl Marx

CAPÍTULO 6. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD sPLA₂ EN MONOCAPAS

6.1 Introducción

Los sustratos lipídicos organizados en sistemas de membrana modelo bien controlados y simples son de elección para estudiar la actividad lipolítica en relación a las propiedades biofísicas del sustrato lipídico. En particular, las monocapas de lípidos constituyen un modelo aceptado en el cual se puede demostrar que la actividad sPLA₂ es afectada por el estado físico y la organización de la interfaz lipídica. Por ello, la actividad enzimática de ciertas enzimas anfitrópicas que actúan en interfaces, es sensible a cambios físicos que experimenta la membrana relacionadas a la organización del sustrato en la interfaz como, empaquetamiento o la curvatura de la superficie del agregado donde actúa la enzima [138-141]. No obstante, es importante considerar el sitio catalítico de la molécula de sustrato sobre el cual estas enzimas actúan, ya que la profundidad a que se encuentra dicho sitio es determinante para su accesibilidad.

La presente Tesis es el primer reporte donde se estudia la actividad sPLA₂ de plantas empleando monocapas de Langmuir. Se sabe que para prevenir cualquier cambio fisicoquímico que pudiese ocurrir en el agregado lipídico durante el curso de la hidrólisis, lo cual puede perturbar la interacción proteína-lípido, la técnica de monocapas resulta adecuada para estudiar la actividad catalítica en interfaces agua-aire cuando la presión de superficie se mantiene constante durante la reacción.

El propósito del trabajo desarrollado en este capítulo fue explorar si existe una relación entre la secuencia-estructura de las sPLA₂s de soja y su habilidad para sensar diferencias de empaquetamiento lateral de la membrana. Para este fin empleamos la técnica de monocapas de DLPC para realizar ensayos de actividad a diferentes presiones laterales de la superficie.

6.2 Resultados y Discusión

6.2.1 Ensayo de actividad sPLA₂ en interfaces agua/aire

6.2.1.1 Dependencia de la actividad con la concentración de enzima.

La actividad de las GmsPLA₂s versus la concentración de la enzima utilizando monocapas de DLPC a una presión lateral constante de 13 mN.m⁻¹, mostró una dependencia lineal de la actividad con la concentración para ambas enzimas (**Figura 6.3 A y B**). El período de latencia "lag time" para cada una de las GmsPLA₂s sigue la misma

tendencia y, como era de esperarse, es menor cuanto mayor es la concentración de la enzima, lo que sugiere una mayor cantidad de moléculas de enzima que particionan a la interfaz para hidrolizar el sustrato a medida que la concentración aumenta en la subfase (Figura 6.4 Ay B).

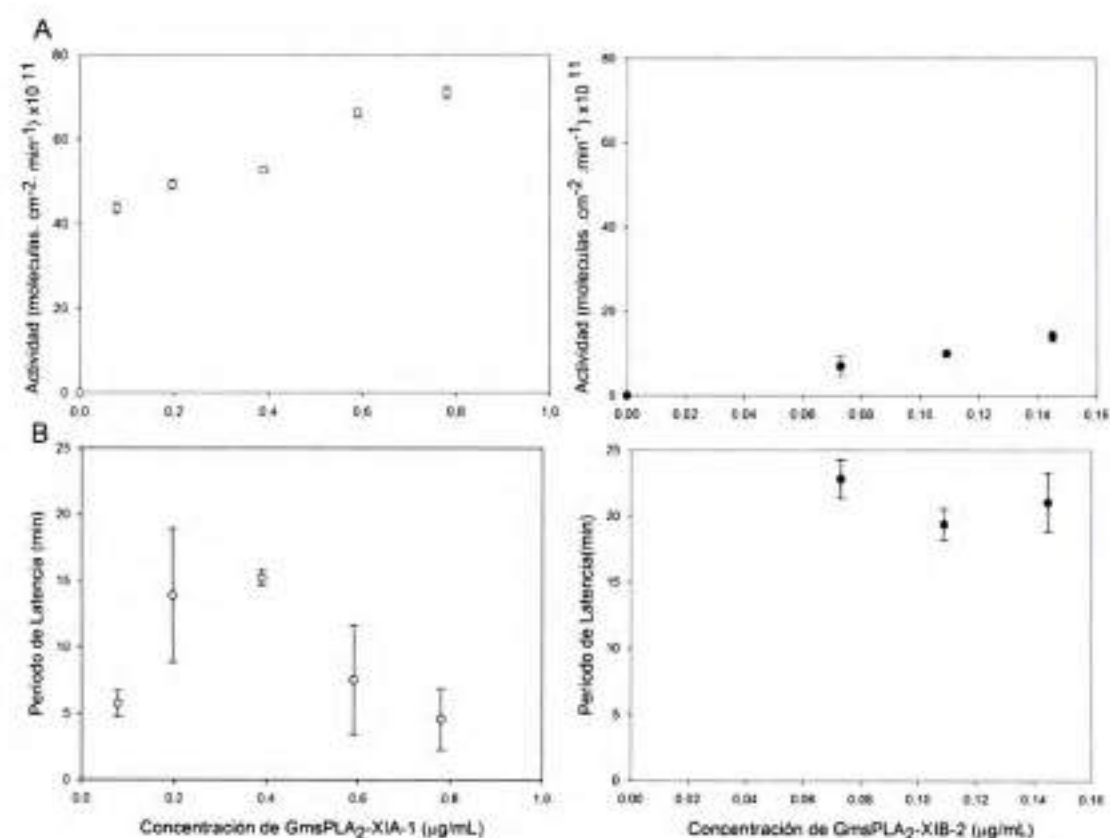


Figure 6.3 Dependencia de las actividades $GmsPLA_2$ s y periodo de latencia "lag times" con la presión lateral de la superficie y la concentración de enzima en la subfase de monocapas de Lagmuir de DLPC en una reacción de orden cero. **A)** actividad $GmsPLA_2$ s vs. concentración de enzima usada en el ensayo. **B)** Periodos de latencia "lag times" de las actividades de $sPLA_2$ vs. concentración de enzima. Círculos rellenos (●) corresponden a $GmsPLA_2$ -XIB-2 y círculos vacíos (○) a $GmsPLA_2$ -XIA-1.

6.2.1.2 Dependencia de la actividad $sPLA_2$ con la presión de superficie.

Para analizar el perfil interfacial de las $GmsPLA_2$ s en monocapas de DLPC, la actividad se determinó a diversas presiones de superficie (11, 13, 16 y 18 $mN \cdot m^{-1}$) usando el baróstato para mantener la calidad interfacial constante durante la reacción. El perfil de dependencia de la presión lateral de superficie ensayada a diferentes presiones superficiales (π) muestra un valor óptimo para la actividad a 16 $mN \cdot m^{-1}$ y 13 $mN \cdot m^{-1}$ para $GmsPLA_2$ -XIA-1 y -XIB-2, respectivamente (Figura 6.4A). La actividad catalítica de

GmsPLA₂-XIA-1 es muy reducida a presiones superficiales más bajas y/o más altas que las empleadas en el estudio (datos no mostrados). Esta disminución de la actividad a nivel de presiones de superficie extremas es indicativa de una modulación inducida para este tipo de enzimas lipolíticas con el empaquetamiento de los lípidos. Los resultados observados fueron similares a los observados para otras sPLA₂s de animales [49] o para la sPLA₂ de páncreas, y muestran claramente que el potencial catalítico de estas enzimas depende de la organización del sustrato y la calidad de la interfaz. Los *periodos* de latencia “lag times” en función de la presión de superficie mostraron la misma tendencia para ambas enzimas, siendo mínimos a 13 mN.m⁻¹ (Figura 6.4 B).

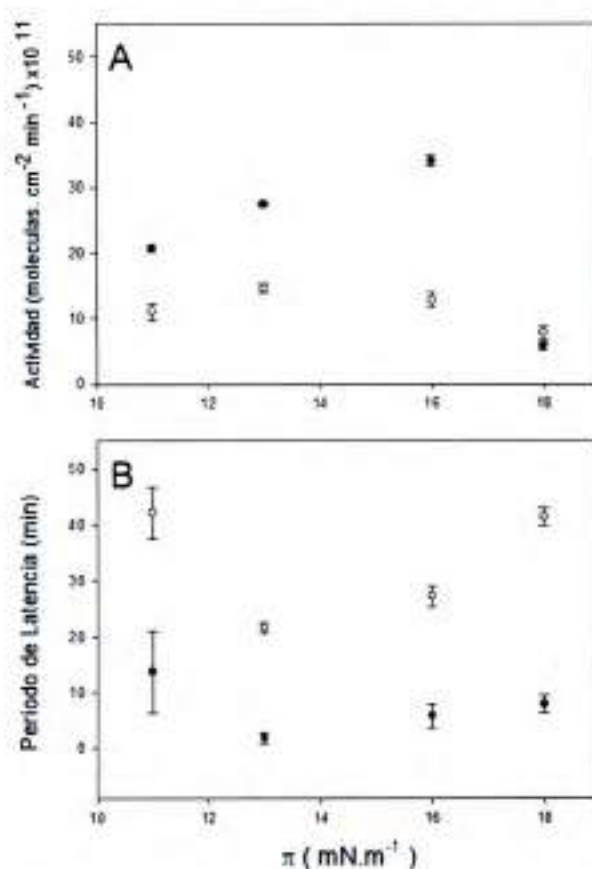


Figura 6.4 Modulación de la actividad GmsPLA₂ en monocapas. A) Variación de la actividad GmsPLA₂s vs. presión lateral de superficie (π). B) Lag times de GmsPLA₂ vs. presión lateral de superficie. Círculos rellenos (●) corresponden a GmsPLA₂-XIB-2 y círculos vacíos (○) a GmsPLA₂-XIA-1.

6.3 Conclusiones

En la presente Tesis es la primera vez que se estudió el comportamiento de sPLA₂s de origen vegetal mediante el uso de sustratos organizados en monocapas de

Langmuir. De la suma de los resultados expuestos en este capítulo se puede decir que ambas enzimas, GmsPLA₂-XIA-1 y -XIB-2, mostraron capacidad para hidrolizar monocapas de lípido y sensibilidad al empaquetamiento lateral. Los diferentes perfiles de presión de superficie observados para la actividad, confirmaron que el comportamiento en la catálisis depende de la organización lateral de la interfaz lipídica.

— CAPÍTULO 7 —

AUXINAS

“ La educación no es un entrenamiento para algo, sino el proceso que te confiere la capacidad de estimularte a ti mismo o a un amigo con una idea ”

John Ewart Wallace Sterling

CAPÍTULO 7. ESTUDIO DEL EFECTO DE AUXINAS SOBRE LA ACTIVIDAD sPLA₂.

7.1 Introducción

Las sPLA₂s, al igual que otras enzimas lipolíticas, son enzimas interfaciales, ya que acceden al sustrato organizado en biomembranas para llevar a cabo la reacción catalítica. De esta manera, la actividad de las enzimas que "atacan" superficies de lípidos organizados, es modulada directamente por la interfaz dada por la organización supramolecular del sustrato. Este efecto se resume en el concepto de "calidad interfacial de la membrana" (por ejemplo: el estado físico de los lípidos, empaquetamiento lateral adecuado, la modulación de lípidos no sustratos, el "defecto lateral de membrana", véase: [187, 210-215]).

Muchos estudios han demostrado que los defectos laterales de membrana llevan a un aumento de la actividad enzimática de diferentes PLA₂s [216-219], pero los detalles a nivel molecular de porqué esto ocurre no han sido aún dilucidados. Debe indicarse que para sustratos agregados la actividad enzimática está cambiando la composición lipídica mediante la formación de productos a alguna velocidad relativa hasta que se alcanza un punto crítico de composición, por encima del cual se reorganiza la topología de la superficie de acuerdo a la miscibilidad del sustrato/producto. La idea de que los defectos laterales de membrana (defectos de empaquetamiento, coexistencia de fase) regulan las enzimas lipolíticas ha sido muy bien aceptada en la literatura.

De acuerdo a los antecedentes, se espera que la actividad GmsPLA₂ se encuentre estimulada por la presencia de auxinas en el medio de reacción. Por esto es que como parte de este trabajo de Tesis, en este Capítulo y dentro del marco del análisis de los efectos de las auxinas sobre la actividad sPLA₂, se propuso estudiar la interacción entre proteína/auxina y auxina/lípido y correlacionar estos resultados con las diferencias estructurales e hidrofobicidad relativa de estas hormonas vegetales.

En el presente Capítulo se describirán y discutirán los resultados de experimentos de interacción entre las enzimas GmsPLA₂s y las auxinas, específicamente ácido indol-3-propiónico (IPA) e indol-3-acético (IAA), los cuales se comparan con el comportamiento observado para la PLA₂ pancreática que se emplea como control, ya que la misma es el

paradigma de las sPLA₂ de origen animal, y dado que no es de origen vegetal, se esperaría que no hubiera efecto estimulante por auxinas sobre la actividad de la misma.

El objeto de estos experimentos es estudiar el efecto estimulador de las auxinas sobre las sPLA₂s y determinar si este se correlaciona con un efecto directo sobre la enzima o a nivel de la organización lipídica interfacial. Para ello, se emplearon sistemas en solución "bulk" (micelas mixtas) y la técnica de monocapa de Langmuir. Los estudios en monocapas de Langmuir son ideales para la comprensión de las interacciones entre la auxina y la membrana, ya que las monocapas lipídicas constituyen modelos simples para estudiar las interacciones intermoleculares [220-222] y la interfaz puede ser fácilmente modulada por cambios en la composición interfacial o empaquetamiento lateral [213]. Además, esta técnica nos permite monitorear no sólo la consecuencia termodinámica de la penetración de auxinas en la membrana, sino también sus propiedades cinéticas. De esta manera, el efecto biofísico de la adsorción de la auxina y la penetración en la monocapa de lípidos, las propiedades de la monocapa mixta y la actividad de diferentes sPLA₂s se analizaron a través de cambios en las presiones superficiales e isothermas de adsorción y de compresión.

7.2 Resultados

7.2.1 Estudio del efecto estimulante de las auxinas sobre la actividad sPLA₂ en micelas mixtas.

Se estudió el efecto de la estimulación *in vitro* de la actividad sPLA₂ empleando micelas mixtas de DLPC-Tritón (relación 1:4) a las cuales se le adicionó diferentes concentraciones de 3-IPA o 3-IAA (**Figura 1.9**). Luego de 5 minutos de incubación con ambas auxinas, se observó un aumento de la actividad de las GmsPLA₂s y como se muestra en la **Figura 7.1**, se obtuvieron curvas similares de actividad vs. [DLPC] tanto para las GmsPLA₂s como para PLA₂ pancreática empleada como control.

El perfil de estimulación llevado a cabo por la auxina 3-IAA muestra un máximo alrededor de una concentración de 100 µM para ambas enzimas GmsPLA₂s (**Figura 7.1A**). Este efecto claramente se ve disminuido a concentraciones superiores a 100 µM, donde la actividad de la enzima alcanza un nivel de saturación, lo que sugiere que una interacción no efectiva de la auxina con la sPLA₂ o que un efecto contrario debido a la saturación local podrían estar ocurriendo. La misma tendencia se observa para 3-IPA, pero con una mayor actividad de la PLA₂ a una concentración de 100 µM de auxina (**Figura 7.1B**). Esto indica que un nivel máximo de estimulación de la actividad sPLA₂ se

lograría mediante la adición de 100 μM para ambas auxinas para las sPLA₂s, independientemente del origen, ya que el mismo efecto ocurre tanto para la sPLA₂ pancreática porcina (origen animal) como para las GmsPLA₂s. Estos resultados coinciden con lo observado en el medio biológico donde las concentraciones de ambas auxinas se encuentran en el orden micromolar. A un nivel de auxina milimolar, se observa una atenuación del efecto de estimulación (Tabla 7.1).

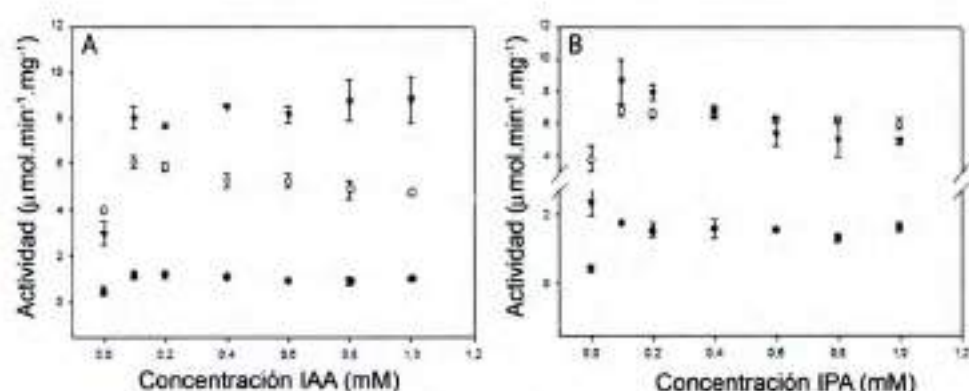


Figura 7.1 Efecto de la estimulación de las auxinas sobre la actividad sPLA₂ en micelas mixtas de DLPC/Tritón X-100 (relación 1:4). Interacción de GmsPLA₂-IXA-1, (○), GmsPLA₂-XIB-2 (▼) y PLA₂ de páncreas (●) con A) 3-IAA y B) 3-IPA.

Tabla 7.1 Porcentaje de estimulación de la actividad de la PLA₂ por efecto de la adición de auxinas al medio de reacción.

Auxina (mM)	% Estimulación					
	GmsPLA ₂ -XIA-1/IPA	GmsPLA ₂ -XIA-1/IAA	Pancreatic PLA ₂ /IPA	Pancreatic PLA ₂ /IAA	GmsPLA ₂ -XIB-2/IPA	GmsPLA ₂ -XIB-2/IAA
0	0	0	0	0	0	0
0,1	78,7	53,0	286,7	155,3	271,1	170,7
0,2	73,7	47,5	240,0	151,1	240,1	157,9
0,4	71,8	32,9	255,6	131,9	192,7	186,2
0,6	66,5	32,2	246,7	102,1	132,8	174,4
0,8	64,5	24,2	188,9	100,0	118,1	194,9
1,0	56,5	19,8	257,8	119,1	112,9	196,3

La enzima sPLA₂ de páncreas utilizada aquí, además de ser una PLA₂ paradigmática, presenta baja homología con las sPLA₂s de plantas conocidas, por lo tanto, sirve como modelo aceptable para el presente estudio ya que las auxinas son fitohormonas que se encuentran únicamente en plantas. Al estudiar las interacciones de las auxinas con las sPLA₂, el mismo comportamiento se observó tanto para la sPLA₂ pancreática, como para las GmsPLA₂s, sugiriendo que la estimulación de la actividad

sPLA₂ no se debe a una interacción directa de las sPLA₂ con dichas auxinas, sino por un cambio en la calidad interfacial.

7.2.2 Interacción de las auxinas con interfaces lipídicas. Estabilidad de fitohormonas en una membrana como medio ambiente.

7.2.2.1 Isotermas de Compresión de DLPC puro y sus mezclas con auxina.

Dado que también se estudia la influencia de auxinas sobre la actividad de las diferentes sPLA₂s mediante el uso de monocapas de lípidos como sistema modelo de membrana, en primer lugar fue necesario evaluar la interacción y la capacidad de penetración de IAA e IPA en las monocapas de lípidos a ser empleadas. Las auxinas IAA e IPA son moléculas anfífilas (**Figura 1.9**) y ambas mostraron actividad superficial en presencia de la interfaz agua/aire cubierta de lípidos. Los índices de hidrofobicidad (calculados como el COEF. de PARTICIÓN OCTANOL-AGUA como Log Kow) (ver sección 2.7) de estas moléculas fueron: $1,76 \pm 0,22$ para IPA y $1,43 \pm 0,23$ para IAA. Estos datos están indicando que ambas fitohormonas son anfífilas con probabilidad termodinámica favorable de particionar a interfaces hidrofóbicas.

Se estudió la estabilidad de las interfaces mixtas de fosfolípidos/auxinas mediante la dispersión directa de la solución pre-mezclada compuesta de lípidos y auxinas sobre la superficie aire/agua. Todas las isotermas de compresión de Langmuir de π vs. área de monocapas mezcla de lípidos/auxina indicaron que son capaces de formar películas coherentes y reproducibles y pueden ser comprimidas hasta una presión lateral de 20 mN.m^{-1} sin producirse una desorción apreciable durante el transcurso de tiempo que dura el experimento. Como se muestra en la **Figura 7.2** ambas auxinas (IAA e IPA) pre-mezcladas con DLPC tienen la capacidad de permanecer en la monocapa mixta de lípido/auxina, es decir, ante sucesivos ciclos de compresión y descompresión, ambas auxinas siempre llegan al mismo valor de π a igual valor de A (datos no mostrados), lo que indica que el número de moléculas que se encuentran en la interfaz se mantiene constante, concluyéndose que presentan alta estabilidad. A su vez, ambas auxinas mostraron capacidad para modificar las características interfaciales del DLPC, causando la expansión de la monocapa en comparación con el lípido puro.

En otras palabras, las auxinas tienen la capacidad de permanecer en la interfaz constituida por una mezcla de lípidos/auxina aumentando la fluidez de la monocapa, y provocando un desplazamiento de la isoterma hacia áreas moleculares más grandes. Este estudio es necesario, como un control, previo a la realización del ensayo de actividad de

las sPLA₂ en monocapa de Langmuir a los fines de estudiar el efecto de las auxinas sobre la fisicoquímica del agregado.

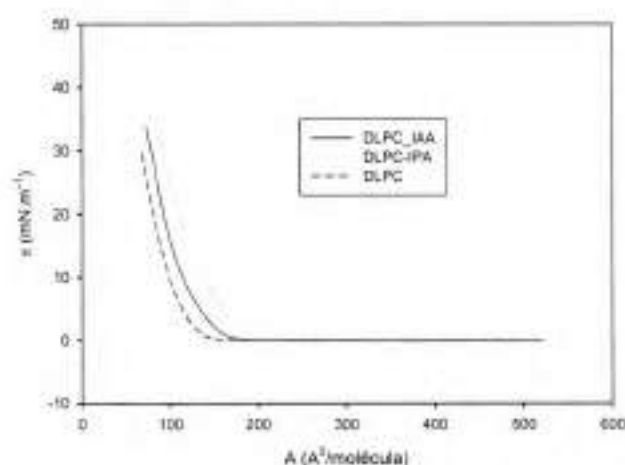


Figura 7.2 Isotermas de compresión de DLPC y DLPC/auxina. Penetración de la monocapa mixta (DLPC / auxina 8:2) y DLPC puro en buffer PLA₂ a 25°C.

7.2.2.2 Isotermas de Penetración de auxinas

Los experimentos de penetración y adsorción de las auxinas en interfaces mezclas se realizaron previamente a considerar su influencia en la actividad sPLA₂, como se mencionó anteriormente.

La capacidad de ambas auxinas de interactuar con la monocapa de lípido zwitteriónico DLPC se estudió con el fin de determinar la viabilidad termodinámica de penetración de las fitohormonas estudiadas. Para este propósito, se registraron las isotermas de penetración realizadas a una presión de superficie constante de $13,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (presión de superficie donde se encuentra el máximo de actividad de las sPLA₂ en cuestión y que fue informado en el Capítulo 6) y se obtuvieron los perfiles de presión superficial en función del tiempo.

Como se puede observar en la **Figura 7.3A**, un aumento de la presión de superficie se obtiene rápidamente tras la adición de las auxinas a la subfase y prácticamente el 90% de la interacción se consigue dentro de los primeros 2-3 minutos. La interacción que muestra IPA es mayor que la observada para IAA, lo cual resulta coherente con la mayor lipofilia que se determinó para la primera. En términos de actividad superficial, un incremento en la presión en la superficie ($\Delta\pi$) se interpreta como una penetración de al menos una parte de la molécula anfifílica en la película

monomolecular causando su expansión (aumento de la presión en la superficie) [223]. Los experimentos de penetración, inequívocamente indican que las auxinas se estabilizan en la interfaz en presencia de fosfolípidos (partición favorable del IPA y el IAA desde la subfase a la interfaz de lípidos). Un fenómeno parecido fue reportado para las hormonas tiroideas en su interacción con membranas [224].

A

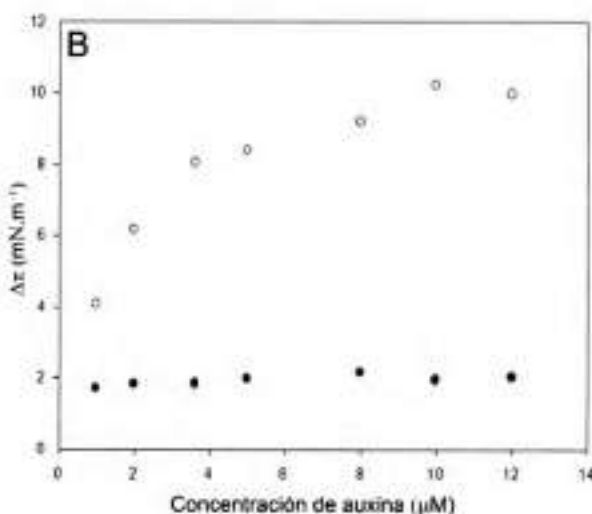
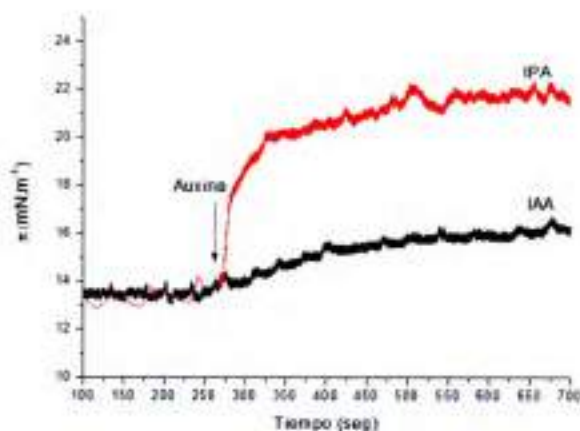


Figura 7.3 Penetración de auxinas en monocapas a 13 mN. A) Curva de tiempo de la interacción de IAA (línea negra) e IPA (línea roja) en monocapas de DLPC a una π fija de $12,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. B) Isoterma de adsorción de auxinas en monocapa de DLPC a una π de $13 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (●) IAA y (○) IPA.

Para estudiar la cinética de adsorción de las auxinas, se realizaron isotermas de Gibbs. Como las auxinas son anfipáticas y solubles en lípidos, las isotermas de penetración de π en función del tiempo (Figura 7.3A) muestran que cuando una molécula

de lípido como el DLPC está presente en la interfaz organizada, un perfil de penetración se puede observar debido a cambios en las propiedades de monocapa del lípido, como puede ser la presión superficial, en contraste con la interfaz agua/aire donde no penetran (datos no mostrados). Esto indica que las auxinas IPA e IAA se estabilizan termodinámicamente en un ambiente basado en lípido organizado supramolecularmente.

Las propiedades de superficie de las auxinas se estudiaron en presencia de una monocapa de DLPC a una presión de superficie constante de $13 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ y las isothermas de adsorción de $\Delta\pi$ en función de la concentración de ambas auxinas fueron analizadas (**Figura 7.3B**). Es notable que para IPA, que es el más hidrófobo, un efecto de saturación se alcanza a una concentración de $10 \mu\text{M}$ y posee una mayor capacidad para penetrar en la monocapa lipídica que IAA, que alcanza el efecto de saturación a $2 \mu\text{M}$, pero con un grado de interacción mucho menor.

7.2.3 Estudios de Actividad sPLA₂ en monocapas mixtas DLPC/auxina: efecto de las auxinas sobre la actividad PLA₂

La actividad de las sPLA₂s, GmsPLA₂s y sPLA₂ pancreática, fue estudiada usando monocapas de Langmuir de DLPC en presencia y ausencia de auxinas, con el fin de determinar el efecto directo de las fitohormonas sobre la actividad sPLA₂. En una reacción de cinética de orden cero, la cantidad de área desplazada en la cuba desde el reservorio a una presión de superficie constante (baróstato de superficie) es equivalente a la cantidad de sustrato degradado [214, 225]. La **Figura 7.4** muestra el perfil de actividad de la sPLA₂ pancreática (área vs. tiempo) obtenido a partir de monocapas de DLPC puro y DLPC/auxina (mezcla). Los cambios en el área molecular a una presión lateral constante de $13 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ permiten calcular la actividad de las enzimas en cada condición del ensayo (ver Experimental sección 2.6.5) Después de la inyección de la enzima en el compartimiento de reacción, la velocidad de degradación sigue siendo prácticamente lineal después de un período de latencia "lag time" inicial de unos minutos.

En la **Tabla 7.2** se muestran las actividades específicas obtenidas para cada una de las enzimas en cada condición ensayada. Como se puede observar la presencia de las auxinas en la monocapa mixta sigue la misma tendencia que la que se describe en micelas mixtas. Las auxinas muestran un efecto estimulador que se traduce en un aumento de la actividad de las sPLA₂s cuando las mismas se disponen directamente sobre la superficie del sustrato DLPC mezclado con auxina, independientemente de la fuente de la enzima y el tipo de la auxina. Sin embargo, a pesar de ser más hidrófoba, IPA mostró un efecto

estimulador menos marcado sobre la actividad sPLA₂ que el observado para IAA. Este efecto podría ser debido a las condiciones de ensayo.

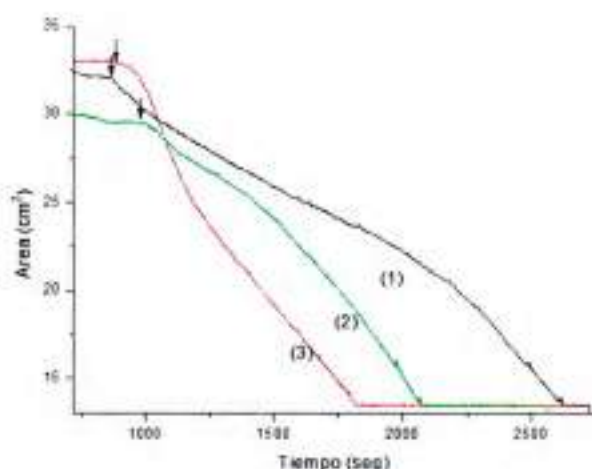


Figura 7.4 Esquema representativo del experimento de actividad PLA₂ de páncreas porcino en tiempo real. Hidrólisis de una monocapa lipídica de DLPC puro (curva 1), DLPC/IPA (8:2) (curva 2) y DLPC / IAA (8:2) (curva 3) a una presión superficial constante de 13 mN. Las flechas representan la inyección de la enzima en la subfase.

Tabla 7.2 Acción de auxina / DLPC (relación 8:2) en monocapa mixta sobre la actividad sPLA₂s. La actividad se expresa como (moléculas. cm⁻².min⁻¹) x10¹³/mg enzima.

Efecto de monocapas mixta auxina/DLPC en la actividad sPLA ₂			
ENZIMA	DLPC	DLPC/IPA	DLPC/IAA
PLA ₂ Pancreática	157,89 ± 0,05	368,42 ± 0,03	926,32 ± 0,35
GmsPLA ₂ -XIA-1	71,42 ± 0,19	140,26 ± 0,08	159,74 ± 0,0 9
GmsPLA ₂ -XIB-2	38,63 ± 0,02	184,01 ± 0,11	138,63 ± 0,12

7.3 Discusión

En este trabajo de Tesis, se comprobó por primera vez que el efecto de estimulación de las auxinas (IAA e IPA) sobre las sPLA₂s recombinantes de soja (*Glycine max*) constituye básicamente un efecto interfacial. La actividad sPLA₂ se estudió mediante experimentos *in vitro* utilizando micelas mixtas y monocapas de Langmuir. En los ensayos en solución "bulk" utilizando micelas mixtas se determinó que la estimulación de las sPLA₂s por estas auxinas es dependiente de la concentración de las fitohormonas empleadas con un valor óptimo que ronda alrededor de 0,1 mM, en las condiciones experimentales ensayadas (Figura 7.1 y Tabla 7.1). Este comportamiento

podría interpretarse como una acción directa sobre la molécula de enzima sPLA₂ (hipótesis de la "enzima") o un efecto perturbador sobre la superficie de la micela que hace más favorable la interfaz para la lipólisis (hipótesis del "sustrato"). El hecho de que el efecto de las auxinas favorezca la actividad de sPLA₂s procedentes de diferentes fuentes junto con el concepto de "calidad de superficie" actuando sobre las enzimas lipolíticas, hace más probable lo que se plantea en la segunda hipótesis. La tendencia del efecto de la concentración de ambas fitohormonas resultó similar hacia ambas GmsPLA₂s de plantas y para la sPLA₂ pancreática, lo que sugiere que no están involucradas interacciones específicas (reconocimiento molecular) directas entre enzima-fitohormona.

Para comprobar la hipótesis interfacial, se estudió la partición de las fitohormonas en interfaces de lípidos, aún cuando ambas fitohormonas, IAA e IPA (**Figura 1.9**), no muestran actividad superficial hacia superficies libres de lípidos. No obstante, claramente se observó que interactúan con DLPC cuando se midió la penetración en monocapa de lípidos (**Figura 7.2**) y son estables en la superficie de monocapas mixtas cuando una solución mezcla adecuada de lípidos/fitohormona se extiende en la interface aire/agua. Por lo tanto, se puede concluir de manera inequívoca que las auxinas son capaces de interactuar con agregados lipídicos y pueden establecer interfaces mixtas estables. Los resultados mostraron que la auxina IPA que es ligeramente más hidrofóbica, puede penetrar más efectivamente en la monocapa de lípidos que IAA (mayor $\Delta\pi$ véase la **Figura 7.3A**) y que se corresponde con una mayor expansión de la monocapa al observar las isotermas de π -Área de las monocapas mixtas. Cabe destacar que la estabilidad lateral observada a partir de las isotermas π -Área de monocapas mezclas de lípidos/auxina es un detalle importante para los lectores que no son especialistas en química de superficie, ya que en el ajuste experimental para medir la actividad sPLA₂ en monocapas mixtas de lípidos la cantidad total de auxina sembrada que permanece en la interfaz son pocos nanomoles que forman una monocapa insoluble lípido/hormona. La interfaz mezcla se mantiene estable durante el tiempo en que transcurre la lipólisis, mientras que el DLPC que va siendo degradado en el compartimiento de reacción se sustituye por nuevas moléculas de DLPC desde el compartimiento de depósito (para una discusión de reacción de lipólisis de orden cero en monocapas mixta de lípidos ver sección 2.6.5 y [226]).

Una vez que fue claramente determinada la estabilidad de la interfaz mezcla lípido/auxina se realizaron experimentos utilizando monocapas mixtas para estudiar la influencia de auxinas en la actividad de la sPLA₂. La cantidad de auxina relativa a la cantidad de sustrato necesario para una estimulación óptima fue de aproximadamente una

fracción molar de 0,2 de auxina en las monocapas mixtas, lo cual sugiere que el mecanismo no es impulsado catalíticamente sobre la enzima pero en lugar se produciría a través de la interfaz (**Tabla 7.2**). Estos resultados son consistentes con los obtenidos en micelas mixtas donde, a concentraciones de auxina por encima de 0,1 mM (**Tabla 7.1**), se puede observar que la estimulación no es significativa. Este es el efecto perturbador máximo y, en consecuencia, el incremento máximo en la estimulación de la PLA₂ que se puede observar en nuestros sistemas experimentales. Estos resultados, sumados a la naturaleza inespecífica de la estimulación, demuestran que el efecto es claramente sobre la calidad interfacial del sustrato organizado y no un efecto directo sobre la enzima. Una interpretación directa es que este estado probablemente más "desordenado" podría ser producido por la presencia de las auxinas cuando interactúan con fosfolípidos, pero tampoco es tan lineal, ya que el efecto estimulante de auxinas está presente ya sea en micelas mixtas de Tritón/DLPC como en el sistema más organizado que constituyen las monocapas de lípidos. Los detalles moleculares por los que las interfaces mixtas particulares formadas por auxinas/fosfolípidos son más sutiles a ser degradadas por una sPLA₂, independientemente del origen de la enzima, aún necesita de ensayos adicionales.

7.4 Conclusión

Como conclusión general de estas observaciones, se podría decir que las auxinas naturales más abundantes, ácido IAA e IPA, son compuestos anfifílicos que pueden autopenetrar monocapas de lípidos e incorporarse a las membranas formando una interfaz mixta organizada y estable. A partir de los cambios favorables inducidos por las auxinas a nivel de la interfaz de membrana, lo cual permite descartar una acción directa sobre las enzimas, se determinó que estas auxinas ejercen un efecto estimulante sobre las sPLA₂s recombinantes de soja (*Glycine max*). Los resultados se compararon con aquellos obtenidos empleando una sPLA₂ de fuente animal. La estimulación ejercida por las auxinas sobre la actividad lipolítica fue efectiva, independientemente de la fuente de las sPLA₂ (planta o animal) y del modelo de membrana ensayada, lo que indica que ocurre un efecto más bien general impuesto por las auxinas a nivel interfacial.

No obstante, dada la evidencia experimental que ha surgido de este trabajo de Tesis sumado a la controversia existente en la bibliografía acerca de la presencia/ausencia de receptores de membrana que unan auxinas, se podría concluir que no siempre es necesaria la presencia de un receptor para que las auxinas puedan estimular la actividad de las sPLA₂s o eventualmente entrar al interior de la célula, como se ha observado en los

ensayos realizados empleando micelas mixtas y monocapas. Se podría sugerir por ejemplo que la función de las auxinas en el RE no necesitaría de la presencia de un receptor para que ésta pueda ejercer su función en dicha organela.

Como indica Sauer y col. la acción de las auxinas es compleja y varias acciones no son mediadas por ABP1 [123]. Por lo tanto, la partición a membrana de estas auxinas (independientemente de su efecto sobre las sPLA₂s) podría ser relevante en la sinergia con su efecto nuclear o citoplásmico (efecto no-genómico) como esta postulado que sucede con las hormonas tiroideas [224], de modo que la acción mediada por membranas no suena ilógica y se sustenta en principios básicos de factibilidad termodinámica de la partición de auxinas a biomembranas.

CONCLUSIÓN GENERAL

“Si he aprendido algo a lo largo de los años, es que el camino para convertirse en un maestro tiene mucho que ver con el aprendizaje, y muy poco con la perfección”.

Josh Waitzkin (Campeón Mundial de Ajedrez)



CAPITULO 8. CONCLUSIÓN GENERAL

Los aportes de este trabajo de Tesis tendientes a hallar una enzima de origen vegetal y lograr un mejor entendimiento del funcionamiento de la misma a partir de los conocimientos generados son de relevancia, teniendo en cuenta sus aplicaciones biotecnológicas y a nivel industrial. En este trabajo de Tesis se abordó el estudio de dos sPLA₂ de soja (*Glycine max*) las cuales demostraron capacidad para hidrolizar los enlaces *sn-2* de glicerofosfolípidos, haciendo hincapié en la caracterización estructural, bioquímica y cinética de las mismas.

La caracterización bioquímica molecular y estudios de preferencia por sustrato, son de relevancia ya que aportan conocimientos acerca de cuáles son las condiciones óptimas para la catálisis llevada a cabo por las mismas. Este conocimiento previo es vital para su posible aplicación a nivel industrial. Así mismo, el estudio del efecto que ejercen las auxinas sobre la actividad GmsPLA₂ en la hidrólisis de fosfolípidos resultó relevante.

La especificidad por el grupo de la cabeza polar del fosfolípido, podría estar ligado a la función biológica de las sPLA₂s y la preferencia marcada por PC podría deberse a que éste es el más abundante fosfolípido en biomembranas de plantas. Por ello, la activación interfacial y la eficiencia catalítica presuntamente se postula que se adaptó a las funciones de las plantas.

A partir de los resultados presentados en los capítulos anteriores se arribó a las siguientes conclusiones:

- ❖ Se identificaron cinco genes putativos que codifican para PLA₂s secretoras (sPLA₂s) en soja (*Glycine max*).
- ❖ Se demostró que dos PLA₂s secretoras obtenidos a través de expresión recombinante, tienen actividad sPLA₂.
- ❖ Mediante análisis filogenético se incluyó estas nuevas GmsPLA₂s dentro de la superfamilia de las sPLA₂s de plantas, hallándose que dos de ellas pertenecen al grupo XIA y tres al grupo XIB.
- ❖ Mediante modelado por Homología y Dinámica Molecular se determinó la estructura 3D de GmsPLA₂-XIA-1 y que su estabilidad es influenciada por el Ca²⁺. También se determinaron los aminoácidos presentes en la "i-face".
- ❖ Se hallaron las condiciones óptimas para la catálisis. Se encontró que ambas enzimas de *Glycine max* poseen una temperatura óptima de 60°C a la cual son estables, requieren un pH entre 7-8 para su actividad y concentraciones

micromolares de calcio; todas características claramente compatibles con una PLA₂ secretora. A pesar de que sPLA₂ de plantas y animales comparten muchas características comunes, los requerimientos de calcio y temperatura óptima mostraron algunas diferencias.

- ❖ *Las enzimas recombinantes demostraron una clara preferencia por PC.*
- ❖ *A partir estudios de actividad empleando monocapas de Langmuir, se evidenció un óptimo de presión de superficie intermedio entre 13 y 16 mN.m⁻¹ para la actividad de estas GmsPLA₂s recombinantes.*
- ❖ *Las auxinas IAA e IPA son moléculas anfifílicas capaces de auto penetrar monocapas de lípidos organizados. La inserción de las auxinas en interfaz mixta de fosfolípido/auxina en sistemas de membrana controladas induce la activación de la sPLA₂ proveniente tanto de plantas (enzimas funcionales de Glycine max) como de animales (de páncreas porcino). Es evidente que el efecto no se debe a una interacción directa de las auxinas sobre la enzima, sino a un efecto relacionado con la organización interfacial sobre la que éstas actúan.*

Perspectivas

Actualmente, se ha generado una gran cantidad de información básica acerca del funcionamiento de dos nuevas sPLA₂s halladas en soja (*Glycine max*), la cual contribuye al conocimiento de la diversidad funcional de las sPLA₂s. Sin embargo, su función celular queda aún por ser dilucidada así como su posible participación en la cascada de señalización aguas abajo responsable de mediar el crecimiento, el desarrollo y respuestas al stress y de defensa en la planta, así como las interacciones aguas abajo a través de las múltiples redes de señalización en la que están involucrados los productos de hidrólisis.

Además, se definieron las condiciones óptimas para la catálisis llevada a cabo por estas GmsPLA₂s y las propiedades catalíticas, las cuales indican que estamos frente a una enzima con un alto poder catalítico. El problema que hasta hoy representa la obtención de la misma en bajas concentraciones, debido al bajo rendimiento en la purificación mediante el uso del sistema de expresión que se empleó en este trabajo de Tesis, sería satisfactorio contar con una metodología que luego sea adaptable a una escala mayor para comenzar a pensar en una proyección tecnológica de la misma.

Por otro lado, en base al estudio del efecto que ejercen las fitohormonas, específicamente IAA e IPA, sobre la actividad sPLA₂, se estudió su comportamiento en sistemas de membranas, mediante el empleo de monocapas y micelas mixtas, a los fines de determinar si el efecto estimulador es producto de la interacción hormona-enzima o un efecto más bien interfacial. Dado que hasta el momento no se conoce por completo el mecanismo por el cual estas fitohormonas estimulan la actividad sPLA₂, resulta importante estudiar a fondo la interacción de estas hormonas con la membrana.

Bibliografía

- [1] M.K. Jain, O.G. Berg, The kinetics of interfacial catalysis by phospholipase A2 and regulation of interfacial activation: hopping versus scooting, *Biochim Biophys Acta*, 1002 (1989) 127-156.
- [2] D.A. Six, E.A. Dennis, The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization, *Biochim Biophys Acta*, 1488 (2000) 1-19.
- [3] L.J. Reynolds, W.N. Washburn, R.A. Deems, E.A. Dennis, Assay strategies and methods for phospholipases, *Methods Enzymol*, 197 (1991) 3-23.
- [4] S.B. Ryu, Phospholipid-derived signaling mediated by phospholipase A in plants, *Trends Plant Sci*, 9 (2004) 229-235.
- [5] X. Wang, Plant Phospholipases, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52 (2001) 211-231.
- [6] D.C. Wilton, M. Waite, Phospholipases, in: D.E. Vance, J.E. Vance (Eds.) *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (4th Edn.)*, Elsevier, 2002, pp. 291-314.
- [7] G.F. Scherer, S.B. Ryu, X. Wang, A.R. Matos, T. Heitz, Patatin-related phospholipase A: nomenclature, subfamilies and functions in plants, *Trends Plant Sci*, 15 (2010) 693-700.
- [8] S.R. Geliang Wang, Xuemin Wang, Plant Phospholipases: An Overview, in: G. Sandoval (Ed.) *Lipases and Phospholipases*, vol. 861, Humana Press, 2012, pp. 123-137.
- [9] K. Senda, H. Yoshioka, N. Doke, K. Kawakita, A cytosolic phospholipase A2 from potato tissues appears to be patatin, *Plant Cell Physiol*, 37 (1996) 347-353.
- [10] C.L.S. Guanqun Chen, Michael S. Greer, Randall J. Weselake, Biology and Biochemistry of Plant Phospholipases, *Plant Sci*, 30 (2011) 239-258.
- [11] G. Lambeau, M.H. Gelb, Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2, *Annu Rev Biochem*, 77 (2008) 495-520.
- [12] S. Warner, Biotech takes on New Industries, *BioBusiness* 19 (2005) 45.
- [13] V.J. De Maria L., Oxenboll KM, Svendsen A, Patkar S., Phospholipases and their industrial applications, *Appl Microbiol. Biotechnol*, 74 (2007) 290.
- [14] Z. Guo, A.F. Vikbjerg, X. Xu, Enzymatic modification of phospholipids for functional applications and human nutrition, *Biotechnol Adv*, 23 (2005) 203-259.
- [15] L. Rönner, La incorporación de nuevas tecnologías: el caso de la soja., in: F.d.C.E.- UBA (Ed.) *Documentos del CIEA N° 1 2003*.
- [16] R. Hermida, Presente y futuro de la industria aceitera a nivel nacional e inter-nacional., in: *Aceites & Grasas* vol. 58, 2005, pp. 38-44.
- [17] R. Stafford, E. Dennis, Lysophospholipids as Biosurfactants, *Colloid Surface*, 30 (1998) 47-64.
- [18] G. Dashiell, *Aceites & Grasas*, 43 (2001) 197-204.
- [19] J. Mansfeld, Plant phospholipases A2: perspectives on biotechnological applications, *Biotechnol Lett*, 31 (2009) 1373-1380.
- [20] H.Y. Lee, S.C. Bahn, J.S. Shin, I. Hwang, K. Back, J.H. Doelling, S.B. Ryu, Multiple forms of secretory phospholipase A2 in plants, *Prog Lipid Res*, 44 (2005) 52-67.
- [21] J. Balsinde, M.V. Winstead, E.A. Dennis, Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization, *FEBS Lett*, 531 (2002) 2-6.
- [22] E.A. Dennis, J. Cao, Y.H. Hsu, V. Magrioti, G. Kokotos, Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention, *Chem Rev*, 111 (2011) 6130-6185.
- [23] R.H. Schaloske, E.A. Dennis, The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system, *Biochim Biophys Acta*, 1761 (2006) 1246-1259.
- [24] E.A. Dennis, Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2, *J Biol Chem*, 269 (1994) 13057-13060.
- [25] H.M. Verhelj, A.J. Slotboom, G.H. de Haas, Structure and function of phospholipase A2, *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 91 (1981) 91-203.
- [26] O.G. Berg, M.H. Gelb, M.D. Tsai, M.K. Jain, Interfacial enzymology: the secreted phospholipase A(2)-paradigm, *Chem Rev*, 101 (2001) 2613-2654.
- [27] M. Murakami, Y. Taketomi, H. Sato, K. Yamamoto, Secreted phospholipase A2 revisited, *J Biochem*, 150 233-255.
- [28] M.C. Moreau RA, Photoolytic activation of a lipolytic enzyme activity in potato leaves, *Plant Science*, 55 (1988) 205-211.
- [29] D.N. Kawakita K, Senda K., Factors, affecting in vitro activation of potato phospholipase A2, *Plant Science* 92 (1993) 183-190.

- [30] D. Kim, Lee, H.J., Lee, Y., Detection of two phospholipase A2 (PLA2) activities in leaves of higher plant *Vicia faba* and comparison with mammalian PLA2's, *FEBS Letter*, 343 (1994) 213-218.
- [31] U. Stahl, B. Ek, S. Stymne, Purification and characterization of a low-molecular-weight phospholipase A2 from developing seeds of elm, *Plant Physiol*, 117 (1998) 197-205.
- [32] U. Stahl, M. Lee, S. Sjodahl, D. Archer, F. Cellini, B. Ek, R. Iannaccone, D. MacKenzie, L. Semeraro, E. Tramontano, S. Stymne, Plant low-molecular-weight phospholipase A2S (PLA2s) are structurally related to the animal secretory PLA2s and are present as a family of isoforms in rice (*Oryza sativa*), *Plant Mol Biol*, 41 (1999) 481-490.
- [33] J.Y. Kim, Y.S. Chung, S.H. Ok, S.G. Lee, W.I. Chung, I.Y. Kim, J.S. Shin, Characterization of the full-length sequences of phospholipase A2 induced during flower development, *Biochim Biophys Acta*, 1489 (1999) 389-392.
- [34] S.J.S. Domingues, T.F. de Souza, A.M.S. Soares, T. Jacinto, O.L.T. Machado, Activation of phospholipase PLA2 activity in *Ricinus communis* leaves in response to mechanical wounding, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19 (2007) 35-42.
- [35] S.B. Ryu, H.Y. Lee, J.H. Doelling, J.P. Palta, Characterization of a cDNA encoding *Arabidopsis* secretory phospholipase A2-alpha, an enzyme that generates bioactive lysophospholipids and free fatty acids, *Biochim Biophys Acta*, 1736 (2005) 144-151.
- [36] H.Y. Lee, S.C. Bahn, Y.M. Kang, K.H. Lee, H.J. Kim, E.K. Noh, J.P. Palta, J.S. Shin, S.B. Ryu, Secretory low molecular weight phospholipase A2 plays important roles in cell elongation and shoot gravitropism in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 15 (2003) 1990-2002.
- [37] S.C. Bahn, H.Y. Lee, H.J. Kim, S.B. Ryu, J.S. Shin, Characterization of *Arabidopsis* secretory phospholipase A2-gamma cDNA and its enzymatic properties, *FEBS Lett*, 553 (2003) 113-118.
- [38] R. Fujikawa, Y. Fujikawa, N. Iijima, M. Esaka, Molecular cloning, expression, and characterization of secretory phospholipase A2 in tobacco, *Lipids*, 40 (2005) 901-908.
- [39] S. Dhondt, P. Geoffroy, B.A. Stelmach, M. Legrand, T. Heitz, Soluble phospholipase A2 activity is induced before oxylipin accumulation in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves and is contributed by patatin-like enzymes, *Plant J*, 23 (2000) 431-440.
- [40] H.L. Liao, J.K. Burns, Light controls phospholipase A2alpha and beta gene expression in *Citrus sinensis*, *J Exp Bot*, 61 2469-2478.
- [41] S. Grabski, X.G. Xie, J.F. Holland, M. Schindler, Lipids trigger changes in the elasticity of the cytoskeleton in plant cells: a cell optical displacement assay for live cell measurements, *J Cell Biol*, 126 (1994) 713-726.
- [42] M. Minchiotti, M.B. Scalambro, L. Vargas, C. Coronel, R. Madoery, Isolation of phospholipase A2 from soybean (*Glycine max*) seeds: The study of its enzymatic properties, *Enzyme and Microbial Technology*, 42 (2008) 389-394.
- [43] A. Verlotta, D. Trono, Expression, purification and refolding of active durum wheat (*Triticum durum* Desf.) secretory phospholipase A2 from inclusion bodies of *Escherichia coli*, *Protein Expr Purif*, 101 (2014) 28-36.
- [44] A. Verlotta, M.T. Liberatore, L. Cattivelli, D. Trono, Secretory Phospholipases A2 in Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.): Gene Expression, Enzymatic Activity, and Relation to Drought Stress Adaptation, *Int J Mol Sci*, 14 (2013) 5146-5169.
- [45] J.E. Guy, U. Stahl, Y. Lindqvist, Crystal structure of a class X1B phospholipase A2 (PLA2); rice (*oryza sativa*) isoform-2 pla2 and an octanoate complex, *J Biol Chem*, 284 (2009) 19371-19379.
- [46] Y. Fujikawa, R. Fujikawa, N. Iijima, M. Esaka, Characterization of secretory phospholipase A(2) with phospholipase A(1) activity in tobacco, *Nicotiana tabacum* (L.), *Lipids*, 47 (2011) 303-312.
- [47] G. Lambeau, M. Lazdunski, Receptors for a growing family of secreted phospholipases A2, *Trends Pharmacol Sci*, 20 (1999) 162-170.
- [48] A.M. Laxalt, T. Munnik, Phospholipid signalling in plant defence, *Curr Opin Plant Biol*, 5 (2002) 332-338.
- [49] M. Murakami, Y. Nakatani, G. Atsumi, K. Inoue, I. Kudo, Regulatory functions of phospholipase A2, *Crit Rev Immunol*, 17 (1997) 225-283.
- [50] M. Liscovitch, L.C. Cantley, Lipid second messengers, *Cell*, 77 (1994) 329-334.
- [51] J. Seo, H.Y. Lee, H. Choi, Y. Choi, Y. Lee, Y.W. Kim, S.B. Ryu, Phospholipase A2beta mediates light-induced stomatal opening in *Arabidopsis*, *J Exp Bot*, 59 (2008) 3587-3594.
- [52] O.R. Lee, S.J. Kim, H.J. Kim, J.K. Hong, S.B. Ryu, S.H. Lee, A. Ganguly, H.T. Cho, Phospholipase A(2) is required for PIN-FORMED protein trafficking to the plasma membrane in the *Arabidopsis* root, *Plant Cell*, 22 (2010) 1812-1825.

- [53] S. Froidure, J. Canonne, X. Daniel, A. Jauneau, C. Briere, D. Roby, S. Rivas, *AtsPLA2-alpha nuclear relocation by the Arabidopsis transcription factor AtMYB30 leads to repression of the plant defense response*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (2010) 15281-15286.
- [54] K.D. Chapman, *Phospholipase activity during plant growth and development and in response to environmental stress*, *Trends Plant Sci*, 3 (1998) 419-426.
- [55] A.E. Oliver, L.M. Crowe, P.S. de Araujo, E. Fisk, J.H. Crowe, *Arbutin inhibits PLA2 in partially hydrated model systems*, *Biochim Biophys Acta*, 1302 (1996) 69-78.
- [56] B.O. Bargmann, T. Munnik, *The role of phospholipase D in plant stress responses*, *Curr Opin Plant Biol*, 9 (2006) 515-522.
- [57] N. Tuteja, S.K. Sopory, *Plant signaling in stress: G-protein coupled receptors, heterotrimeric G-proteins and signal coupling via phospholipases*, *Plant Signal Behav*, 3 (2008) 79-86.
- [58] G.F. Scherer, R.U. Paul, A. Holk, J. Martinec, *Down-regulation by elicitors of phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C and up-regulation of phospholipase A in plant cells*, *Biochem Biophys Res Commun*, 293 (2002) 766-770.
- [59] R. Welti, W. Li, M. Li, Y. Sang, H. Biesiada, H.E. Zhou, C.B. Rajashekar, T.D. Williams, X. Wang, *Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase D alpha in freezing-induced lipid changes in Arabidopsis*, *J Biol Chem*, 277 (2002) 31994-32002.
- [60] R. Welti, X. Wang, *Lipid species profiling: a high-throughput approach to identify lipid compositional changes and determine the function of genes involved in lipid metabolism and signaling*, *Curr Opin Plant Biol*, 7 (2004) 337-344.
- [61] G.F.E. Scherer, *Stimulation of growth and phospholipase A 2 by the peptides mastoparan and melittin and by the auxin 2,4-dichlorophenoxyacetic acid*, *Plant Growth Regul*, 11 (1992) 153 - 157.
- [62] S. Chandra, P.F. Heinsteins, P.S. Low, *Activation of Phospholipase A by Plant Defense Elicitors*, *Plant Physiol*, 110 (1996) 979-986.
- [63] B. Li-Stiles, S.M. Fischer, *Mechanism(s) of activation of secretory phospholipase A(2)s in mouse keratinocytes*, *J Lipid Res*, 40 (1999) 1701-1709.
- [64] V.S. Reddy, A.S. Reddy, *Proteomics of calcium-signaling components in plants*, *Phytochemistry*, 65 (2004) 1745-1776.
- [65] D.L. Scott, S.P. White, Z. Otwinowski, W. Yuan, M.H. Gelb, P.B. Sigler, *Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2*, *Science*, 250 (1990) 1541-1546.
- [66] J. Mansfeld, S. Gebauer, K. Dathe, R. Ulbrich-Hofmann, *Secretory phospholipase A2 from Arabidopsis thaliana: insights into the three-dimensional structure and the amino acids involved in catalysis*, *Biochemistry*, 45 (2006) 5687-5694.
- [67] B.W. Dijkstra, R. Renetseder, K.H. Kalk, W.G. Hol, J. Drenth, *Structure of porcine pancreatic phospholipase A2 at 2.6 Å resolution and comparison with bovine phospholipase A2*, *J Mol Biol*, 168 (1983) 163-179.
- [68] B.W. Dijkstra, J. Drenth, K.H. Kalk, *Active site and catalytic mechanism of phospholipase A2*, *Nature*, 289 (1981) 604-606.
- [69] D.L. Scott, A.M. Mandel, P.B. Sigler, B. Honig, *The electrostatic basis for the interfacial binding of secretory phospholipases A2*, *Biophys J*, 67 (1994) 493-504.
- [70] R.S. Rosenson, M.H. Gelb, *Secretory phospholipase A2: a multifaceted family of proatherogenic enzymes*, *Current cardiology reports*, 11 (2009) 445-451.
- [71] R. Matsushima, M. Kondo, M. Nishimura, I. Hara-Nishimura, *A novel ER-derived compartment, the ER body, selectively accumulates a beta-glucosidase with an ER-retention signal in Arabidopsis*, *Plant J*, 33 (2003) 493-502.
- [72] Y. Ryu, Y. Oh, J. Yoon, W. Cho, K. Baek, *Molecular characterization of a gene encoding the Drosophila melanogaster phospholipase A2*, *Biochim Biophys Acta*, 1628 (2003) 206-210.
- [73] J. Mansfeld, R. Ulbrich-Hofmann, *Secretory phospholipase A2-alpha from Arabidopsis thaliana: functional parameters and substrate preference*, *Chem Phys Lipids*, 150 (2007) 156-166.
- [74] E. Valentin, F. Ghomashchi, M.H. Gelb, M. Lazdunski, G. Lambeau, *Novel human secreted phospholipase A(2) with homology to the group III bee venom enzyme*, *J Biol Chem*, 275 (2000) 7492-7496.
- [75] S. Bezzine, J.G. Bollinger, A.G. Singer, S.L. Veatch, S.L. Keller, M.H. Gelb, *On the binding preference of human groups IIA and X phospholipases A2 for membranes with anionic phospholipids*, *J Biol Chem*, 277 (2002) 48523-48534.
- [76] F. Ghomashchi, B.Z. Yu, O. Berg, M.K. Jain, M.H. Gelb, *Interfacial catalysis by phospholipase A2: substrate specificity in vesicles*, *Biochemistry*, 30 (1991) 7318-7329.

- [77] I. Kudo, M. Murakami, Phospholipase A2 enzymes, *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 68-69 (2002) 3-58.
- [78] J.E. Burke, E.A. Dennis, Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling, *J Lipid Res*, 50 Suppl (2009) S237-242.
- [79] A.B. Mukherjee, *Biochemistry, Molecular Biology and Physiology of Phospholipase A2 and its Regulatory Factors*, Plenum Press, New York, (1990).
- [80] J. Rogers, B.Z. Yu, S.V. Serves, G.M. Tsigoulis, D.N. Sotiropoulos, P.V. Ioannou, M.K. Jain, Kinetic basis for the substrate specificity during hydrolysis of phospholipids by secreted phospholipase A2, *Biochemistry*, 35 (1996) 9375-9384.
- [81] B.Z. Yu, J. Rogers, G.R. Nicol, K.H. Theopold, K. Seshadri, S. Vishweshwara, M.K. Jain, Catalytic significance of the specificity of divalent cations as KS^+ and $keat^+$ cofactors for secreted phospholipase A2, *Biochemistry*, 37 (1998) 12576-12587.
- [82] Y.H. Pan, T.M. Epstein, M.K. Jain, B.J. Bahnsen, Five coplanar anion binding sites on one face of phospholipase A2: relationship to interface binding, *Biochemistry*, 40 (2001) 609-617.
- [83] S.H. Edwards, D. Thompson, S.F. Baker, S.P. Wood, D.C. Wilton, The crystal structure of the H48Q active site mutant of human group IIA secreted phospholipase A2 at 1.5 Å resolution provides an insight into the catalytic mechanism, *Biochemistry*, 41 (2002) 15468-15476.
- [84] G.H. de Haas, P.P. Bensen, W.A. Pieterse, L.L. van Deenen, Studies on phospholipase A and its zymogen from porcine pancreas. 3. Action of the enzyme on short-chain lecithins, *Biochim Biophys Acta*, 239 (1971) 252-266.
- [85] M.H. Gelb, M.K. Jain, A.M. Hanel, O.G. Berg, Interfacial enzymology of glycerolipid hydrolases: lessons from secreted phospholipases A2, *Annu Rev Biochem*, 64 (1995) 653-688.
- [86] M.K. Jain, J. Rogers, O. Berg, M.H. Gelb, Interfacial catalysis by phospholipase A2: activation by substrate replenishment, *Biochemistry*, 30 (1991) 7340-7348.
- [87] I.H. Segel, *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*, in, vol. 44, Wiley, 1993.
- [88] G.P. Lewis, P.J. Piper, C. Vigo, Mechanism of action of anti-inflammatory steroids on membrane fluidity and phospholipase activity, *Br J Pharmacol*, 66 (1979) 453P.
- [89] G.H. De Haas, R. Dijkman, J.W. Boots, H.M. Verheij, Competitive inhibition of lipolytic enzymes. XI. Estimation of the interfacial dissociation constants of porcine pancreatic phospholipase A2 for substrate and inhibitor in the absence of detergents, *Biochim Biophys Acta*, 1257 (1995) 87-95.
- [90] R. Verger, J. Rietsch, M.C. Van Dam-Mieras, G.H. de Haas, Comparative studies of lipase and phospholipase A2 acting on substrate monolayers, *J Biol Chem*, 251 (1976) 3128-3133.
- [91] R. Verger, Interfacial enzyme kinetics of lipolysis, *Annu Rev Biophys Bioeng*, 5 (1976) 77-117.
- [92] P.M. Kilby, W.U. Primrose, G.C. Roberts, Changes in the structure of bovine phospholipase A2 upon micelle binding, *Biochem J*, 305 (Pt 3) (1995) 935-944.
- [93] B. van den Berg, M. Tessari, R. Boelens, R. Dijkman, G.H. de Haas, R. Kaptijn, H.M. Verheij, NMR structures of phospholipase A2 reveal conformational changes during interfacial activation, *Nat Struct Biol*, 2 (1995) 402-406.
- [94] T. Ahmed, S.M. Kelly, A.J. Lawrence, M. Mezna, N.C. Price, Conformational changes associated with activation of bee venom phospholipase A2, *J Biochem*, 120 (1996) 1224-1231.
- [95] G.H. de Haas, G.J. van Scharrenburg, A.J. Slotboom, Interaction of pancreatic phospholipases A2 and semisynthetic mutants with anionic substrates and substrate analogues, *Biochemistry*, 26 (1987) 3402-3408.
- [96] O.G. Berg, B.Z. Yu, J. Rogers, M.K. Jain, Interfacial catalysis by phospholipase A2: determination of the interfacial kinetic rate constants, *Biochemistry*, 30 (1991) 7283-7297.
- [97] P.J. Davies, *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*, in, Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands, 1987.
- [98] M. Wüchek, T. Miron, Oriented versus random protein immobilization, *J Biochem Biophys Methods*, 55 (2003) 67-70.
- [99] G.F. Scherer, B. Andre, Stimulation of phospholipase A2 by auxin in microsomes from suspension-cultured soybean cells is receptor-mediated and influenced by nucleotides, *Planta*, 191 (1993) 515-523.
- [100] S. Sakai, Regulatory functions of soluble auxin-binding proteins, *Int Rev Cytol*, 135 (1992) 239-267.
- [101] R. Chen, P. Hilson, J. Sedbrook, E. Rosen, T. Caspar, P.H. Masson, The *arabidopsis thaliana* AGRVITROPIC 1 gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 95 (1998) 15112-15117.
- [102] L. Hobbie, M. Estelle, Genetic approaches to auxin action, *Plant Cell Environ*, 17 (1994) 525-540.

- [103] N.A. Eckardt, *New insights into auxin biosynthesis*, *Plant Cell*, 13 (2001) 1-3.
- [104] P.J. Davies, *The plant hormones: Their nature, occurrence, and functions.*, in: P.J. Davies (Ed.) *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology.*, Kluwer, Boston, 1995, pp. 13-38.
- [105] G. Scherer, *Phospholipid signaling by phospholipase A2 in plants*, *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 48 (1994) 229-242.
- [106] G.F. Scherer, B. Andre, *A rapid response to a plant hormone: auxin stimulates phospholipase A2 in vivo and in vitro*, *Biochem Biophys Res Commun*, 163 (1989) 111-117.
- [107] G.F. Scherer, *Phospholipase A2 and phospholipid-activated protein kinase in plant signal transduction*, *Symp Soc Exp Biol*, 44 (1990) 257-270.
- [108] B. Andre, G.F. Scherer, *Stimulation by auxin of phospholipase A in membrane vesicles from an auxin-sensitive tissue is mediated by an auxin receptor*, *Planta*, 185 (1991) 209-214.
- [109] G.F.E. Scherer, *Phospholipid signalling and lipid-derived second messengers in plants.*, *Plant Growth Regul.*, 18 (1996) 125-133.
- [110] J. Friml, *Auxin transport - shaping the plant*, *Curr Opin Plant Biol*, 6 (2003) 7-12.
- [111] S. Simon, J. Petrasek, *Why plants need more than one type of auxin*, *Plant Sci*, 180 454-460.
- [112] B.R. Bonner J, *Studies of the Physiology, Pharmacology, and Biochemistry of the Auxins.*, *Annual Review of Plant Physiology*, 3 (1952) 59-86.
- [113] M.H. Gelb, I. Kudo, *[Phospholipase A2 inhibitor]*, *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 45 (2000) 1065-1071.
- [114] G.F.E. Scherer, R.U. Paul, A. Holk, *Phospholipase A2 in auxin and elicitor signal transduction in cultured parsley cells (Petroselinum crispum L.)*, *Plant Growth Reg.* 32 (2000) 123-128.
- [115] R. Paul, A. Holk, G.F.E. Scherer, *Fatty acids and lysophospholipids as potential second messengers in auxin action. Rapid activation of phospholipase A2 activity by auxin in suspension-cultured parsley and soybean cells*, *The Plant Journal*, 16 (1998) 601-611.
- [116] R.S. Bandurski, J.D. Cohen, J. Slovin, D.M. Reinecke, *Auxin biosynthesis and metabolism*, in: K. Academic (Ed.) *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth Development*, vol. 2nd ed., Davies, P. J. ed., Dordrecht, Netherlands, 1995, pp. 39-65.
- [117] M.H. Gelb, J.H. Min, M.K. Jain, *Do membrane-bound enzymes access their substrates from the membrane or aqueous phase: interfacial versus non-interfacial enzymes*, *Biochim Biophys Acta*, 1488 (2000) 20-27.
- [118] B. Gzyl-Malcher, M. Filek, G. Brezesinski, *Mixed DPPC/DPTAP monolayers at the air/water interface: influence of indolilo-3-acetic acid and selenate ions on the monolayer morphology*, *Langmuir*, 27 10886-10893.
- [119] S.C. Oliver, M.A. Venis, R.B. Freedman, R.M. Napier, *Regulation of synthesis and turnover of maize auxin-binding protein and observations on its passage to the plasma membrane: comparisons to maize immunoglobulin-binding protein cognate*, *Planta*, 197 (1995) 465-474.
- [120] J. Henderson, A.E. Atkinson, C.M. Lazarus, C.R. Hawes, R.M. Napier, H. Macdonald, L.A. King, *Stable expression of maize auxin-binding protein in insect cell lines*, *FEBS Lett*, 371 (1995) 293-296.
- [121] A.W. Woodward, B. Bartel, *A receptor for auxin*, *Plant Cell*, 17 (2005) 2425-2429.
- [122] G.F. Scherer, C. Labusch, Y. Effendi, *Phospholipases and the Network of Auxin Signal Transduction with ABPI and TIR1 as Two Receptors: A Comprehensive and Provocative Model*, *Frontiers in plant science*, 3 (2012) 56.
- [123] M. Sauer, J. Kleine-Vehn, *AUXIN BINDING PROTEIN1: the outsider*, *Plant Cell*, 23 (2011) 2033-2043.
- [124] R.R. Madoery, C.G. Gattone, G.D. Fidelio, *The effect of phospholipase A(2) immobilization upon calcium interaction: a kinetic study*, *J Biochem*, 126 (1999) 1060-1066.
- [125] R.R. Madoery, G.D. Fidelio, *A simple method to obtain a covalent immobilized phospholipase A(2)*, *Bioorg Med Chem Lett*, 11 (2001) 1663-1664.
- [126] R. Madoery, G. Fidelio, *The interaction between phospholipase A2 and calcium cofactor.*, in: A.B. C. Condat (Ed.) *Recent Research Developments in Biophysical Chemistry*, Research Signpost, 2002.
- [127] R. Madoery, C. González Gattone, G. Fidelio, *Bioconversion of phospholipids by immobilized phospholipase A2*, *J. Biotechnology*, 40 (1995) 145-153.
- [128] R. Madoery, M. Minchiotti, *Cibacron Blue-Eupergit, an affinity matrix for soybean (Glycine max) phospholipase A2 purification*, *Enzyme and Microbial Technology*, 38 (2006) 869-872.
- [129] A. Pearson, *A blast from the past: whatever happened to the 'new nursing' and 'nursing beds'?*, *Int J Nurs Pract*, 9 (2003) 67-69.

- [130] R.D. Finn, J. Mistry, B. Schuster-Bockler, S. Griffiths-Jones, V. Hollich, T. Lassmann, S. Moxon, M. Marshall, A. Khanna, R. Durbin, S.R. Eddy, E.L. Sonnhammer, A. Bateman, Pfam: clans, web tools and services, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) D247-251.
- [131] E. Gasteiger, A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R.D. Appel, A. Bairoch, ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 3784-3788.
- [132] O. Emanuelsson, S. Brunak, G. von Heijne, H. Nielsen, Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools, *Nat Protoc.* 2 (2007) 953-971.
- [133] J.D. Thompson, T.J. Gibson, D.G. Higgins, Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX, *Curr Protoc Bioinformatics*, Chapter 2 (2002) Unit 2.3.
- [134] J.J. Campanella, L. Bitincka, J. Smalley, MatGAT: an application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences, *BMC Bioinformatics*, 4 (2003) 29.
- [135] G.E. Crooks, G. Hon, J.M. Chandonia, S.E. Brenner, WebLogo: a sequence logo generator, *Genome Res.* 14 (2004) 1188-1190.
- [136] J.D. Retief, Phylogenetic analysis using PHYLIP, *Methods Mol Biol.* 132 (2000) 243-258.
- [137] M. Murakami, Y. Taketomi, Y. Miki, H. Sato, T. Hirabayashi, K. Yamamoto, Recent progress in phospholipase A(2) research: from cells to animals to humans, *Prog Lipid Res.* 50 (2010) 152-192.
- [138] Y. Zhang, I-TASSER server for protein 3D structure prediction, *BMC Bioinformatics*, 9 (2008) 40.
- [139] Y. Zhang, I-TASSER: fully automated protein structure prediction in CASP8, *Proteins*, 77 Suppl 9 (2009) 100-113.
- [140] M.S. Choi, K.C. Rhee, Production and processing of soybeans and nutrition and safety of isoflavone and other soy products for human health, *J Med Food*, 9 (2006) 1-10.
- [141] C. Oostenbrink, A. Villa, A.E. Mark, W.F. van Gunsteren, A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6, *J Comput Chem*, 25 (2004) 1656-1676.
- [142] V. Hornak, R. Abel, A. Okur, B. Strockbine, A. Roitberg, C. Simmerling, Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters, *Proteins*, 65 (2006) 712-725.
- [143] H.J.C. Berendsen, J.R. Grigera, T.P. Straatsma, The missing term in effective pair potentials., *J Phys Chem*, 91 (1987) 6269-6271.
- [144] W.L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J.D. Madura, R.W. Impey, M.L. Klein, Comparison of single potential functions for simulating liquid water., *J Chem Phys*, 79 (1983) 2577-2637.
- [145] E. Project, E. Nachliel, M. Gutman, Parameterization of Ca²⁺-protein interactions for molecular dynamics simulations, *J Comput Chem*, 29 (2008) 1163-1169.
- [146] T. Darden, D. York, L. Pedersen, Particle mesh Ewald: An N-log(N) method for Ewald sums in large systems., *J Chem Phys*, 98 (1993) 10089-10092.
- [147] U. Essmann, L. Perera, M.L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, L.G. Pedersen, A smooth particle mesh Ewald potential., *J Chem Phys*, 103 (1995) 8577-8592.
- [148] G. Bussi, D. Donadio, M. Parrinello, Canonical sampling through velocity rescaling, *J Chem Phys*, 126 (2007) 014101.
- [149] H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, A. DiNola, J.R. Haak, Molecular dynamics with coupling to an external bath., *J Phys Chem*, 81 (1984) 3684-3690.
- [150] B. Hess, H. Beckker, H.J.C. Berendsen, J.G.E.M. Fraaije, LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations., *J Comput Chem*, 18 (1997) 1463-1472.
- [151] S. Miyamoto, P.A. Kollman, SETTLE: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithms for rigid water models, *J Comput Chem*, 13 (1992) 952-962.
- [152] K.A. Feenstra, B. Hess, H.J.C. Berendsen, Improving efficiency of large time-scale molecular dynamics simulation of hydrogen-rich systems, *J Comput Chem*, 20 (1999) 786-798.
- [153] W. Kabsch, C. Sander, Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features, *Biopolymers*, 22 (1983) 2577-2637.
- [154] D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A.E. Mark, H.J. Berendsen, GROMACS: fast, flexible, and free, *J Comput Chem*, 26 (2005) 1701-1718.
- [155] B. Hess, C. Kutzner, D. van Der Spoel, E. Lindahl, GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulations., *J Chem Theory Comp*, 4 (2008) 435-447.
- [156] A.M. Catanzariti, T.A. Soboleva, D.A. Jans, P.G. Board, R.T. Baker, An efficient system for high-level expression and easy purification of authentic recombinant proteins, *Protein Sci*, 13 (2004) 1331-1339.
- [157] T. Baczek, R. Kaliszán, Quantitative structure/retention relationships in affinity chromatography, *J Biochem Biophys Methods*, 49 (2001) 83-98.

- [158] B.M. Dunn, M. Lewitt, C. Pham, Inhibition of pepsin by analogues of pepsinogen-(1-12)-peptide with substitutions in the 4-7 sequence region, *Biochem J*, 209 (1983) 355-362.
- [159] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227 (1970) 680-685.
- [160] E.A. Dennis, Phospholipase A2 activity towards phosphatidylcholine in mixed micelles: surface dilution kinetics and the effect of thermotropic phase transitions, *Arch Biochem Biophys*, 158 (1973) 485-493.
- [161] M.J. Thomas, K. Pang, Q. Chen, D. Lyles, R. Hantgan, M. Waite, Lipid exchange between mixed micelles of phospholipid and triton X-100, *Biochim Biophys Acta*, 1417 (1999) 144-156.
- [162] J.M. Gutierrez, C. Avila, E. Rojas, L. Cerdas, An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica, *Toxicon*, 26 (1988) 411-413.
- [163] G.E. Hoffmann, D. Schmidt, B. Bastian, W.G. Guder, Photometric determination of phospholipase A, *J Clin Chem Clin Biochem*, 24 (1986) 871-875.
- [164] D. Lombardo, E.A. Dennis, Immobilized phospholipase A2 from cobra venom. Prevention of substrate interfacial and activator effects, *J Biol Chem*, 260 (1985) 16114-16121.
- [165] J. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., Springer, New York, 2006.
- [166] R.E. Brown, H.L. Brockman, Using monomolecular films to characterize lipid lateral interactions, *Methods Mol Biol*, 398 (2007) 41-58.
- [167] Wilke, N., Tesis de Doctorado: Estudio estructural de películas de lípidos tipo Langmuir blodgett a través del efecto sobre reacciones de transferencia de carga., in, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, 2003.
- [168] B. K.S., *Lipid and Biopolymer Monolayers at Liquid Interfaces*, Springer, New York/Londen, (1989).
- [169] R. Verger, G.H. De Haas, Enzyme reactions in a membrane model. I. A new technique to study enzyme reactions in monolayers, *Chem Phys Lipids*, 10 (1973) 127-136.
- [170] M.L. Fanani, B. Maggio, Mutual modulation of sphingomyelinase and phospholipase A2 activities against mixed lipid monolayers by their lipid intermediates and glycosphingolipids, *Mol Membr Biol*, 14 (1997) 25-29.
- [171] G. Zografi, R. Verger, G.H. de Haas, Kinetic analysis of the hydrolysis of lecithin monolayers by phospholipase A, *Chem Phys Lipids*, 7 (1971) 185-206.
- [172] N. Singh, R.K. Sonvanshi, S. Sharma, S. Dey, P. Kaur, T.P. Singh, Structural elements of ligand recognition site in secretory phospholipase A2 and structure-based design of specific inhibitors, *Curr Top Med Chem*, 7 (2007) 757-764.
- [173] B.J. Bahnsen, Structure, function and interfacial allostereism in phospholipase A2: insight from the anion-assisted dimer, *Arch Biochem Biophys*, 433 (2005) 96-106.
- [174] A. Kumar, C. Sekharudu, B. Ramakrishnan, C.M. Dupureur, H. Zhu, M.D. Tsai, M. Sundaralingam, Structure and function of the catalytic site mutant Asp 99 Asn of phospholipase A2: absence of the conserved structural water, *Protein Sci*, 3 (1994) 2082-2088.
- [175] K. Sekar, B.Z. Yu, J. Rogers, J. Lutton, X. Liu, X. Chen, M.D. Tsai, M.K. Jain, M. Sundaralingam, Phospholipase A2 engineering. Structural and functional roles of the highly conserved active site residue aspartate-99, *Biochemistry*, 36 (1997) 3104-3114.
- [176] R.R. Annand, M. Kontoyianni, J.E. Penzotti, T. Dudler, T.P. Lybrand, M.H. Gelb, Active site of bee venom phospholipase A2: the role of histidine-34, aspartate-64 and tyrosine-87, *Biochemistry*, 35 (1996) 4591-4601.
- [177] J.J. Daniele, I.D. Bianco, G.D. Fidelio, Kinetic and pharmacologic characterization of phospholipases A2 from *Bothrops neuwiedii* venom, *Arch Biochem Biophys*, 318 (1995) 65-70.
- [178] J.J. Daniele, I.D. Bianco, C. Delgado, D.B. Carrillo, G.D. Fidelio, A new phospholipase A2 isoform isolated from *Bothrops neuwiedii* (Yarara chica) venom with novel kinetic and chromatographic properties, *Toxicon*, 35 (1997) 1205-1215.
- [179] P.J. Yunes Quartino, J.L. Barra, G.D. Fidelio, Cloning and functional expression of secreted phospholipases A(2) from *Bothrops diporus* (Yarara Chica), *Biochem Biophys Res Commun*, 427 (2012) 321-325.
- [180] J.I. dos Santos, M. Cintra-Francischinelli, R.J. Borges, C.A. Fernandes, P. Pizzo, A.C. Cintra, A.S. Braz, A.M. Soares, M.R. Fontes, Structural, functional, and bioinformatics studies reveal a new snake venom homologue phospholipase A class, *Proteins*, 79 (2010) 61-78.
- [181] L.S. Caves, J.D. Evanseck, M. Karplus, Locally accessible conformations of proteins: multiple molecular dynamics simulations of crambin, *Protein Sci*, 7 (1998) 649-666.
- [182] X. Daura, K. Gademann, B. Jaun, D. Seebach, W.F. van Gunsteren, A.E. Mark, Peptide Folding: When simulation meets experiment., *Angew Chem Int Ed*, 38 (1999) 236-240.

- [183] L. Yu, E.A. Dennis, Critical role of a hydrogen bond in the interaction of phospholipase A2 with transition-state and substrate analogues, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (1991) 9325-9329.
- [184] J. Rogers, B.Z. Yu, M.D. Tsai, O.G. Berg, M.K. Jain, Cationic residues 53 and 56 control the anion-induced interfacial k^{cat} activation of pancreatic phospholipase A2, *Biochemistry*, 37 (1998) 9549-9556.
- [185] A. Bourbon-Freie, R.E. Dub, X. Xiao, M.E. Lowe, Trp-107 and trp-253 account for the increased steady state fluorescence that accompanies the conformational change in human pancreatic triglyceride lipase induced by tetrahydrolipstatin and bile salt, *J Biol Chem*, 284 (2009) 14157-14164.
- [186] J. Seco, F.J. Luque, X. Barril, Binding site detection and druggability index from first principles, *J Med Chem*, 52 (2009) 2363-2371.
- [187] M.K. Jain, O.G. Berg, Coupling of the i-face and the active site of phospholipase A2 for interfacial activation, *Curr Opin Chem Biol*, 10 (2006) 473-479.
- [188] R. Othman, S. Baker, Y. Li, A.F. Worrall, D.C. Wilton, 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 (1996) 92-102.
- [189] Y.L. Chiou, S.R. Lin, L.S. Chang, Mutations on N-terminal region of Taiwan cobra phospholipase A(2) result in structurally distorted effects, *J Pept Sci*, 14 (2008) 890-897.
- [190] Y.L. Chiou, Y.C. Cheng, P.H. Kao, J.J. Wang, L.S. Chang, Mutations on the N-terminal region abolish differentially the enzymatic activity, membrane-damaging activity and cytotoxicity of Taiwan cobra phospholipase A2, *Toxicon*, 51 (2008) 270-279.
- [191] G.J. van Scharrenburg, E.H. Jansen, M.R. Egmond, G.H. de Haas, A.J. Slotboom, Structural importance of the amino-terminal residue of pancreatic phospholipase A2, *Biochemistry*, 23 (1984) 6285-6294.
- [192] K. Kuchler, M. Gmachi, M.J. Sippl, G. Kreil, Analysis of the cDNA for phospholipase A2 from honeybee venom glands. The deduced amino acid sequence reveals homology to the corresponding vertebrate enzymes, *Eur J Biochem*, 184 (1989) 249-254.
- [193] R.M. Kini, Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes, *Toxicon*, 42 (2003) 827-840.
- [194] R.V. Ameratunga, R. Hawkins, R. Prestidge, J. Marbrook, A high efficiency method for purification and assay of bee venom phospholipase A2, *Pathology*, 27 (1995) 157-160.
- [195] G.A. Kohler, A. Brenot, E. Haas-Stapleton, N. Agabian, R. Deva, S. Nigam, Phospholipase A2 and phospholipase B activities in fungi, *Biochim Biophys Acta*, 1761 (2006) 1391-1399.
- [196] G.H. De Haas, Postema, N.M., Nieuwenhuizen, W., van Deenen, L.L., Purification and properties of phospholipase A from porcine pancreas, *Biochim Biophys Acta*, 159 (1968) 103-117.
- [197] A.B. Bacha, Y. Gargouri, S. Bezzine, H. Mejdoub, Purification and biochemical characterization of phospholipase A2 from dromedary pancreas, *Biochim Biophys Acta*, 1760 (2006) 1202-1209.
- [198] R.A. Shipolini, G.L. Callewaert, R.C. Cottrell, S. Doonan, C.A. Vernon, B.E. Banks, Phospholipase A from bee venom, *Eur J Biochem*, 20 (1971) 459-468.
- [199] R.M. Kramer, C. Hession, B. Johansen, G. Hayes, P. McGray, E.P. Chow, R. Tizard, R.B. Pepinsky, Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A2, *J Biol Chem*, 264 (1989) 5768-5775.
- [200] R.A. Deems, E.A. Dennis, Phospholipase A2 from cobra venom (*Naja naja naja*), *Methods Enzymol*, 71 Pt C (1981) 703-710.
- [201] P.L. Darke, A.A. Jarvis, R.A. Deems, E.A. Dennis, Further characterization and N-terminal sequence of cobra venom phospholipase A2, *Biochim Biophys Acta*, 626 (1980) 154-161.
- [202] J.P. Noel, C.A. Bingman, T.L. Deng, C.M. Dupureur, K.J. Hamilton, R.T. Jiang, J.G. Kwak, C. Sekharudu, M. Sundaralingam, M.D. Tsai, Phospholipase A2 engineering. X-ray structural and functional evidence for the interaction of lysine-56 with substrates, *Biochemistry*, 30 (1991) 11801-11811.
- [203] A. Cornish-Bowden, *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, Portland Press, London, UK, 1995.
- [204] G.M. Curman, R.A. Deems, E.A. Dennis, Lipid signaling enzymes and surface dilution kinetics, *J Biol Chem*, 270 (1995) 18711-18714.
- [205] J.J. Vobwerk, P.C. Jost, G.H. de Haas, O.H. Griffith, Activation of porcine pancreatic phospholipase A2 by the presence of negative charges at the lipid-water interface, *Biochemistry*, 25 (1986) 1726-1733.
- [206] S.A. Tatullian, 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 (2001) 789-800.

- [207] A.H. Pande, S. Qin, K.N. Nemecek, X. He, S.A. Tatulian, Isoform-specific membrane insertion of secretory phospholipase A2 and functional implications, *Biochemistry*, 45 (2006) 12436-12447.
- [208] P. Norberg, L. Engstrom, R. Nilsson, C. Liljenberg, Phase behaviour and molecular species composition of oat root plasma membrane lipids. Influence of induced dehydration tolerance, *Biochim Biophys Acta*, 1112 (1992) 52-56.
- [209] N.J. Rowe, J. Tunstall, L. Galbraith, S.G. Wilkinson, Lipid composition and taxonomy of [*Pseudomonas*] *echinoides*: transfer to the genus *Sphingomonas*, *Microbiology*, 146 (Pt 11) (2000) 3007-3012.
- [210] J.A.L.G. M.H. Blanchet, D. Memard, V. Oorschot, S. Baflast, G. Minchiotti, J. Klumperman, D.B. Constam Cripto recruits Furin and PACE4 and controls Nodal trafficking during proteolytic maturation, *EMBO J* 27 (2008) 2580-2591.
- [211] B.M. J.J. Daniele, I.D. Bianco, F.M. Goni, A. Alonso, G.D. Fidelio, Inhibition by gangliosides of *Bacillus cereus* phospholipase C activity against monolayers, micelles and bilayer vesicles, *Eur J Biochem* 239 (1996) 105-110.
- [212] P.H. M. Campagnoli, L. Dolcini, G. Caridi, M. Dagnino, G. Candiano, M. Bruschi, L. Palmqvist, M. Galliano, L. Minchiotti, Analbuminemia in a Swedish male is caused by the Kayseri mutation (c228_229delAT), *Clin Chim Acta* 396 (2008) 89-92.
- [213] L. De Tullio, M.L. Fanani, B. Maggio, Surface mixing of products and substrate of PLA(2) in enzyme-free mixed monolayers reproduces enzyme-driven structural topography, *Biochim Biophys Acta*, 1828 (2013) 2056-2063.
- [214] R. Verger, J. Rietsch, F. Pattus, F. Ferrato, G. Pieroni, G.H. De Haas, P. Desmuelle, Studies of lipase and phospholipase A2 acting on lipid monolayers, *Adv Exp Med Biol*, 101 (1978) 79-94.
- [215] G.M. A. Fico, M. Simeone, S. Guido, G. Minchiotti, S. Filosa, H., High-throughput screening-compatible single-step protocol to differentiate embryonic stem cells in neurons, *Stem Cells Dev* 17 (2008) 573-584.
- [216] M.K. Jain, J. Rogers, D.V. Jahagirdar, J.F. Marecek, F. Ramirez, Kinetics of interfacial catalysis by phospholipase A2 in intravesicle scooting mode, and heterofusion of anionic and zwitterionic vesicles, *Biochim Biophys Acta*, 860 (1986) 435-447.
- [217] J.D. Bell, M. Burnside, J.A. Owen, M.L. Royall, M.L. Baker, Relationships between bilayer structure and phospholipase A2 activity: interactions among temperature, diacylglycerol, lysolecithin, palmitic acid, and dipalmitoylphosphatidylcholine, *Biochemistry*, 35 (1996) 4945-4955.
- [218] H.W. Huang, E.M. Goldberg, R. Zidovetzki, Ceramide induces structural defects into phosphatidylcholine bilayers and activates phospholipase A2, *Biochem Biophys Res Commun*, 220 (1996) 834-838.
- [219] B. Maggio, I.D. Bianco, G.G. Montich, G.D. Fidelio, R.K. Yu, Regulation by gangliosides and sulfatides of phospholipase A2 activity against dipalmitoyl- and dilauroylphosphatidylcholine in small unilamellar bilayer vesicles and mixed monolayers, *Biochim Biophys Acta*, 1190 (1994) 137-148.
- [220] O. Albrecht, Gruler, H and Sackmann, E., Pressure-composition phase diagrams of cholesterol/lecithin, cholesterol/phosphatidic acid, and lecithin/phosphatidic acid mixed monolayers: A Langmuir film balance study, *Journal of Colloid and Interface Science*, 79 (1981) 319-325.
- [221] R.A. Demel, Monolayers--description of use and interaction, *Methods Enzymol*, 32 (1974) 539-544.
- [222] H. Möhwald, *Phospholipid Handbook* (G.Cevec, ed.), (1993) 579-602.
- [223] G.D. Fidelio, B. Maggio, F.A. Cumar, Interaction of myelin basic protein, melittin and bovine serum albumin with gangliosides, sulphatide and neutral glycosphingolipids in mixed monolayers, *Chem Phys Lipids*, 35 (1984) 231-245.
- [224] B.A. Isse, P. Yunes Quartino, G.D. Fidelio, R.N. Farias, Thyroid hormones-membrane interaction: reversible association of hormones with organized phospholipids with changes in fluidity and dipole potential, *Chem Phys Lipids*, 175-176 (2013) 131-137.
- [225] V. Point, A. Benarouche, I. Jemel, G. Parsiegla, G. Lambeau, F. Carriere, J.F. Cavalier, Effects of the propeptide of group X secreted phospholipase A(2) on substrate specificity and interfacial activity on phospholipid monolayers, *Biochimie*, 95 51-58.
- [226] I. Panatov, R. Verger, Enzymatic reactions at interfaces: interfacial and temporal organization of enzymatic lipolysis, A. Baszkin, W. Norde (Eds.) ed., Marcel Dekker, Inc, New York, USA, 2000.

Publicaciones y Congresos

El presente trabajo de Tesis dio lugar a las siguientes publicaciones:

"AUXINS ACTION ON Glycine max SECRETORY PHOSPHOLIPASE A2 IS MEDIATED BY THE INTERFACIAL PROPERTIES IMPOSED BY THE PHYTOHORMONES". María E Mariani, Ricardo Madoery, Gerardo D Fidelio. Aceptado con revisiones en *Chemistry and Physics of Lipids*, 2015.

"KINETIC CHARACTERIZATION, OPTIMUM CONDITIONS FOR CATALYSIS AND SUBSTRATE PREFERENCE OF SECRETORY PHOSPHOLIPASE A2 FROM GLYCINE MAX IN MODEL MEMBRANE SYSTEMS". María E Mariani, Ricardo Madoery, Gerardo D Fidelio. *Biochimie*, 2014, Vol. 108, p 48-58.

"IN SILICO AND IN VITRO CHARACTERIZATION OF PHOSPHOLIPASE A2 ISOFORMS FROM SOYBEAN (GLYCINE MAX)". María E Mariani, Marcos Villarreal, Foo Cheung, Ezequiel Leyva, Ricardo Madoery, Gerardo D Fidelio. *Biochimie*, 2012, Vol. 94 p. 2608 - 2619.

Presentaciones en congresos

XLIII REUNION ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE BIOFISICA (SAB). Sierra de la Ventana (Buenos Aires), desde el 3 al 5 de Diciembre de 2014. **POSTER: "AUXINS ACTION ON Glycine max SECRETORY PHOSPHOLIPASE A2 IS MEDIATED BY THE INTERFACIAL PROPERTIES IMPOSED BY THE PHYTOHORMONES"**. María E Mariani, Ricardo Madoery, Gerardo Fidelio

XVI REUNION ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE BIOFISICA (SAB). Carlos Paz (Córdoba), desde el 2 al 4 de Diciembre de 2013. **KINETIC CHARACTERIZATION AND SUBSTRATE PREFERENCE OF GmsPLA₂-XIA-1 AND GmsPLA₂-XIB-2 IN MODEL MEMBRANE SYSTEMS**. María E Mariani, Ricardo Madoery, Gerardo Fidelio

XLI REUNION ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE BIOFISICA (SAB). San Javier (Tucumán), desde el 5 al 7 de Diciembre de 2012. **SECRETORY PHOSPHOLIPASE A₂ FROM GLYCINE MAX: FUNCTIONAL PARAMETERS AND SUBSTRATE PREFERENCE**. María E Mariani, Ricardo Madoery, Gerardo Fidelio

XLIV REUNION ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE FARMACOLOGIA EXPERIMENTAL (SAFE). Mendoza, 31 de octubre al 2 de noviembre de 2012. **PRODUCTOS NATURALES INHIBIDORES DE sPLA₂**. Anselmo T, Mariani M, Yanes P, Vallejo M, Fidelio G, Agnese A.

56TH ANNUAL MEETING OF THE BIOPHYSICAL SOCIETY. San Diego, California, del 25 al 29 de febrero de 2012. **A NEW SECRETORY PHOSPHOLIPASE A2 FROM GLYCINE MAX (SOYBEAN): PURIFICATION, CHARACTERIZATION AND KINETIC ANALYSIS**. María E Mariani, Ricardo Madoery, Gerardo Fidelio

XL REUNION ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE BIOFISICA. Capital Federal, Buenos Aires, desde el 5 al 7 de diciembre de 2011. **FOSFOLIPASA A₂ SECRETORIA DE GLYCINE MAX (SOJA): PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA CATÁLISIS**. María E Mariani, Ricardo Madoery, Gerardo Fidelio

V JORNADAS DE POSGRADO FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS. Del 30 de noviembre al 1 de diciembre de 2011. Facultad de Ciencias Químicas de Córdoba- Argentina. **IDENTIFICATION, SEQUENCE, PHYLOGENETIC ANALYSIS AND MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION OF A NEW SECRETORY PHOSPHOLIPASE A2 FROM GLYCINE MAX SOYBEAN**. María E Mariani, Marcos Villarreal, Ricardo Madoery y Gerardo Fidelio

XIII JORNADAS ANUALES DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE BIOLOGÍA. 2da Reunión Conjunta de las **SOCIEDADES DE BIOLOGIA DE LA REPÚBLICA ARGENTINA**. Centro de Convenciones y Centro Cultural, Ciudad de San Juan, del 17 al 19 de Agosto de 2011. **INMUNOPURIFICACIÓN DE FOSFOLIPASA A2 SECRETORIA DE SEMILLA DE SOJA (Glycine max)**. Minichiotti, M., Mariani, M. E., Fidelio, G, Madoery, R

XXXIX ANNUAL MEETING OF THE ARGENTINIAN BIOPHYSICAL SOCIETY 2010 - 3RD LATIN AMERICAN PROTEIN SOCIETY MEETING. Salta, Argentina, 2010. "IDENTIFICATION, SEQUENCE, PHYLOGENETIC ANALYSIS AND MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION OF A NEW SECRETORY PHOSPHOLIPASE A2 FROM GLYCINE MAX SOYBEAN". *Maria E Mariani, Marcos Villareal, Ricardo Madoery, Gerardo Fidelio.*

AABBC PRIMER CONGRESO ARGENTINO DE BIOINFORMÁTICA Y BIOLOGÍA COMPUTACIONAL. Quilmes, Argentina, 2010. "IDENTIFICATION, SEQUENCE AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF A NEW SECRETORY PHOSPHOLIPASE A2 FROM GLYCINE MAX SOYBEAN". *Maria E Mariani, Ricardo Madoery, Gerardo Fidelio.*

XVII JORNADAS CIENTÍFICAS DE LA SOCIEDAD DE BIOLOGÍA DE CÓRDOBA. Huerta Grande, Córdoba, Argentina, 2009. "LA ORGANIZACIÓN SUPRAMOLECULAR DE FOSFOLÍPIDOS Y LA HIDRÓLISIS CATALIZADA POR FOSFOLIPASA A2 DE SOJA (GLYCINE MAX)". *Madoery R, Minchiotti M, Mariani E, Aguirre V, Coronel CE*