

00361

3
20

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS



**FOSFOLIPASA NEUROTOXICA DEL VENENO DE LA SERPIENTE
Oxyuranus scutellatus scutellatus: PURIFICACION,
SECUENCIA DE AMINOACIDOS Y CRISTALIZACION.**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MAESTRIA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)
P R E S E N T A
JOSE AMEZCUA LOPEZ

MEXICO, D. F.

1991



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INDICE.

RESUMEN	6
INTRODUCCION	7
1.- Enfoque de la tesis	7
2.- Las fosfolipasas	8
a) Tipos de fosfolipasas	8
b) Propiedades moleculares	9
c) Mecanismo de catálisis	12
d) Análisis por difracción de rayos X	15
3.- Objetivos de esta Tesis	20
MATERIAL Y METODOS.	21
a) Fuente del veneno	21
b) Medición de proteína	21
c) Determinación de actividad de fosfolipasa	21
d) Pruebas de toxicidad	21
e) Técnicas de purificación	21
1.- Esquema general de purificación	21
2.- Centrifugación	23
3.- Diálisis	23
4.- Cromatografías de intercambio iónico	23
5.- Cromatografía de afinidad	23
6.- Cromatografía líquida de alta presión	23
7.- Electroforesis	24

f) Reducción y carboximetilación	24
g) Análisis de aminoácidos	24
h) Secuencia de aminoácidos	24
i) Especificidad de la fosfolipasa	25
j) Ensayos de cristalización	25
k) Desarrollo de programas de cálculo	26
1.- Programa para la cuantificación de la actividad de fosfolipasa	26
2.- Programa para la cuantificación de un análisis de aminoácidos	27
RESULTADOS	28
a) Purificación por cromatografías	28
b) Caracterización química de la enzima	37
1.- Análisis de aminoácidos	37
2.- Secuencia de aminoácidos	42
c) Caracterización funcional de la enzima	51
d) Ensayos de cristalización	51
DISCUSION	57
CONCLUSIONES	67
APENDICE	68
BIBLIOGRAFIA	71

RESUMEN.

En el presente trabajo se ha purificado a homogeneidad una fosfolipasa A_2 neurotóxica del veneno de la serpiente Oxyuranus scutellatus scutellatus por medio de tres cromatografías de intercambio iónico y una cromatografía de afinidad.

La enzima purificada tiene un peso molecular de 16000 y el análisis de aminoácidos revela que la enzima se compone de 150 residuos.

La actividad de fosfolipasa es del tipo A_2 y además es dependiente de Ca^{++} .

Se ha secuenciado el 50% de la enzima. Existe una gran similitud con otras fosfolipasas de veneno de serpientes. Los aminoácidos que enlazan al ion Ca^{++} son invariantes en nuestra enzima con respecto a otras fosfolipasas como la fosfolipasa de páncreas bovino y de Crotalus atrox, mientras que los del sitio activo presentan algunas substituciones.

Se realizaron ensayos de cristalización por medio de la técnica de difusión de vapor de gota suspendida. Se obtuvieron cristales en las siguientes condiciones: La enzima disuelta en amortiguador de Tris-HCl pH 8.0 10 mM y $CaCl_2$ 10 mM a una concentración de 16.0 mg/ml de proteína, utilizando como agente precipitante polietilen glicol 6000 a una concentración de 5% y 20% v/v.

INTRODUCCIÓN.

1.- ENFOQUE DE LA TESIS.

El estudio de la correlación existente entre la estructura y función de las proteínas y ácidos nucleicos, han sido objeto de estudio de muchos grupos de investigación en bioquímica fisiología, cristalografía, química y biología molecular en los últimos cuarenta años.

Con el desarrollo de las técnicas modernas de purificación de proteínas y ácidos nucleicos y con el surgimiento de equipos computarizados, es posible aislar a homogeneidad una serie de proteínas (macromoléculas) de las cuales se determinaron sus estructuras primarias, secundarias, terciarias, y para las proteínas oligoméricas inclusive su estructura cuaternaria.

La determinación de la secuencia de aminoácidos de familias de proteínas seleccionadas por su función, permitió verificar la importancia de regiones conservadas en la estructura primaria. A su vez la aplicación de la difracción de rayos X al estudio de estas proteínas, permitió localizar estos sitios altamente conservados, en tres dimensiones, demostrándose que de manera general, ellos corresponden a los llamados sitios activos o catalíticos de proteínas (enzimas) en estudio.

La modificación química de residuos de aminoácidos en posiciones determinadas ha permitido aumentar el conocimiento de la relación existente entre la estructura y función de muchas proteínas. Más recientemente el uso de la síntesis química de péptidos y la introducción de la ingeniería genética con la clonación de genes y la mutación puntual dirigida ha permitido completar el panorama más avanzado del conocimiento en el área de estudio del binomio estructura-función de macromoléculas (proteínas y ácidos nucleicos).

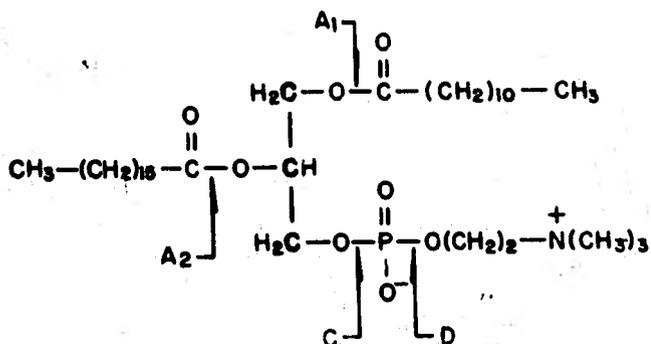
En esta tesis se realizó un trabajo de purificación de una proteína modelo, con actividad enzimática, fosfolipasa A₂ y neurotóxica obtenida del veneno de Oxiurus scutellatus scutellatus de Australia. La enzima fue secuenciada en gran parte y se obtuvieron cristales con la finalidad de estudiar posteriormente la estructura de la molécula por medio de la técnica de difracción de rayos X.

El enfoque de esta tesis es primeramente estructural. Pretendemos conocer como es la molécula químicamente y si es posible, tridimensionalmente, para poder hacer preguntas relevantes con respecto a las dos funciones principales descubiertas hasta ahora en esta proteína: enzima hidrolítica con especificidad a fosfolípidos y actividad neurotóxica. La enzima mata a ratones experimentales con síntomas de intoxicación típico de neurotoxinas.

2.- LAS FOSFOLIPASAS.

a) TIPOS DE FOSFOLIPASAS.

Las fosfolipasas son enzimas que hidrolizan fosfolípidos. Existen varias denominaciones según el enlace del fosfolípido que es hidrolizado:



En este esquema general de un fosfolípido están indicados los carbonos 1 a 3 del glicerol (en negrita) y los enlaces ésteres con los ácidos grasos laterales, así como el grupo fosfato en la posición 3. A el mismo se indica la posición de la cadena lateral que forma el enlace fosfoéster; esta puede ser una base, aminoácido o inositol, entre otros grupos químicos.

Según el sitio de corte la fosfolipasa se llamará A₁, A₂, B, C, o D. Es fosfolipasa A₁ si hidroliza el enlace éster en la posición 1, es de tipo A₂ si hidroliza el éster de la posición 2, es de tipo B si hidroliza ambos enlaces y será de tipo C y D si hidroliza el enlace fosfoéster, a la izquierda o a la derecha del grupo fosfato como se indica en el esquema de esta página.

b) PROPIEDADES MOLECULARES.

Las fosfolipasas A₂ (E.C. 3.1.1.4) de los venenos de serpiente son una enzimas extracelulares relativamente abundantes, forman al rededor del 5% del total de las proteínas del veneno completo.

Debido a la relativa abundancia de actividad de fosfolipasa en los venenos de serpiente del grupo de los elápidos, estos son fuentes importantes de material para la purificación de esta enzima. Los patrones de purificación de la fosfolipasa de veneno presentan mucho más picos de actividad que los obtenidos en la purificación de fosfolipasas de páncreas, esta variedad de enzimas puede ser explicada considerando los siguientes puntos:

- 1.- La presencia de isoenzimas con diferentes propiedades, especialmente con relación a su carga.
- 2.- Agregación de moléculas de fosfolipasa dando origen a pesos moleculares que van desde 14000 a 40000.
- 3.- Combinación de la enzima con componentes no enzimáticos (estos complejos pueden ser o no estables bajo las condiciones de purificación).
- 4.- Cambios en la carga de la fosfolipasa por desamidación y/o rompimiento proteolítico.

Las posibilidades 1.- y 2.- ocurren en Crotalus atrox.

La formación de complejos suele ocurrir en varios venenos incluido el de Oxirurus scutellatus scutellatus (Fohman 1976). En este veneno se ha descrito un complejo llamado Taipoxina formado por 3 cadenas polipeptídicas nombradas como subunidad α , β , γ . La subunidad α (pI>10) es la única subunidad que muestra neurotoxicidad letal y además tiene actividad de fosfolipasa A₂.

La subunidad β (pI=7.0) tiene dos formas β_1 y β_2 , que pueden ser separadas por cromatografía de intercambio iónico y difieren en su composición de aminoácidos.

La subunidad γ (pI<5) contiene todos los carbohidratos de la Taipoxina que son entre 4 y 5 residuos de ácido siálico. Las tres subunidades tienen similitud en secuencia, sin embargo el componente γ tiene 8 residuos más en el amino terminal (Fohman J. et al (1976)).

La taipoxina causa un bloqueo irreversible de la transmisión neuromuscular después de un período latente, el cual es inversamente proporcional a la concentración de la taipoxina, esta toxina actúa a nivel presináptico, se conocen aproximadamente otras doce fosfolipasas neurotóxicas con esta misma característica, sin embargo las propiedades estructurales que dan a estas fosfolipasas su actividad neurotóxicas no se conoce. Inn-Ho Teal et al. (1987) propone un posible dominio responsable de la neurotoxicidad, este modelo se basa en el

estudio de 42 secuencias de fosfolipasas neurotóxicas y de las secuencias de fosfolipasas de páncreas de mamíferos, para las cuales se calcularon la distribución de residuos cargados, hidrofobicidad y la estructura terciaria, los resultados se compararon entre sí obteniéndose lo siguiente: Todas las toxinas que actúan a nivel presináptico tienen 3 o 4 aminoácidos básicos más que las enzimas no neurotóxicas en las posiciones 59,60,65, 70-73 y 97 o 98. Además estos residuos básicos forman un cúmulo cercano a la región aminoterminal. La naturaleza cationica de este cúmulo básico es aumentada por el grupo α -amino del residuo amino terminal y el momento dipolo de las hélices formadas por los aminoácidos 95-110 y 1-10. Para estas toxinas el segmento 57-65 y la región amino terminal serían los posibles lugares donde la toxina se uniera a su receptor en la membrana presináptica. Las fosfolipasas no neurotóxicas no presentan una distribución de cargas positivas formando un cúmulo cercano de la región aminoterminal para el segmento (57-65).

Actualmente se conocen más de 42 secuencias de aminoácidos de fosfolipasas A_2 de vertebrados. Todas estas fosfolipasas muestran un alto grado de similitud, y probablemente se han desarrollado de un ancestro común (Mark, J. Dutton & Robert C. Hilder 1983). La fosfolipasa obtenida del veneno de abeja (Shipolini et. al 1974) es diferente en secuencia de aminoácidos a la de los vertebrados por lo que es difícil hacer estudios comparativos de semejanza de secuencia de aminoácidos con estas fosfolipasas. Solamente un péptido que rodea a la histidina-48 del centro activo (Ala-Cis-Cis-Arg-Tre-His-Asp-Met-Cis) es reconocible en la secuencia de la fosfolipasa de vertebrados. También se conoce la secuencia de la fosfolipasa A_2 del veneno de lagarto venenoso Heloderma horridum horridum (Sosa P.B. et. al 1986) o monstruo de cuentas, de México. Esta fosfolipasa presenta similitudes de secuencia con la fosfolipasa A_2 de abeja, en la posición amino terminal, pero el sitio que une al calcio se parece al de las demás fosfolipasas de reptiles. Gomez F. et. al (1989) reportó la caracterización de cinco fosfolipasas de Heloderma suspectum. el peso molecular de la cinco fosfolipasas está entre 17000 y 18000, todas estas fosfolipasas son de tipo A_2 y su pH óptimo es de 9.0, las cinco variantes difieren significativamente en composición de aminoácidos y tienen propiedades antigénicas diferentes, a pesar de esto, las 5 fosfolipasas del veneno de este lagarto tienen la misma secuencia amino terminal (31 residuos). La secuencia de aminoácidos de la fosfolipasa más abundante del veneno de Heloderma suspectum muestra que esta tiene 142 aminoácidos y a igual que la fosfolipasa del veneno de Heloderma horridum horridum esta tiene mayor homología con la fosfolipasa A_2 del veneno de abeja, que con las fosfolipasas A_2 del veneno de otros reptiles. Sin embargo esta fosfolipasa muestra una región altamente conservada que corresponde a la región entre el aminoácido Asp30 y la Cis39. Esta región es el sitio activo de todas las fosfolipasas A_2 .

Los estudios de similitud de secuencia de aminoácidos de las fosfolipasas A₂ de serpientes (Dufton et al. (1983)), han dado evidencias para que el grupo de las fosfolipasas de los elápidos se divida en dos subgrupos que comprenden en un subgrupo a todos los elápidos asiáticos (cobras) y otro subgrupo que incluye a las serpientes marinas y a los elápidos australianos. De estos estudios se puede concluir que en el subgrupo de los elápidos australianos se ha tenido una tasa de cambio en la fosfolipasa más rápido que en el del grupo de los elápidos asiáticos. Cuando se hacen estudios de similitud de secuencia entre todas las fosfolipasas A₂ de reptiles y mamíferos se obtiene que hay 32 aminoácidos conservados, en posiciones equivalentes. Además 29 residuos son sustituciones por residuos con propiedades semejantes con respecto al tamaño, carga e hidrofobicidad. Si se comparan solamente las fosfolipasas pancreáticas y las de los elápidos asiáticos el número de aminoácidos conservados es de 36 a 45, un número mayor que cuando se comparan las fosfolipasas de serpientes australianas y asiáticas. Observe que estamos comparando secuencias de una enzima (fosfolipasa) con un promedio de 120 aminoácidos.

Se sabe que en el enlace al sustrato (ya sea en forma de monómeros o agregados) están involucradas interacciones hidrofóbicas. En la fosfolipasa de páncreas bovino se ha observado por análisis de difracción de rayos X que varias cadenas laterales de aminoácidos hidrofóbicos rodean el sitio activo, sin embargo las cadenas laterales se hallan dirigidas hacia afuera del sitio activo. Esto crea una gran área con propiedades hidrofóbicas para interacciones con lípidos. Estos residuos son Leu-2, Trp-3, Leu-79, Leu-20, Leu-31, Lis-56, Leu-58 (Val-Leu-Val-65), Tir-69 y Tir-70. En la fosfolipasa pancreática los residuos de lisina 53,56,57, y 62 forman un cúmulo que es importante para el enlace al sustrato. También la parte del carboxilo terminal (residuos del 116-121) puede ser importante en el enlace de la molécula al sustrato. Especialmente en las fosfolipasas de veneno esta parte contiene un cúmulo de cadenas laterales de aminoácidos hidrofóbicos (Dijkstra B.W et al. (1983)).

c) MECANISMO DE CATALISIS.

El comportamiento cinético de un gran número de enzimas solubles en agua que actúan sobre sustratos no agregados (incluyendo las esterasas) se conoce con cierto detalle a nivel molecular. Comunmente estas enzimas muestran una cinética de Michaelis-Menten clásica por lo que una gran información ha sido obtenida del mecanismo de acción de estas proteínas.

La fosfolipasa A₂ (E.C. 3.1.1.4) pertenece a un grupo especial de esterasas, las enzimas lipolíticas, en estas enzimas la actividad específica depende en gran medida del estado de agregación del sustrato. La velocidad de hidrólisis de los fosfolípidos incrementa varios ordenes de magnitud cuando se pasa de fosfolípidos no agregados a fosfolípidos agregados en micelas. El análisis de las propiedades cinéticas de esta enzima actuando sobre un sustrato no agregado en forma de micelas ha dado origen a una hipótesis (Dijkstra B. W. et al. 1983) sobre el mecanismo de catálisis de la enzima. Lo que se sabe sobre los principales aspectos del mecanismo de catálisis es lo siguiente:

- 1.- La hidrólisis requiere un enlace éster el cual debe estar separado por 5 o 6 átomos de una carga negativa la cual debe estar en una orientación estereoquímica específica.
- 2.- Los iones de Ca⁺⁺ se requieren para la reacción mientras que los iones parecidos en tamaño, como Ba⁺⁺ y Sr⁺⁺ son inhibidores competitivos. Todos estos iones se enlazan en razón de 1:1 a la enzima a 3 carbonos de la cadena polipeptídica de la proteína y a la cadena lateral del Asp-49.
- 3.- Sustratos monomérico o sustratos análogos se enlazan en razón 1:1, en estos enlaces las interacciones hidrofóbicas predominan.
- 4.- La His-48 se involucra en la catálisis con su grupo N-1 orientado hacia el solvente. El pK de este grupo es de 6.5, este valor disminuye a 5.5 en presencia de iones Ca⁺⁺.
- 5.- A pesar de que la fosfolipasa A₂ es una enzima que hidroliza ésteres, no es una esterasa clásica puesto que no reacciona con compuestos organofosforados y no hay resultados que apoyen la existencia de un acil-enzima. Por lo que Weelis (1973) propuso que una molécula de agua debería ser el nucleófilo que atacara el enlace éster.

El mecanismo catalítico propuesto depende principalmente de la estructura de la fosfolipasa A de páncreas bovino obtenida por difracción de rayos X. Se puede suponer que esta estructura no difiere significativamente de la estructura de cualquier otra fosfolipasa A₂, ya sea de páncreas o de veneno de reptiles. Tal suposición no es poco realista, ya que se sabe que las fosfolipasas de veneno y pancreáticas muestran un alto grado de similitud. Los datos cristalográficos de otras familias de proteínas homólogas (por ejemplo serina proteasas, citocromo C y proteasas ácidas) muestran que su estructura tridimensional es claramente independiente de variaciones en la estructura primaria.

En la estructura tridimensional de la fosfolipasa A₂ de páncreas bovino obtenida por análisis de difracción de rayos X, la His-48 está localizada en una grieta formada por aminoácidos hidrofóbicos altamente conservados: Asp-49, Thr-52, y Asp-99. Basados en evidencias químicas y en el arreglo espacial de las cadenas laterales del sitio activo Verheij et. al (1980b), han propuesto un mecanismo de hidrólisis, ver Fig. 1. La vecindad del Asp-99 e His-48 sugiere una analogía con las esterasas serínicas. Sin embargo el residuo de serina en las fosfolipasas no se encuentra, en vez de este grupo una molécula de agua aproximadamente a 3.0 Å del N-1 de la His-48 se propone que tiene una función nucleofílica en la hidrólisis del enlace ester. Cuando la molécula de agua ataca al átomo carbonilo del sustrato (ver Fig. 1) el anillo imidazol de la histidina 48 toma un protón de la molécula de agua facilitando la reacción. Este protón lo dona el anillo imidazol al oxígeno alcoxi, de la misma forma como las enzimas serínicas, donde el protón de la serina se transmite a la histidina (Kraut, J. 1977; Komiyama & Bender 1979). La función del ion Ca⁺⁺ puede ser enlazarse al grupo fosfato negativo, pero si solo fuera esta la única función del Ca⁺⁺, no queda claro porque la presencia de iones ligeramente más grandes como el Ba⁺⁺ forman un complejo ternario al igual que el Ca⁺⁺ pero no hay hidrólisis. Una posible explicación es que el Ca⁺⁺ es un ácido de Lewis más fuerte que el Ba⁺⁺ y este puede polarizar más fácilmente el enlace ester y estabilizar el intermediario tetrahédrico en concordancia con el grupo amino del residuo 30.

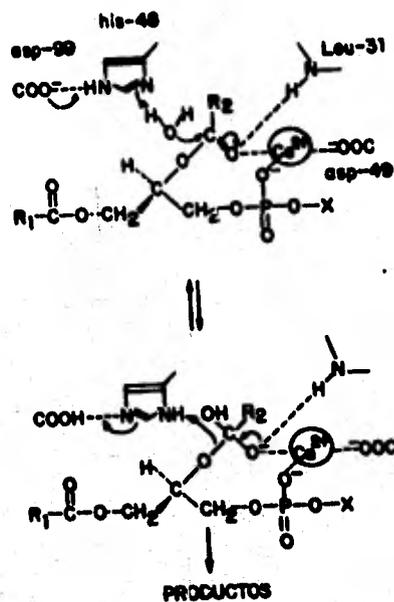


FIG. 1.- Mecanismo catalítico propuesto para la fosfolipasa por Verheij et. al 1980b. Básicamente este modelo propone un mecanismo análogo al de las serina proteasas, sólo que en este caso el ataque nucleofílico es realizado por una molécula de agua, que está a 3.0 Å de distancia de la His-48. El ion Ca²⁺ neutraliza la carga negativa del fósforo y polariza el enlace éster del segundo ácido graso contribuyendo a la hidrólisis de este enlace.

No existen datos cristalográficos del complejo enzima-sustrato para fosfolipasas, que permitan deducir como el sustrato se ajusta al sitio activo de la fosfolipasa. Sin embargo se puede suponer que una molécula de sustrato queda en una posición tal que el enlace éster pueda ser atacado por una molécula de agua. El grupo fosfato junto al ion Ca^{++} y la parte final de las cabezas polares apuntando hacia el solvente. Las dos cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos podrían permanecer paralelas y colocarse en la grieta de la superficie de la enzima formada por las cadenas laterales de los aminoácidos Leu-2, Leu-19, Leu-20, y Leu-31. (Verheij H. M. et. al 1981).

d) ANALISIS POR DIFRACCION DE RAYOS X.

El análisis por difracción de rayos X es una técnica muy poderosa para conocer la estructura tridimensional de una molécula de proteína, ya que podemos llegar a obtener las coordenadas posicionales de los átomos que forman una molécula hasta con una precisión de 1.5 Å. Esta técnica requiere tener a la proteína que nos interesa en estado sólido cristalino, en especial formando un monocristal. Actualmente se conoce con gran precisión la estructura tridimensional de la fosfolipasa de páncreas de cerdo (Dijkstra B.W. et. al 1983) y de la fosfolipasa de páncreas bovino, de esta enzima se han obtenido excelentes monocristales de la enzima activa y de la enzima con átomos pesados, de los cuales se obtuvo la estructura tridimensional a una resolución de 2.4 Å resolución de 1.7 Å y el modelo molecular de la fosfolipasa fué cristalográficamente refinado hasta un factor R de 17.1% (Dijkstra et.al 1981). Las fosfolipasas de Crotalus adamanteus y Crotalus atrox también han dado cristales adecuados para el análisis de rayos X. En ambos casos un dímero por unidad asimétrica se ha encontrado (Pasek et.al 1975). La interpretación del mapa de densidad electrónica a una resolución de 2.5 Å, muestra que la cadena polipeptídica de fosfolipasa de Crotalus atrox se dobla en el espacio de la misma forma que la fosfolipasa bovina. Además la porción del carboxilo terminal se une por un puente disulfuro a la cisteína-50. En ambos dímeros los sitios activos están rodeados de moléculas de agua. La Notexina una fosfolipasa básica neurotóxica (purificada del veneno de Notechis scutatus scutatus), forma cristales que difractan a una resolución de 1.8 Å. En este caso se tienen 6 moléculas por celda unidad (Kannan et. al 1977).

En general uno puede hacer un modelo de la molécula de fosfolipasa A, utilizando los datos cristalográficos obtenidos de las fosfolipasas de crotálicos y de páncreas bovino, esta última es la que se conoce con mayor precisión.

La molécula de fosfolipasa A₂ tiene una forma de riñón con dimensiones de 22Å X 30Å X 42Å, esta tiene un alto contenido de estructura secundaria con cerca de 50% de α -hélice y 10% de β -plegada. La estructura se estabiliza por gran cantidad de puentes de hidrógeno que involucran los siguientes grupos de átomos:

- 1) Enlace peptídico-enlace peptídico.
- 2) Enlace peptídico-átomos de cadenas laterales de aminoácidos.
- 3) Puentes de hidrógenos entre átomos de diferentes cadenas laterales de residuos de aminoácidos.

Las dos α -hélices antiparalelas correspondientes a los aminoácidos de posición 40-58 y 90-108 se conectan por puentes disulfuro realizados por Cys44-Cys105 y Cys51-Cys98. En estas α -hélices los residuos de los aminoácidos que forman el sitio activo His-48, Asp-49, Thr-52, y Asp-99 están colocados juntos. Cabe recalcar que los aminoácidos que forman este sitio activo 28-33 y 48-52 y 98-99 son invariantes en la secuencia de todas las fosfolipasas de veneno de reptiles obtenidas hasta ahora. Los residuos 28-33 son parte de un bucle que enlaza calcio el cual va de los residuos 25-42 y que contiene 5 glicinas conservadas en todas las fosfolipasas. Cuando el patrón de bucles y hazas formadas por la fosfolipasa se resume en una gráfica de Ramachandran estos 5 residuos de glicina (mencionados más arriba) se encuentran en regiones prohibidas para otros aminoácidos. La substitución de estas glicinas por otros aminoácidos que conserven el patrón de bucles de la proteína resulta altamente desfavorable en términos de energía. El ion Ca²⁺ está localizado en el sitio activo rodeado por siete ligandos de oxígeno (Ver Fig.2) tres oxígenos de grupos

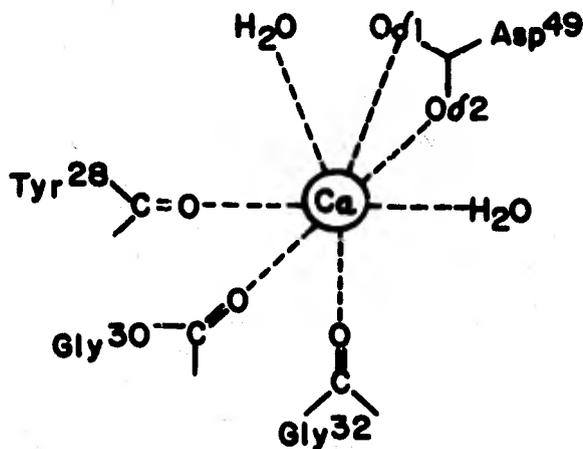


FIG. 2.- Representación esquemática de la posición del ion Ca^{2+} en la Fosfolipasa A. Los ligandos de este ion son los aminoácidos Tyr-28, Gli-30, Gli-32, y Asp-49 y dos moléculas de agua que están dirigidas hacia las esquinas de un octaedro.

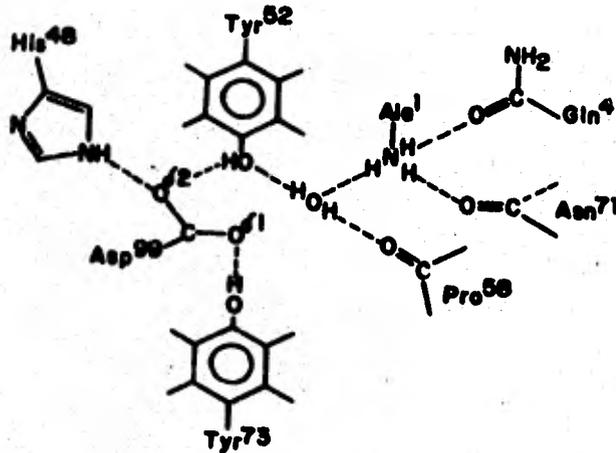


FIG. 3.- Sistema de liberación de protones de la Fosfolipasa propuesta por Dijkstra 1980.

carbonilo, el 81 y 82 de Asp-49 y dos moléculas de agua. Seis de estos ligandos están colocados en las esquinas de un octaedro. El Ca^{++} puede ser reemplazado por Ba^{++} sin embargo este no conserva estrictamente la misma orientación que el Ca^{++} , probablemente debido a su mayor tamaño. Estudios de modificación química (Verhelj et al. 1980b) muestran que la His-48 está envuelta en la catálisis, la figura 3 muestra que el anillo imidazol está junto a las cadenas laterales del Asp-99 y Tir-52 y una molécula de agua. El átomo N-3 de His-48 está a una distancia de 2.8 Å, adecuada para formar un enlace de hidrógeno con uno de los oxígenos del carboxilo del Asp-99. Junto al átomo N-1 de la His-48 (aprox. 3.0 Å) se encuentra una molécula de agua. Esta podría llevar a cabo una función nucleofílica en la hidrólisis del enlace éster del fosfolípido.

El oxígeno del carbonilo del Asp-99 también forma enlaces de hidrógeno con el grupo hidroxilo de Tir-52 y Tir-73. Estos dos residuos de tirosina son también invariantes en todas las fosfolipasas. Por medio de una molécula de agua estos residuos forman enlaces de hidrógeno con el grupo α -amino de la Ala-1, la cadena lateral de Gln-4, y los oxígenos del carbonilo de los residuos Pro-68 y Asn-71. La Gln-4 de nuevo es invariante en todas las fosfolipasas y las interacciones con el grupo α -amino y los carbonilos de los enlaces peptídicos no necesariamente dependen de los residuos laterales.

Por lo tanto se puede pensar que en todas las fosfolipasas existe un mecanismo de liberación de protones que utiliza una molécula de agua como donador. Este sistema liberador de protones está en el interior de la proteína junto con el Asp-99 y His-48, y está rodeado por solvente y aminoácidos hidrofóbicos invariantes en la secuencia de aminoácidos de las fosfolipasas, estos son: Fen-5, Ile-9, Ala-102, Ala-103, Fen-106, y el puente disulfuro entre Cys-29 y Cys-45. Además la Fen-22 (Tir en la mayoría de las fosfolipasas de veneno de reptil) es parte de la región hidrofóbica del sitio activo. Mientras que las paredes del sitio activo están formadas por residuos hidrofóbicos, la porción que está en la superficie del sitio activo es muy diferente. La entrada del sitio activo está formada de aminoácidos altamente variables y en su mayoría son hidrofóbicos.

Por lo que respecta a la estructura molecular de las fosfolipasas de serpientes, en particular, tenemos lo siguiente:
Todas estas fosfolipasas tienen los residuos al rededor del Asp-99 e His-48 y los aminoácidos ligandos del Ca^{++} invariantes o son altamente conservados.

Los Residuos al rededor de la entrada del sitio activo son variables pero con pocas excepciones estos son hidrofóbicos.

Existe una gran deleción entre los residuos 57 y 68, esto hace que dos bucles externos se junten al rededor de los puentes disulfuro entre Cis-81 y Cis-91 sin afectar la forma gruesa de la molécula.

Por lo tanto se puede concluir, tentativamente, que las fosfolipasas de diferentes fuentes no sólo muestran un alto grado de similitud en la secuencia sino también a nivel de estructura tridimensional. Esta conclusión se evidencia por los resultados de las estructuras obtenidas por análisis de rayos X de las fosfolipasas de Crotalus atrox a 2.5 Å de resolución.

Como podemos observar se conoce bastante bien el propuesto sitio catalítico de las fosfolipasas, gracias en gran parte a los datos obtenidos por difracción de Rayos X de enzimas cristalizadas. Sin embargo se conoce muy poco de los aminoácidos involucrados en los efectos neurotóxicos de las fosfolipasas de veneno que se ha demostrado poseen una actividad toxica.

3.- OBJETIVOS DE ESTA TESIS

Los objetivos de esta tesis son aislar y caracterizar químicamente una fosfolipasa neurotóxica del veneno de la serpiente Oxyuranus scutellatus scutellatus. Por un lado nos propusimos lo siguiente:

- a) Establecer una estrategia de purificación.
- b) Caracterizar la enzima, en cuanto a peso molecular por electroforesis y análisis de aminoácidos y también su especificidad.
- c) Obtener información sobre la estructura primaria de la misma (secuencia de aminoácidos).
- d) Por otro lado, montamos las técnicas necesarias para obtener cristales de la fosfolipasa pura, con miras a la obtención de un patrón de difracción de rayos X para conocer la estructura tridimensional de la misma.
- e) Así mismo, el conocimiento de la estructura primaria nos debiera permitir realizar un estudio comparativo con otras enzimas semejantes conocidas y distinguir algunos elementos relevantes para la función de la fosfolipasa. Sobre todo, interesa al grupo de investigación en donde desarrollé este trabajo conocer aspectos estructurales relevantes para la neurotoxicidad de la molécula.

MATERIAL Y METODOS.

a) FUENTE DEL VENENO.

El veneno inicialmente utilizado por nuestro laboratorio fué obtenido de un ejemplar vivo, mantenido en la compañía La Nauyaca A.C., gracias a la colaboración del señor Manuel Varela Juliá. Mayores cantidades de veneno se obtuvieron de la compañía Venom Supplies de Australia en forma liofilizada. Este permaneció en un congelador a -20 °C, hasta el momento de ser utilizado.

b) MEDICION DE PROTEINA.

La concentración de proteína se determinó por espectrofotometría, asumiendo que $1.0 A_{280nm}^{1\%} = 1.0 \text{ mg/ml}$ de proteína soluble. Esta medida de la concentración de proteína, se basa en el hecho de que el triptofano y la tirosina absorben a 280nm bajo las condiciones mencionadas arriba 1 mg de proteína absorbería una unidad.

c) DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASA.

Este ensayo se realizó de acuerdo a lo reportado por Shiloah (1973); Así esta actividad se determinó titulométricamente, utilizando como sustrato una solución de yema de huevo al 10% v/v con 0.1 N de NaCl. Una unidad de actividad de fosfolipasa se define como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de una 1 μmol de ácido graso por minuto a pH 8.0 y a 25 °C en 3.0 ml de solución de sustrato.

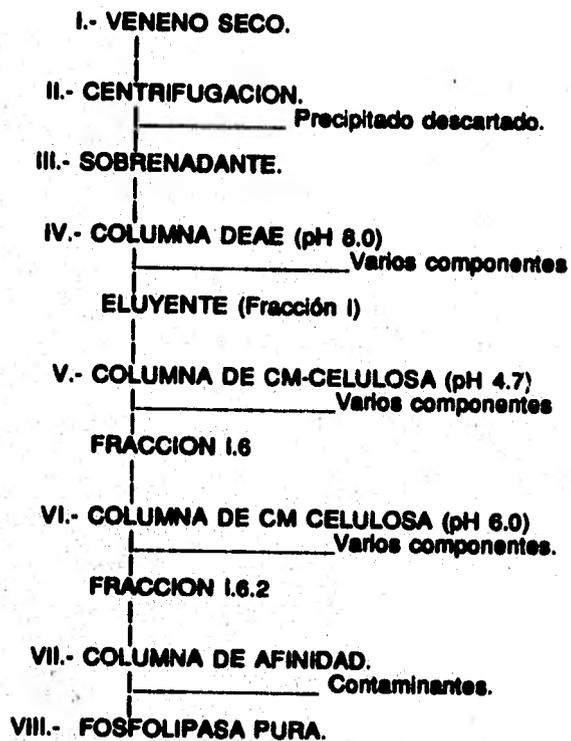
d) PRUEBAS DE TOXICIDAD.

La actividad tóxica de la fosfolipasa se detectó durante el proceso de purificación por administración por vía intraperitoneal, de diferentes fracciones a una concentración de proteína de 20-30 μg por 20 gramos de ratón. Los ratones utilizados son de la cepa CD1.

e) TECNICAS DE PURIFICACION.

1.- ESQUEMA GENERAL DE PURIFICACION.

En seguida se muestra un diagrama de flujo de los pasos seguidos para la obtención de la fosfolipasa en forma homogénea.



2.- CENTRIFUGACION. El veneno liofilizado se disuelve en un amortiguador de Tris-HCl 10mM pH 8.0 + NaCl 10mM y se centrifuga a 10,000 rpm en un rotor JA20 de ángulo fijo de 20° durante 15 min a 4°C en una centrifuga Beckman modelo J2-21. Se recupera el sobrenadante, se determina proteína por absorción a 280 nm y se procesa por cromatografías de intercambio iónico.

3.- DIALISIS. Se dializó aquellas fracciones que tienen actividad de fosfolipasa neurotóxica, y que requerían pasos cromatográficos en diferentes condiciones de pH y fuerza iónica, esto se hace para equilibrar la muestra con respecto a la columna en la que se va a realizar la cromatografía. Las membranas utilizadas son Espectrapor con un peso molecular de escape (cutoff) de 3000. La diálisis se lleva a cabo a temperatura ambiente por una hora haciendo cambios cada 15 min., utilizando un volumen de amortiguador de diálisis de 1000 ml.

4.- CROMATOGRAFÍAS DE INTERCAMBIO IÓNICO. Las resinas utilizadas se obtuvieron de Whatman INC (Clifton, N.J. USA). El tipo de resina utilizada fue CM-32 y DEAE celulosa. Estas resinas se prepararon de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las columnas utilizadas miden 0.9 cm X 34.0 cm. La resina se empacó con nitrógeno a una atmósfera de presión. Las cromatografías se corrieron con una bomba peristáltica de presión regulable Milton-Roy.

5.- CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD. La fase inmóvil de esta cromatografía se sintetizó en el laboratorio de acuerdo al método inicialmente propuesto por Rock & Snyder (1975). El ligando 1-11-carboxi-undecil-rac-2-hexadecil-glicero-3-fosforicolina se acopló a AH-sefarosa 4-B por medio de carbodimida. La columna mide 0.9x10 cm. La muestra se corre a una velocidad de 20.0 ml/hr en un amortiguador Tris-HCl 50mM pH 7.95 + CaCl₂ 20mM. Para eluir a la fosfolipasa pegada al soporte sólido se utilizó como eluyente una solución de ácido acético a 0.1 M. La velocidad de elución fue de 30 ml/hr; el eluido de esta fracción se colectó en tubos con 200 µl de amortiguador de Tris-HCl 1 M pH 7.95. Inmediatamente esta fracción se dializó extensivamente contra agua destilada y luego se liofilizó. Esta fracción es la que se utiliza para hacer secuencia de aminoácidos y ensayos de cristalización.

6.- CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION (HPLC). Las cromatografías HPLC que se usaron para separar los péptidos producidos por digestión enzimática, de la fosfolipasa neurotóxica se realizaron en un cromatografo Beckman 421 equipado con dos bombas M114 y una columna C-18 de fase reversa ultraspher de 5.0 micras, la velocidad de flujo de la columna fue de 1.0 ml/min y se eluyeron con un gradiente lineal de acetonitrilo de 0.0% a 60.0% con 0.1 de ácido trifluoroacético. Por lo general se aplicaron 50 µl conteniendo 50 µg de proteína.

7.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON SDS.

Se realizaron electroforesis en placas de poliacrilamida en presencia de SDS de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970), sólo que en nuestro caso el gel separador tenía una concentración de 15%, y las muestras fueron tratadas con B-Mercaptoetanol al 1.0%. Los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie R-250 de acuerdo al método de Reiser et.al (1975). Estas electroforesis tuvieron como finalidad evaluar la pureza de nuestra enzima en cada paso de purificación, así como también calcular su peso molecular. De acuerdo al trabajo de Weber y Osborn (1969), la determinación del peso molecular por este método es razonable, y se obtiene una precisión de hasta un 10%.

f) REDUCCION Y CARBOXIMETILACION.

La enzima purificada se desnaturalizó con 8.0 M de cloruro de guanidino y después se redujo con ditioneol y se carboximetiló con ácido iodoacético (Cleland, W.W. (1964)). Los reactivos no reaccionantes se separaron de la enzima carboximetilada por medio de una cromatografía de filtración en gel usando Biogel P-30 equilibrada con acético al 20%. La muestra aplicada tiene un volumen de 1.0 ml y se colectaron fracciones de 1.0ml, la proteína carboximetilada se sometió a secuencia de aminoácidos.

g) ANALISIS DE AMINOACIDOS. La hidrólisis ácida de la fosfolipasa en sus aminoácidos constituyentes, se llevó a cabo en tubos al vacío en presencia de 200 µl de HCl 6 N durante 24, 48 y 72 hrs. a 110 grados centígrados (Moore S. & Stein W.H. (1949)). Cada ruptura se hizo por duplicado. La determinación de cada uno de los aminoácidos se realizó por obtener el derivado feniltiocarbamil-aminoácido e identificados por medio de un cromatógrafo HPLC Spectraphysics modelo 800B. (Brian A. et. al (1984) y Heinrikson L. R. & Meredith C. S. (1984)). La cuantificación de los aminoácidos se realizó de acuerdo a un programa de cálculo, para microprocesador PC.

h) SECUENCIA DE AMINOACIDOS. La proteína pura reducida y carboximetilada se secuenció por medio de degradación automática de Edman (Edman P. & Begg G. (1967)) en un secuenciador Beckman modelo 890M. Los derivados feniltiocarbamil-aminoácidos (PTH-aminoácidos) se identifican por medio de un cromatógrafo HPLC SP800B. Una descripción detallada de este procedimiento se encuentra en Possani et. al (1985).

i) ESPECIFICIDAD DE LA FOSFOLIPASA.

Este ensayo se realizó de acuerdo al método reportado por Oppendoes R. F. & Van Roy J. (1982), de acuerdo con esto, la enzima purificada, 0.05 nmol se incubó a diferentes tiempos a 37 °C en un amortiguador de Tris-HCl 10mM pH 8.0 + 27nM sustrato marcado que es 1,2-di[1-C] palmitoil-sn-glicero-3-fosfatidil colina + Tritón X-100 al 0.04%. El volumen final de la reacción es de 20 µl. La reacción se detiene con 25 µl de una solución de ácido tricloroacético al 5.0% en n-butanol + ácidos grasos libres (ácido linoleico) a 1.0 mg/ml y lisofosfatidilcolina a 1.0 mg/ml, no marcados (esto se hace con la finalidad de amplificar la señal y poder ver los productos en cromatografía de capa fina). Se aplica la solución donde se llevó a cabo la reacción en una placa para cromatografía de capa fina utilizando como eluyente una solución de cloroformo 43%, metanol 9.8%, ácido acético 4.0% y agua 2.1%. Después que termina la cromatografía de placa fina, se revela la posición de los ácidos grasos libres y la del lisofosfatidilcolina con yodo, en seguida se raspan cada una de las manchas, se disuelven en una solución de 2-5-difenil-ioxazol al 6% en tolueno y en seguida se mide su contenido de radioactividad en un contador beta Beckman LS 7800.

j) ENSAYOS DE CRISTALIZACION DE LA FOSFOLIPASA..

La enzima pura (2.0 mg/ml en un volumen de 10 ml) a homogeneidad se dializó en una membrana de cutoff de 3000 contra un volumen de 2000 ml de agua bides-tilada a 4 °C, se hicieron 4 cambios de dos horas cada uno, después la enzima se concentró por liofilización y se resuspendió en un mililitro de amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 8.0 + CaCl₂ 10 mM, a una concentración de proteína de 16.0 mg/ml. Los ensayos de cristalización se realizaron utilizando la técnica de difusión de vapor en gota suspendida reportada por McPherson A. (1985). La gota que contiene la proteína tiene un volumen de 10 µl. Utilizando como agente precipitante Polietilengli- col 6000 en las siguientes concentraciones: 5%, 10%, 20%, y 40% V/V en el mismo amortiguador en el que se disuelve la proteína. La gota de proteína se pone a equilibrar contra un ml de las soluciones de polietilen glicol usando cajas de cultivo de células de 24 pozos.

k) DESARROLLO DE PROGRAMAS DE CALCULO PARA MICROPROCESADOR PC.

También en esta tesis, se crearon dos programas para realizar los cálculos de la cuantificación de la actividad de fosfolipasa y de la cuantificación de los análisis de aminoácidos.

Estos programas pueden ser ejecutados por un microprocesador PC compatible con IBM.

1.- PROGRAMA PARA LA CUANTIFICACION DE ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASA.

Este programa está en Turbo Pascal versión 3.0 y su nombre es PLASA2.PAS, el programa tiene las siguientes partes:

I) Presentación del programa.

II) Instrucciones al usuario. Estas están en un procedure llamado "Instruye" el cual es interactivo, para permitir que el usuario pueda leerlas cuantas veces quiera.

III) Entrada de datos (a través del teclado) para realizar los cálculos.

IV) Realización de las operaciones aritméticas para la cuantificación del análisis de aminoácidos.

V) Salida de resultados a través de la pantalla.

VII) Finalización del programa, esta parte permite al usuario iniciar una nueva sesión de cálculo o salir del programa.

2.- PROGRAMA PARA LA CUANTIFICACION DE UN ANALISIS DE AMINOACIDOS.

Este programa también está escrito en Turbo Pascal versión 3.0 y su nombre es ANAAA1.PAS, el programa consta de las siguientes partes:

- I) **Presentación del programa.**
- II) **Instrucciones al usuario:** esta parte está dentro de un procedure llamado "Instruye", el cual es interactivo, para que el usuario pueda leerlas cuantas veces sea necesario. Estas instrucciones están en un archivo llamado TEXTO.DAT el cual es invocado y leído por el procedure "Instruye". El archivo TEXTO.DAT puede escribirse con el editor de Turbo Pascal, y tiene que estar en el mismo directorio en el que esté el programa ANAAA1.PAS.
- III) **Entrada de datos para realizar los cálculos:** esta parte abre un archivo en el disco donde quedan almacenados los datos de entrada. Los datos almacenados pueden mostrarse al usuario, sin embargo, estos datos no pueden modificarse desde el teclado. Para modificar los datos es necesario reescribir todo el archivo utilizando el mismo programa o a través del editor de Turbo Pascal.
- IV) **La entrada de datos está protegida contra posibles errores de edición por parte del usuario, cuando se comete un error, se le envía un mensaje al usuario, en el que se le dice como ha de escribir el dato que se le pide, y se le vuelve a preguntar por el dato equivocado. Con respecto a la entrada de variables de tipo file, también se cuenta con procedimientos de protección de tal forma que si el archivo por el que se pregunta no existe en el mismo directorio en el que está el programa ANAAA1.PAS entonces se envía un mensaje de error y se vuelve a preguntar por dicha variable.**
- V) **Realización de las operaciones aritméticas necesarias para la cuantificación de los aminoácidos, utilizando los datos de un archivo previamente almacenado.**
- VI) **Salida de resultados a través de pantalla, que pueden imprimirse utilizando la tecla "Impr Pant".**
- VII) **Finalización del programa, esta parte permite al usuario reiniciar el programa para otra sesión de cálculo o le permite salir del mismo.**

RESULTADOS.

a) PURIFICACION POR CROMATOGRAFIAS.

La purificación de la fosfolipasa neurotóxica se llevó a cabo por medio de tres cromatografías de intercambio iónico y una cromatografía de afinidad que usa como ligando un análogo de la fosfatidil colina, de acuerdo al esquema presentado en material y métodos.

Se partió de 100 mg de veneno crudo liofilizado, que se disolvió en 10 ml de amortiguador Tris-HCl 10 mM + NaCl 10mM pH 8.0. Este se centrifugó a 10000 rpm a 4 °C, el sobrenadante se aplicó a una primera columna de intercambio iónico que es de DEAE celulosa equilibrada en el mismo amortiguador en el que se disolvió el veneno. La fracción donde se encuentra la fosfolipasa neurotóxica que nos interesa es básica, por lo tanto sale en el cargado de esta cromatografía, (ver Fig.4). La proteína retenida en la columna se eluye en un solo paso al lavar la columna con amortiguador de equilibrio que contiene 0.6 M de NaCl.

La fracción I de la cromatografía de DEAE se dializa y se recromatografía en una segunda columna de intercambio iónico de CM-32 equilibrada con amortiguador de acetato de amonio 20mM pH 4.7. Esta cromatografía se eluye con un gradiente lineal de NaCl de 0.0 a 0.60 M de NaCl (ver Fig. 5.). La fracción 8 de esta cromatografía es la que tiene actividad de fosfolipasa y es toxica en ratones al ser aplicada por vía intraperitoneal. Esta fracción se somete a una tercera cromatografía de intercambio iónico de CM-32 equilibrada con amortiguador de fosfatos 20mM pH 6.0. Antes de aplicar a la tercera columna se dialisa la fracción 1.6 contra el amortiguador de equilibrio a pH 6.0. Esta columna se eluye con un gradiente lineal de 0.0 a 0.45 M de NaCl, obteniéndose 3 fracciones (ver Fig. 6). La fracción número 2 es la que conserva toda la actividad de fosfolipasa y es tóxica en ratones. Por último esta fracción, después de ser equilibrada por medio de diálisis es recromatografiada en una columna de afinidad, (ver Fig. 7). Esta columna está equilibrada en un amortiguador de Tris-HCl 50mM pH 7.95 + CaCl₂ 20mM, la muestra es cargada a una velocidad de 20 ml/hr, mientras que el lavado con diferentes amortiguadores se lleva a una velocidad de 30 ml/hr, la columna se lava inicialmente con 20 ml de amortiguador de equilibrio, como podemos ver en este lavado no se obtiene ninguna fracción por lo que casi toda la muestra queda retenida, en seguida se lava con otros 20 ml de amortiguador de equilibrio pero que contiene 50 mM de EDTA. En este lavado otra vez se sale muy poco material a pesar de que la fosfolipasa es dependiente de Ca⁺⁺. Sin embargo ella puede quedar retenida en la columna por interacciones hidrofóbicas. Con la finalidad de eliminar EDTA, y que no interfiera con la absorbancia a 280nm se vuelve a lavar con amortiguador de equilibrio.

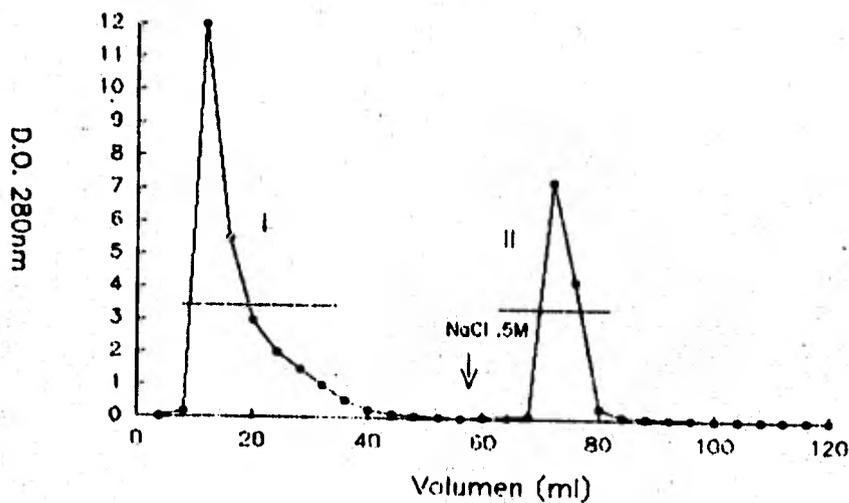


FIG. 4.- CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO DEAE CELULOSA DE DE VENENO COMPLETO DE *Oxyuranus scutellatus scutellatus*.

Se aplicó una muestra de 100.0 mg de veneno completo a una columna (0.9 cm X 20.0 cm) equilibrada en amortiguador de Tris-HCl 50 mM pH 8.0 + NaCl 10mM. La actividad de fosfolipasa y neurotóxica sale en el cargado de esta columna, por lo que la proteína retenida en la columna es eluida en una sola etapa con 0.5 M de NaCl disuelto en el mismo amortiguador. La velocidad de corrida de esta cromatografía es de 25 ml/hr y se colectan 50 fracciones de 2.5 ml por tubo durante el cargado.

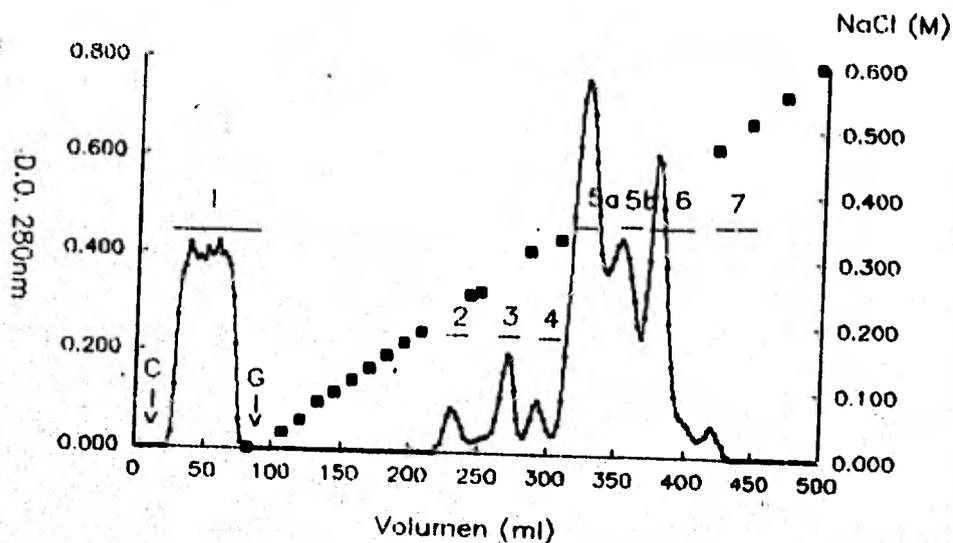


FIG. 5.- CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO CM-32 DE LA FRACCION I DEL VENENO DE LA SERPIENTE *Oxyuranus scutellatus scutellatus*

Se aplicó una muestra de 70.0 mg de la fracción I en una columna de CM-32 (0.9 cm X 30.0 cm) equilibrada en amortiguador de acetato de amonio 20 mM pH 4.7, la muestra fué previamente dializada contra el amortiguador de equilibrio por una hora en membranas tubulares de cutoff 3000. La velocidad de corrida fué de 30.0 ml/hr. Se eluyó por medio de un gradiente lineal de NaCl de 0.0 a 0.6 M de 500 ml. Las barras numeradas corresponden a las diferentes fracciones obtenidas. La fracción número 6 corresponde a la actividad neurotóxica y de fosfolipasa.

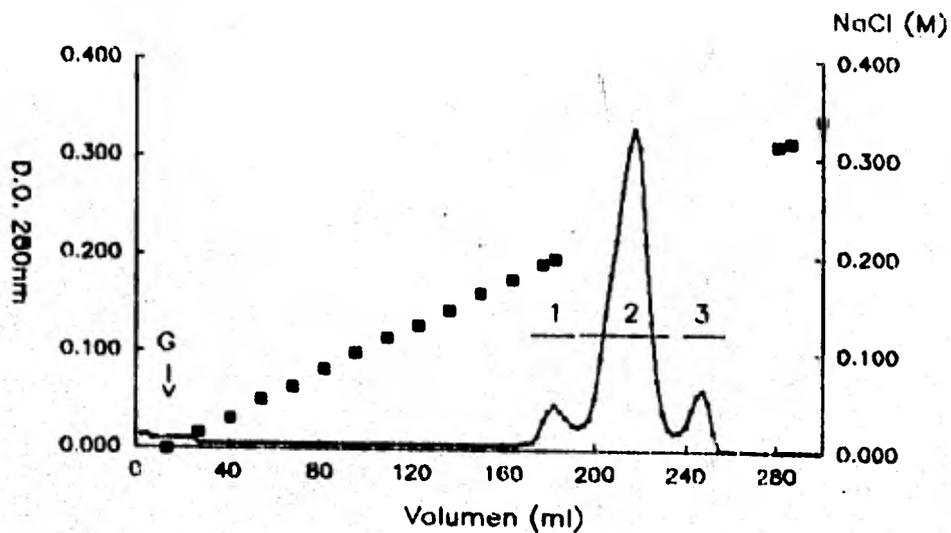


FIG. 6.- CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO CM-32 DE LA FRACCION 1.6 DEL VENENO DE LA SERPIENTE *Oxyuranus scutellatus scutellatus*

Se aplicó una muestra de 15.0 mg de la fracción 1.6 en una columna (0.9 cm X 30.0 cm) de CM-32, equilibrada en un amortiguador de fosfatos de sodio 50 mM pH 6.0. La muestra se dializó por una hora contra el amortiguador de equilibrio en membranas tubulares de cutoff de 3000. La velocidad de corrida fué de 30 ml/hr. Se eluyó con un gradiente lineal de 0.0 a 0.45 M de NaCl. Se colectaron fracciones de 2.5 ml. Las barras numeradas corresponden a las fracciones obtenidas. La fracción número 2 es la que tiene actividad tóxica y de fosfolipasa. La fracción número 3 corresponde a la Talco toxina.

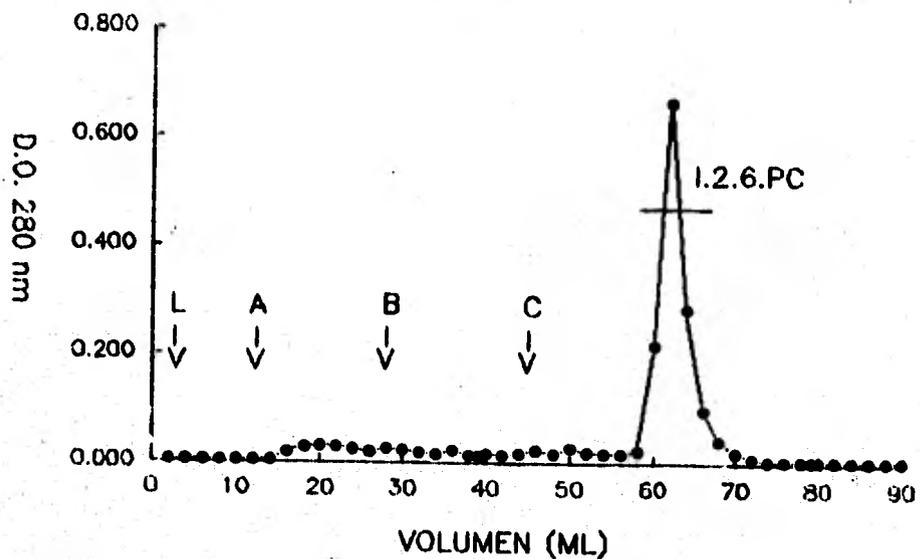


FIG. 7.- CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD PC-SEFAROSA DE LA FRACCION 1.6.2 DEL VENENO DE LA SERPIENTE *Oxyuranus scutellatus scutellatus*.

Se aplicó una muestra de 3.0 mg de la fracción 1.6.2 (previamente dializada contra el amortiguador de equilibrio de la columna) en una columna de 0.9 cm X 10.0 cm equilibrada en amortiguador de Tris-HCl 10.0mM + CaCl₂ 20mM. La muestra se aplica a una velocidad de 20 ml/hr, y la elución de la columna se realiza a una velocidad de 30 ml/hr. La columna es lavada con los siguientes amortiguadores: A indica lavado con 20 ml de amortiguador de equilibrio, B indica lavado con amortiguador de equilibrio con 50 mM de EDTA, C indica lavado con ácido acético 0.1 M. Obsérvese la eliminación de pequeños contaminantes con los lavados A y B. Se colectan fracciones de 2.0 ml, las fracciones colectadas durante el lavado con ácido 0.1 M son colectadas en 0.2 ml de amortiguador Tris-HCl 2 M pH 7.95 + 20 mM CaCl₂. El pico principal (al cual se le identifica como fracción 1.2.6.PC) de esta cromatografía es el que tiene la actividad de fosfolipasa y neurotoxicidad.

Finalmente, para eluir la proteína que queda pegada en la fase sólida de la columna se lava con 20 ml de ácido acético 0.1 M. Esta fracción se colecta en amortiguador de equilibrio concentrado a 2.0 M. De la figura 7 se puede concluir que prácticamente toda la fracción 1.6.2 es fosfolipasa que queda pegada en la columna de afinidad. Algunos pequeños contaminantes son eluidos con los lavados A, B y C. La tabla I resume los datos de recuperación y toxicidad encontrados en estas columnas cromatográficas. La actividad de fosfolipasa se incrementa en un 40% con respecto al veneno total, cuando se separa el veneno en dos componentes, uno básico y otro ácido (fracciones I y II), esto podría deberse a que en el mismo veneno existen componentes que inhiben la actividad de fosfolipasa y que se separan en la primera cromatografía de intercambio iónico. La fosfolipasa purificada representa el 4.0% de la proteína total, y la actividad de fosfolipasa representa el 10.0% con respecto a la actividad total del veneno.

La pureza de la fosfolipasa se muestra en el gel de la figura 8, en la que se aprecia solamente una banda, por lo que la enzima se puede considerar pura por este criterio. El peso molecular calculado para esta fosfolipasa de acuerdo a la gráfica de la Fig. 9 es de 16000.

TABLA I
RECUPERACION Y TOXICIDAD DE FRACCIONES DEL VENENO DE
SERPIENTE Crotalus scutellatus scutellatus.

COLUMNA	FRACCION	PROTEINA	% DE	TOXICIDAD**
		mg	RECUPERACION*	
	Veneno Total.	170.8	100.0	LETAL
CARGADO 146.4 mg DEAR (FIG. 4)	I	96.4	76.0	LETAL
	II	44.6	61.8	LETAL
CARGADO 72 mg				
CM-pH 4.7	I.1	17.7	0.0	NO LETAL
(VER FIG. 8)	I.2	1.3	0.0	LETAL
	I.3	3.0	0.0	LETAL
	I.4	1.0	0.0	LETAL
	I.5a	10.1	13.8	LETAL
	I.5b	7.8	6.0	LETAL
	I.6	11.7	8.9	LETAL
	I.7	1.3	0.8	LETAL
CARGADO 10 mg CM-pH 6.0	I.6.1	0.62	0.0	LETAL
(VER FIG. 6)	I.6.2	8.41	7.3	LETAL
	I.6.3	0.987	0.0	LETAL
CARGADO 7.58 mg AFINIDAD (VER FIG. 7)	I.6.2.PC	6.94	9.9	LETAL

*CALCULADO CON LAS U. TOTALES DE ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASA.
 ** TOXICIDAD ENAYADA CON 1.9 mg/g DE PESO CORPORAL DE RATON EXCEPTO PARA LA FRACCION I.1 Y LA FRACCION I.4 QUE FUERON ENAYADAS CON 28 mg/g y con 8.5 mg/g RESPECTIVAMENTE.

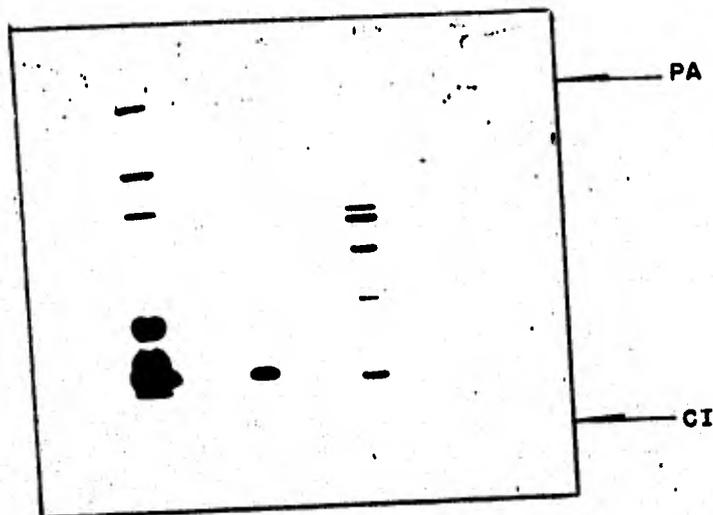


FIG. 8.- ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA 15.0% CON SDS.

Las muestras aplicadas en este gel corresponde a las siguientes:

- 1.- Veneno completo de Oxyuranus scutellatus scutellatus.
Se aplicaron 112 µg.
- 2.- Fosfolipasa purificada por tres cromatografías de Intercambio Iónico y una de afinidad (Fracción 1.6.2.PC). Se aplicaron 20 µg.
- 3.- Marcadores de peso molecular. Se aplicaron 10 µg. Estos marcadores son: Conalbúmina 80000, Albúmina bovina 67000, Ovoalbúmina 43000, Anhidrasa Carbónica 30000, y Lisozima 15000

Todas esta muestras fueron tratadas con β-Mercaptoetanol.

PA = punto de aplicación.

CI = posición de migración del colorante indicador.

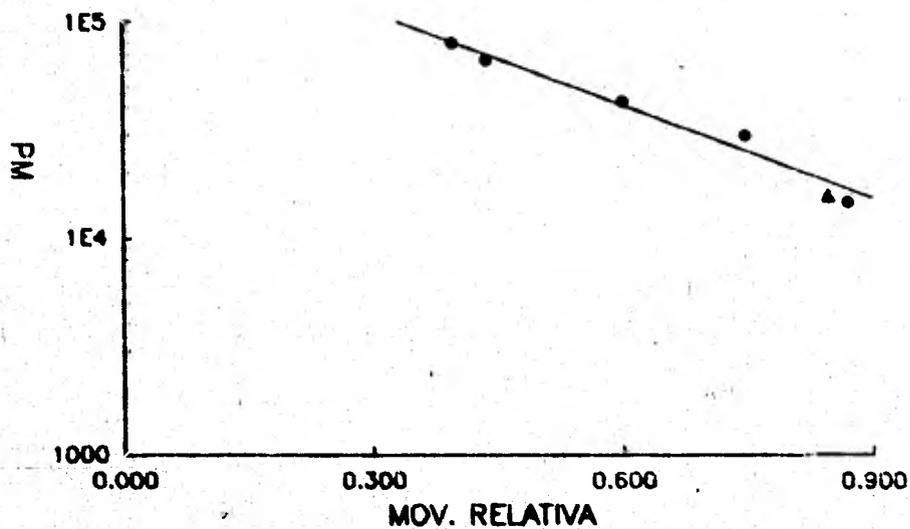


FIG. 9.- GRAFICA SEMILOG PARA CALCULAR EL PESO MOLECULAR DE LA FOSFOLIPASA A DE *SQUAMBIUS SCUTELLATUS SCUTELLATUS*.

La movilidad relativa de cada proteína fué obtenida del gel de la fig. 8. El coeficiente de correlacion lineal de esta gráfica es de 0.98878. De acuerdo con esta gráfica el peso molecular de la fosfolipasa es de 16000. La posición de la fosfolipasa en la gráfica es indicada por un triángulo.

b) CARACTERIZACION QUIMICA DE LA ENZIMA.

1.- ANALISIS DE AMINOACIDOS.

En la Tabla II se muestra el análisis de aminoácidos realizados a diferentes tiempos. Los aminoácidos que disminuyen con el tiempo de hidrólisis Ser, Tir, Thr se calcularon por extrapolación a tiempo cero, los valores se ajustaron por mínimos cuadrados (ver fig Ila). Los valores para estos aminoácidos fueron: 10 serinas, 8 tirosinas y 6 treoninas. Para los aminoácidos que aumentan con el tiempo de hidrólisis, encontramos los siguientes valores: 6 leucinas, 6 valinas y 3 isoleucinas, estos valores se tomaron de la hidrólisis de mayor tiempo y de observar el perfil de la gráfica Iib. En la Tabla III se muestra la composición final de la enzima estudiada, y se compara con la composición de la Taipoxina alfa, como puede verse las composiciones son diferentes a pesar de que ambas proteínas tienen actividad de fosfolipasa y son neurotóxicas.

En lo que respecta a la composición de Asn y Gin en nuestro caso no se determinaron, por el método utilizado, ya que estos aminoácidos se convierten a su forma ácida, por lo que en los aspárticos y glutaminas determinados obtenemos la suma de aspárticos y asparaginas y la suma de glutámicos y glutaminas respectivamente. El peso molecular de nuestra fosfolipasa de acuerdo a su composición de aminoácidos es de 17400 (ver Tabla III).

TABLA II
COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA FOSFOLIPASA Oxyuranus scutellatus scute-
llatus.

AMINOACIDO	20 hrs	48 hrs	72 hrs
Asp	16	16	17
Glu	12	12	10
Ser	10	10	10
Gli	17	17	17
His	1	3	3
Arg	10	10	10
Tre	5	6	6
Ala	18	19	18
Pro	5	6	6
Tir	7	4	3
Val	4	6	6
Met	1	1	1
Iso	2	2	3
Leu	5	6	6
Phe	7	6	6
Lis	11	12	12
Cis	16		
Tsp	N.D.		

a) Residuos/mol basados en 14 Cys y 3 Tsp.

b) N.D. No determinado.

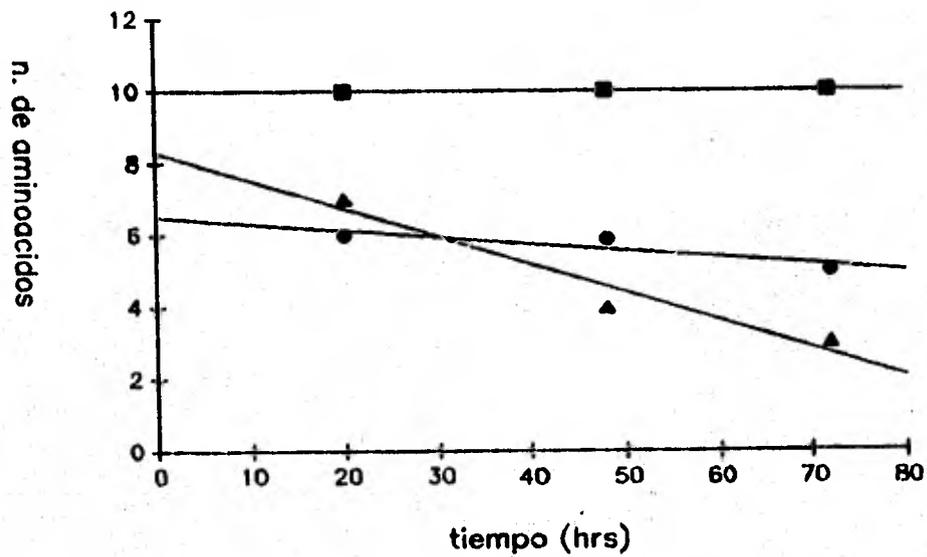


FIG. Ila.- Aminoácidos que disminuyen su concentración con el tiempo de hidrólisis. La concentración real fue determinada por extrapolación a tiempo cero ajustando los valores experimentales por mínimos cuadrados. ■ Ser ▲ Tyr ● Trp.

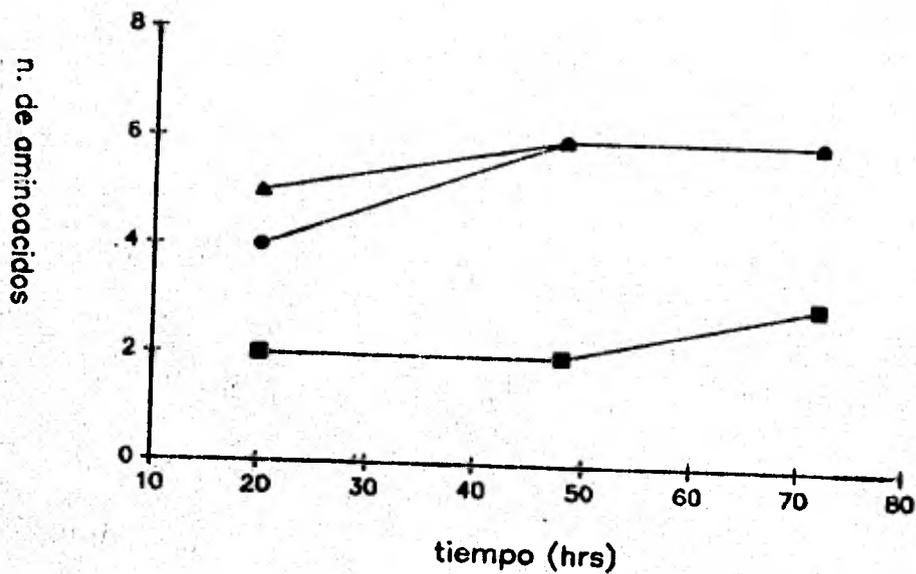


FIG. Iib.- Aminoácidos que aumentan su concentración con el tiempo de hidrólisis. La concentración real de estos aminoácidos se estimó de la gráfica, suponiendo que a 72 hrs de hidrólisis se alcanzó el límite de la gráfica. ▲ Leu ● Val ■ Ile.

TABLA III

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA FOSFOLIPASA CORYNEBACTERIUM SCUTELLATUS SCUTELLATUS. Y DE LA TAIPOXINA ALFA.

FOSFOLIPASA (ESTA TESIS)		TAIPOXINA ALFA (Dufton M.J. et al 1983)
Asp	16	6
Glu	12	3
Ser	10	5
Gli	17	9
His	1	2
Arg	10	13
Tre	6	6
Ala	15	9
Pro	5	8
Tir	8	8
Val	6	8
Met	1	2
Iso	3	2
Leu	6	4
Phe	7	5
Lis	11	6
Cis	16	14
Tsp	N.D.	4
Asn	N.D.	7
Gln	N.D.	4
TOTAL DE A.A 150		119
PM	17400	14500

a) Residuos/mol basados en 14 Cys y 3 Tsp.
 b) N.D. No determinado.

2.- SECUENCIA DE AMINOACIDOS.

La enzima purificada se redujo y carboximetiló como se describe en material y métodos. Los reactivos no reaccionantes se separaron de la enzima carboximetilada por medio de una cromatografía de filtración en gel usando Biogel P-30 equilibrada con acético al 20%. El perfil de elución se muestra en la Fig. 10. De la fracción 1 de esta cromatografía, que es la proteína carboximetilada, se procedió a realizar la secuencia de aminoácidos.

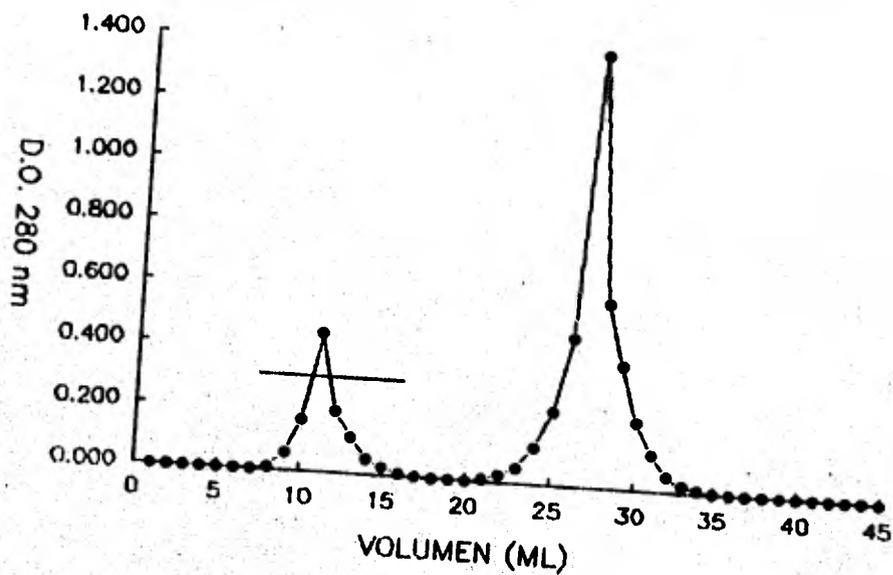


FIG. 10.- FILTRACIÓN EN GEL BIOGEL P-30 DE LA FOSFOLIPASA REDUCIDA Y CARBOXIMETILADA CON ACIDO IODOACETICO.
 Se aplicó una muestra de un mililitro con 5.0 mg de fosfolipasa, desnaturalizada con 8.0 M de Cloruro de guanidinio, reducida con ditioneitol, y carboximetilada con ácido iodoacético, a una columna (0.9 cm X 50 cm) equilibrada con acético al 20 %. La velocidad de elución fué de 20.0 ml/hr. Se colectaron muestras de un mililitro. La línea horizontal muestra la fracción de proteína.

Inicialmente la fosfolipasa se aplicó directamente al secuenciador automático, obteniéndose la secuencia aminoterminal:

SECUENCIA AMINO TERMINAL:

1 5 10 15
Asn-Leu-Ala-Gln-Fen-Gli-Phe-Met-Ile-Arg-Cis-Ala-Asn-Gli-Gli-
20 25 30
Ser-Arg-Ser-Ala-Leu-Asx-Tir-Ala-Asx-Tir-Gli-Cis-Tir-Cis-Gli-Lis-

La enzima reducida y carboximetilada se trató con Proteasa V8 y con Tripsina como se describe en material y métodos. Los péptidos resultantes fueron separados por cromatografía HPLC obteniéndose los cromatogramas de las figuras 11 y 12. La figura 11 muestra los cromatogramas de los péptidos obtenidos con proteasa V8, mientras que la figura 12 muestra los cromatogramas de los péptidos obtenidos por digestión con tripsina. Los péptidos secuenciados se identifican con tiempo de retención del pico correspondiente.

La secuencia de aminoácidos de los péptidos generados por digestión enzimática fueron los siguientes:

DIGESTION CON PROTEASA V8.

PEPTIDO 34.74 (Fig.11a)

1 5 10
Cis-Fen-Ala-Arg-Ser-Pro-Tir-Gln-Lis-Lis-Asn-Trp-Asn-

(Este péptido está contenido dentro del péptido 39.33 obtenido con proteasa V8)

PEPTIDO 39.33 (Fig.11b)

1 5 10 15
Cis-Fen-Ala-Arg-Ser-Pro-Tir-Gln-Lis-Lis-Asn-Trp-Asn-Ile-Asn-Thr-
Lis-Ala-Arg-Glu-

DIGESTION CON TRIPSINA:

PETIDO 38.06 (Fig. 12a) RECROMATOGRAFIADO, RINDE LOS SIGUIENTES PEPTIDOS:

PEPTIDO 27.15 (Fig.12b)

**1
Ser-Trp-Lis-**

PEPTIDO 29.96 (Fig. 12b)

**1 5 10
Cis-Trp-Glu-Lis-Ala-Phe-Ser-Cis-Asn-Tre**

PEPTIDO 47.18 (Fig. 12a) RECROMATOGRAFIADO, RINDE LOS SIGUIENTES PEPTIDOS:

PEPTIDO 37.31 (Fig. 12c)

**1 5
Asn-Trp-Asn-Ile-Asp-Tre-Lys**

(Este péptido está contenido dentro del péptido 39.33 producido con proteasa V8)

PEPTIDO 40.44 (Fig.12c)

**1 5 10 15
Lis-Tre-Arg-Cis-Gln-Arg-Phe-Val-Cis-Asn-Cis-Asp-Ala-Lis-Ala-Ala**

Total de a. a. secuenciados 80 faltan por secuenciar 70 a.a.

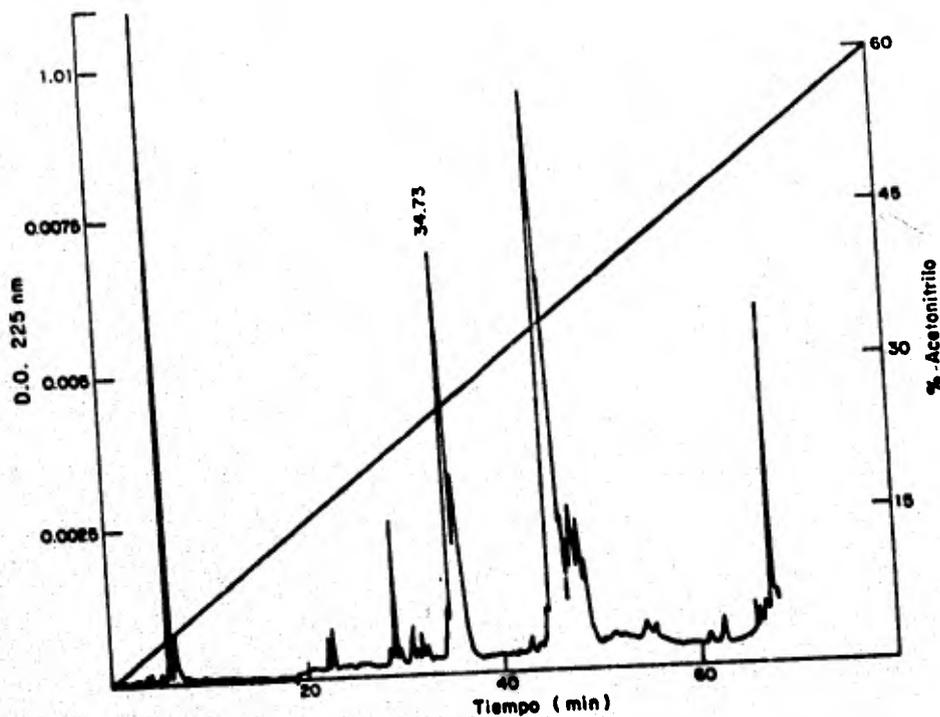


FIG. 11a.- Cromatografía líquida de alta presión (HPLC fase reversa; columna C-18) de fosfolipasa tratada con proteasa V8, el péptido 34.73 se secuenció directamente. La columna se eluyó con un gradiente lineal de 0.0 a 60.0% de acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0.1%. Las fracciones se colectan manualmente.

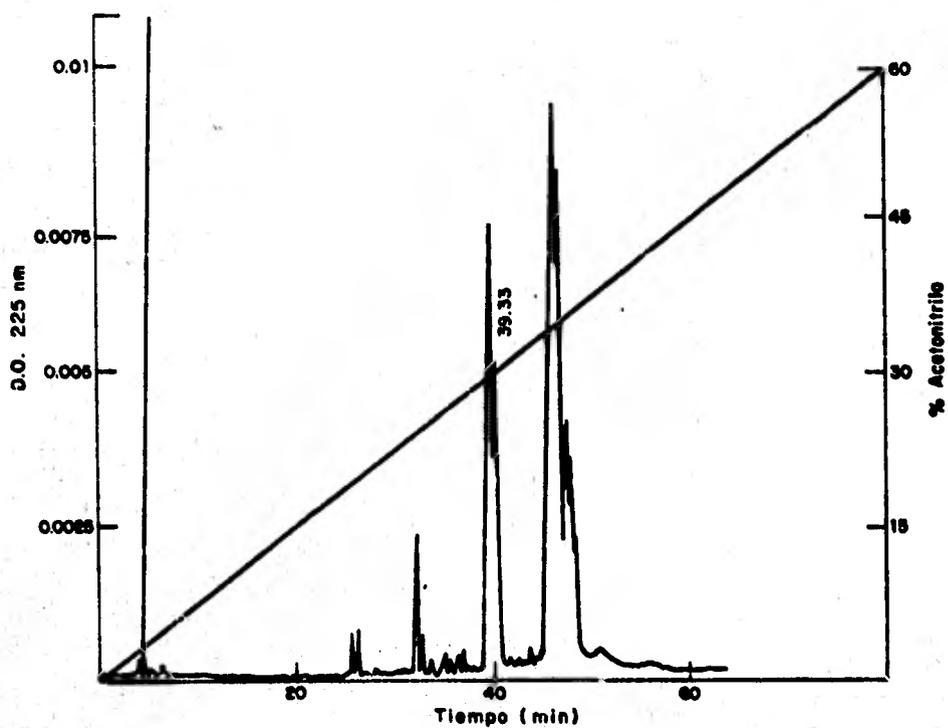


Fig. 11b.- Cromatografía líquida de alta presión (HPLC fase reversa, columna C-18) de fosfolipasa tratada con proteasa V8, el péptido 39.33 se secuenció directamente. La columna se eluyó con un gradiente lineal de 0.0 a 60.0% de acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0.1%. Las fracciones se colectaron manualmente.

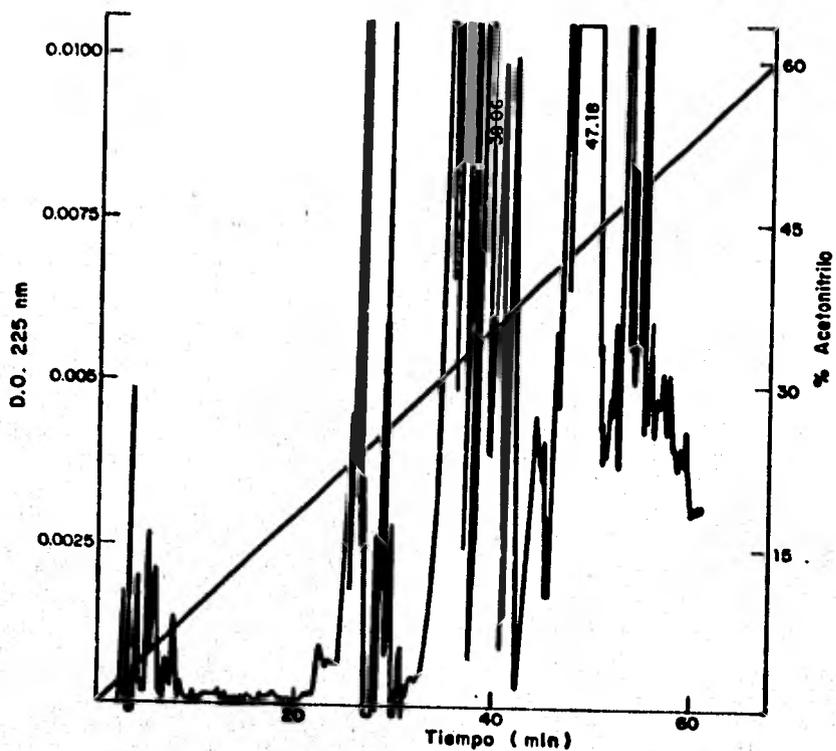


FIG. 12a.- Cromatografía líquida de alta presión (HPLC fase reversa, columna C-18) de fosfolipasa tratada con tripsina, los picos que aparecen señalados con sus tiempos de retención se rechromatografiaron. Estas cromatografías se muestran en las figuras 12b y 12c.

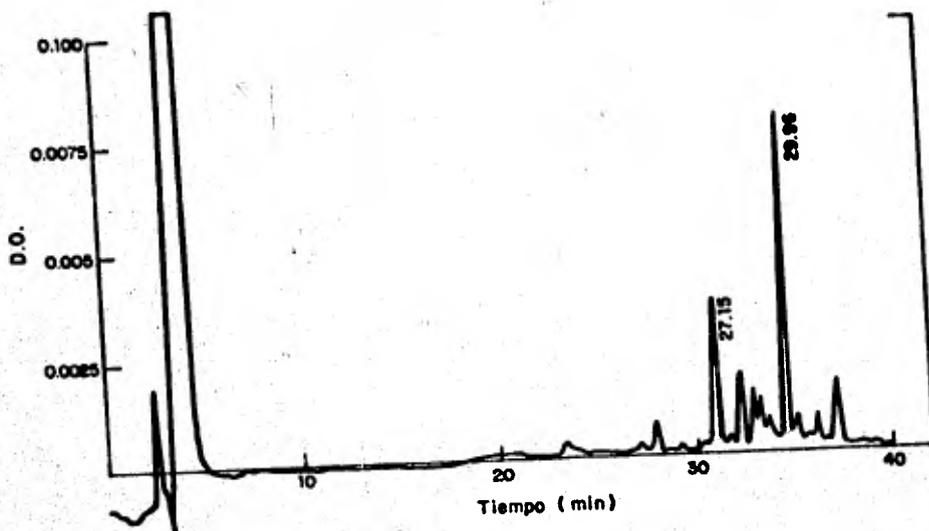


FIG. 12b.- Cromatografía líquida de alta presión (HPLC fase reversa, columna C-18) del péptido 38.06 obtenido con digestión con tripsina de la fosfolipasa. Se secuenciaron los péptidos 27.15 y 29.96.

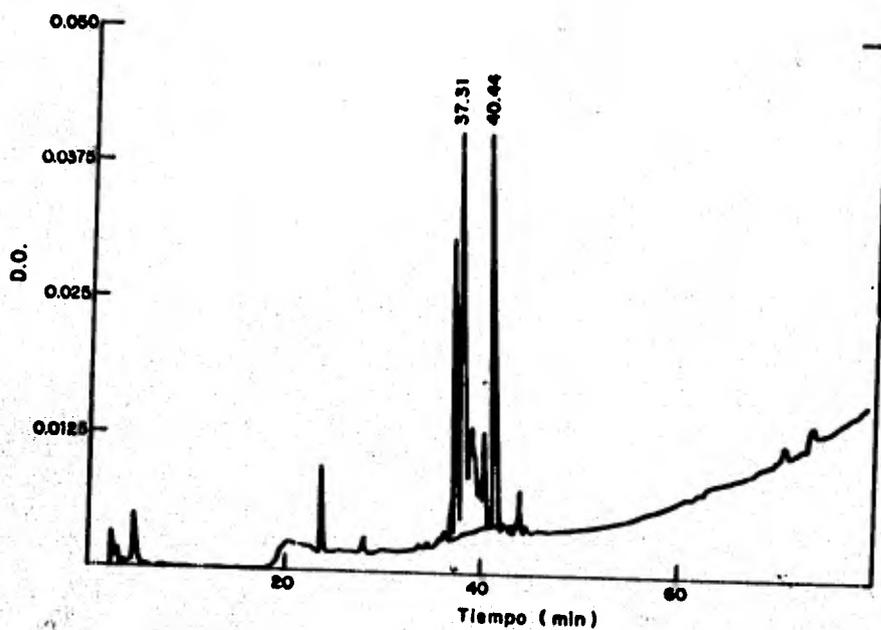


FIG. 12c.- Cromatografía líquida de alta presión (HPLC fase reversa, columna C-18) del péptido 47.18 obtenido con digestión con tripsina de la fosfolipasa. Se secuenciaron los péptidos 37.31 y 40.44.

c) CARACTERIZACION FUNCIONAL DE LA FOSFOLIPASA.

De los ensayos realizados con el sustrato marcado radioactivamente con Carbono 14 (en el carbono del grupo carboxilo del acido graso en la posición 2) se puede concluir que esta fosfolipasa es de tipo A₂, como podemos ver en la Fig.13 se muestra como a medida que pasa el tiempo se va liberando marca radioactiva, en los ácidos grasos libres mientras que en el lisoderivado no hay radioactividad.

La actividad de fosfolipasa de esta toxina es dependiente de Ca⁺⁺ como lo muestra la Fig 14, en la que podemos ver que a una concentración de EDTA de 50mM inhibe totalmente la actividad de fosfolipasa. El 50% de Inhibición de la actividad se obtiene con 15mM de EDTA. En la figura 15 se observa de nuevo el efecto del Ca⁺⁺ sobre la actividad de fosfolipasa, para la enzima dializada extensivamente contra agua destilada encontramos una diferencia significativa en actividad específica, cuando se compara con la enzima que tienen concentraciones entre 30 y 100mM de Ca.

d) ENSAYOS DE CRISTALIZACION.

En los pozos en los que se colocó polietilen-glicol 6000 al 20% y 5.0% en amortiguador de Tris-HCl 10 mM + CaCl₂ 20 mM, a temperatura ambiente, después de dos meses se obtuvieron unos precipitados que tienen una forma cristalina, estos presentan caras lisas y aristas, su longitud más larga es de 0.2 mm estos podrían ser cristales de la fosfolipasa. Los cristales obtenidos con 20.0% de polietilen glicol se muestran en la figura 16, mientras que los obtenidos con 5.0% de polietilen glicol se muestran en la figura 17. En el ensayo con 5.0% de polietilen glicol sólo se obtuvo un unico cristal cuya dimensión más grande es de 0.18 mm, mientras que en el ensayo de 20.0% de polietilenglicol 6000 se obtuvieron varios cristales.

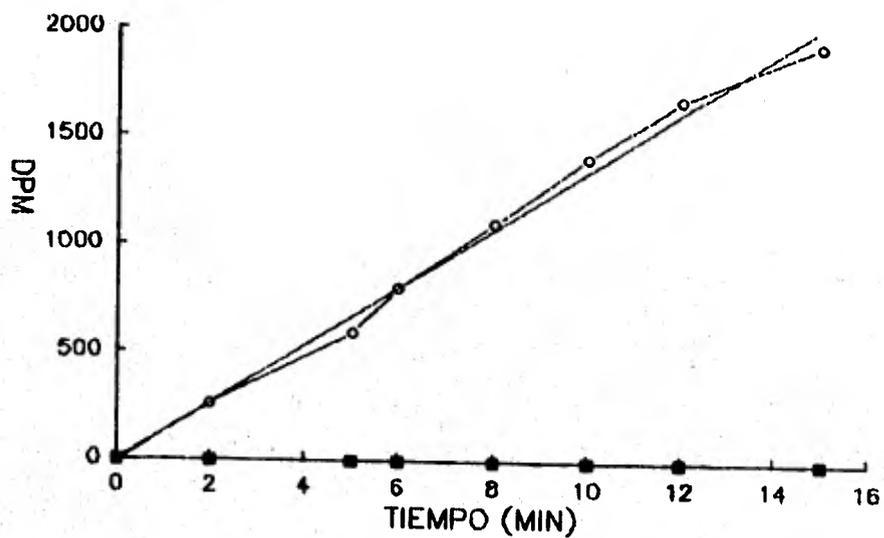


FIG. 13.- ESPECIFICIDAD DE LA FOSFOLIPASA DEL VENENO DE SERPIENTE *Oxyuranus scutellatus scutellatus*.

Actividad de fosfolipasa utilizando 0.05 nmol de enzima y 27.0 nmol de sustrato marcado radioactivamente en el segundo carboxilo de la fosfatidil colina. ● representan acidos grasos libres. ■ representan lisoderivados.

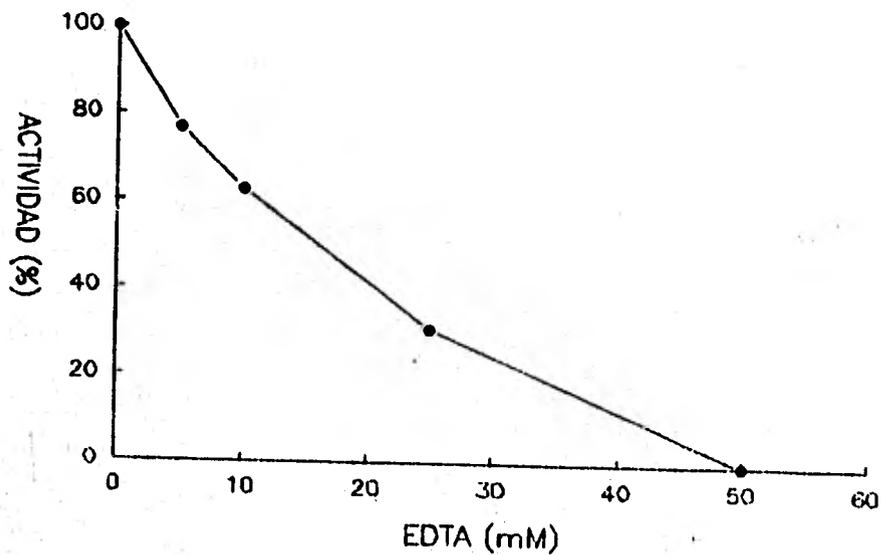


FIG. 14.- DEPENDENCIA DE Ca^{++} DE LA FOSFOLIPASA DE *Oxyuranus scutellatus*.

Efecto inhibitorio del EDTA sobre la actividad de fosfolipasa.
 Cada punto representa un ensayo por triplicado, este se realizó con 2.0 nmol de enzima utilizando el método de Shiloah (1973).
 La enzima es incubada por 5.0 min en presencia de EDTA a temperatura ambiente, a diferentes concentraciones y después se realiza el ensayo de su actividad. En la solución donde se efectúa el ensayo también hay EDTA a la concentración correspondiente.

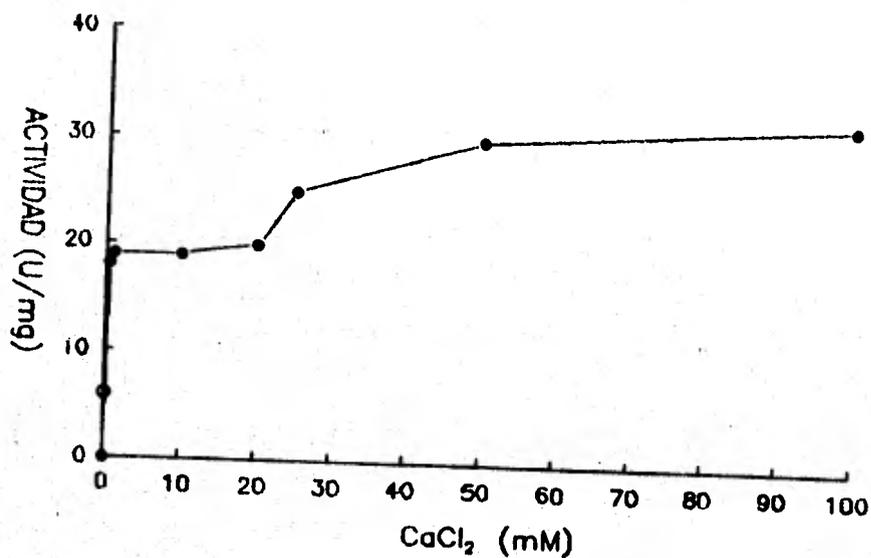


FIG. 15.- EFECTO DEL Ca⁺⁺ EN LA ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASA.

Para esta curva la enzima se dializó extensivamente, contra agua destilada, después se incubó en presencia de CaCl₂ a diferentes concentraciones. La actividad fue medida de acuerdo al método de Shiloah (1973). Cada punto representa un ensayo por triplicado. El punto (0,0) fue obtenido por dializar la enzima contra EDTA 50.0 mM.



FIG. 16.- CRISTALES DE LA FOSFOLIPASA A DE Oxyuranus scutellatus scutellatus

Estos cristales se obtuvieron con la técnica de difusión de vapor en gota suspendida y usando polietilén glicol 6000 al 20% como precipitante. La fotografía se obtuvo con un microscopio de transmisión y con el objetivo 4 X. La dimensión más grande mide 0.2mm.



FIG. 17.- CRISTALES DE LA FOSFOLIPASA A DE Oxyuranus scutellatus scutellatus.

Cristal de fosfolipasa A, obtenido con polietilén glicol 6000 al 5.0%, utilizando la técnica de difusión de vapor en gota suspendida. La fotografía tiene las mismas condiciones que la Fig. 16. En este caso la dimensión más larga mide 0.18 mm.

DISCUSION.

Una de las fosfolipasas del veneno de la serpiente Oxyuranus scutellatus scutellatus, se logró purificar a homogeneidad por medio de tres cromatografías de intercambio iónico y una de afinidad como se demuestra en la figura 8. Además por los resultados de las electroforesis en gel de poliacrilamida podemos decir que el peso molecular de esta toxina es de 16000. Esta toxina forma el 4.0% de la proteína total, y representa el 10.0% de la actividad de fosfolipasa del veneno total. Esta recuperación aparentemente baja de actividad de fosfolipasa, sólo representa una parte de la actividad total, ya que en el veneno al menos existen otras 4 fosfolipasas las cuales fueron aisladas, de la fosfolipasa neurotóxica que nos interesa, por medio de las cromatografía de intercambio iónico.

De acuerdo a los resultados mostrados en la figura 13, esta fosfolipasa es de tipo A_2 , ya que la radioactividad de los ácidos grasos en la posición 2 del glicerol, liberados por la actividad de la enzima, aumenta con el tiempo de forma casi lineal (coeficiente de correlación lineal es de 0.899) debido a que en el intervalo de tiempo que se estudió la actividad de la enzima solo observamos liberación de ácidos grasos de la posición 2 del glicerol podemos decir que esta enzima tiene actividad de fosfolipasa A_2 únicamente. Nuestros resultados no nos muestran ninguna otro tipo de actividad de fosfolipasa.

La actividad de fosfolipasa A_2 es afectada fuertemente por el quelante de iones calcio: ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), a una concentración de 20.0 mM de EDTA se obtiene un 50% de inhibición de la actividad, en condiciones de diálisis contra EDTA 100mM la actividad se pierde totalmente, y en condiciones de diálisis exhaustiva contra agua destilada la actividad sufre un decremento del 30% recuperándose esta actividad al agregarse calcio a la enzima dializada. Por lo tanto todo esto indica que la actividad de fosfolipasa de la toxina es dependiente de calcio.

Comparación de la secuencia de la fosfolipasa obtenida en este trabajo contra una base de secuencias, llamada GenBank (Genetic Sequence Data Bank 15 March 1990 GenBank (R) Release 63.0). El programa utilizado para hacer los alineamientos fue el llamado tfasta realizado por Pearson R. W. (1990). Nuestra secuencia fue estudiada en dos partes la primera corresponde a la secuencia amino terminal y la segunda al carboxilo terminal, ya que nos falta secuenciar una región intermedia que une a estas dos regiones. La comparación la hicimos utilizando dos bases de datos: FVERT y FMAMMAL, FVERT contiene las secuencias de todos los vertebrados que no son inamíferos, y FMAMMAL contiene las secuencias de organismos mamíferos.

Comparación de la secuencia amino terminal de la fosfolipasa A₂ de Oxyuranus scutellatus scutellatus contra la base de secuencias FVERT:

>snkpla2a Notechis scutatus (elapidae) fosfolipasa A₂ neurotóxica
73.3% de identidad en 30 aminoácidos superpuestos

	10	20	30
ossat	NLAQFGFMIRCANGGSR	SALDYADYG	CGCYCGK
	X: ::::	:::::	:::::X
SNKPLA	NLYQFGNMIQCANHGR	RPTLAYADYG	CGCYCGA
	40	50	60

>LSLPLA2R Laticauda laticaudata (elapidae) fosfolipasa A₂

60.0% de identidad en 30 aminoácidos superpuestos

	10	20	30
ossat	NLAQFGFMIRCANGGSR	SALDYADYG	CGCYCGK
	X: ::::	:::::	:::::X
LSLPLA	NLAQFALVIKCADK	GKRPRWHYMDY	GCYCGP
	40	50	60

>SNKPLA2 Aipysurus laevis (elapidae) fosfolipasa A₂ neurotóxica.

63.3% de identidad en 30 aminoácidos superpuestos

	10	20	30
ossat	NLAQFGFMIRCANGGSR	SALDYADYG	CGCYCGK
	X: ::	:::::	:::::X
SNKPLA	NLYQFDNMIQCANK	GKRATWHYMDY	GCYCGS
	40	50	60

>SNKTOXCRA Crotalus durissus (viperidae) crotoxina A.

33.3% de identidad en 30 aminoácidos superpuestos

```
          10      20      30
ossat  NLAQFGFMIRCANGGSRSDYADYGCYCGK
       ..... .. X.....X
SNKTOX SLVEFETLMM-KIAGRSGISYSSYGCYCGA
          90      100     110
```

>SNKTOXCRB Crotalus durissus (viperidae) crotoxina B

43.3% de identidad en 30 aminoácidos superpuestos

```
          10      20      30
ossat  NLAQFGFMIRCANGGSRSDYADYGCYCGK
       .: ::: ::: .. . X: :::::X
SNKTOX HLLQFNKMIKFETRKNAIFF-YAFYGCYCGW
          90      100     110
```

Comparación de la secuencia amino terminal de la fosfolipasa A₂ de Oxyuranus scutellatus scutellatus contra la base de secuencias PIGPLA.

>PIGPLA2RA Sus scrofa (cerdo domestico) fosfolipasa A₂ de páncreas

55.6% de identidad en 27 aminoácidos superpuestos

```

              10      20      30
osnat  NLAQFGFMIRCANGGSRSAIDYADYGCYCGK
        X ||  ||:|  |:. . . . . :X
PIGPLA ALMQFRSMIKCAIPGSHPLMDFNNYGCYCGL
              40      50      60

```

>PIGPLA2R Sus scrofa (cerdo doméstico) fosfolipasa A₂ de páncreas isoenzima mayoritaria.

55.6% de identidad en 27 aminoácidos superpuestos

```

              10      20      30
osnat  NLAQFGFMIRCANGGSRSAIDYADYGCYCGK
        X ||  ||:|  |:. . . . . :X
PIGPLA ALMQFRSMIKCAIPGSHPLMDFNNYGCYCGL
              40      50      60

```

>BOVPLA2R Bos taurus fosfolipasa A₂ pancreática

51.9% de identidad en 27 aminoácidos superpuestos

```

              10      20      30
osnat  NLAQFGFMIRCANGGSRSAIDYADYGCYCGK
        X ||  ||:|  |:. . . . . :X
BOVPLA ALMQFRSMIKCKIPGSHPLMDFNNYGCYCGL
              30      40      50

```

>DOGPPLA2 Canis sp. fosfolipasa A₂ de páncreas

55.6% de identidad en 27 aminoácidos superpuestos

```

              10      20      30
osnat  NLAQFGFMIRCANGGSRSAIDYADYGCYCGK
        X |  |:|  |. . . . . :X
DOGPPA AVMQFRNMIKCTIPGSHPLMDFNNYGCYCGL
              40      50      60

```

Comparación de la secuencia **carboxilo terminal** de la fosfolipasa A, de Oxyuranus scutellatus scutellatus contra la base de secuencias **FVET**

>SNKPLA2A Notechis scutatus (elapidae) fosfolipasa A, neurotóxica

62.0% de identidad en 50 aminoácidos superpuestos

	10	20	30	40	50
ossct	SWKCYGKAPSCNTKTRCQRFVCNCDAKAADCFARSPYQKKNWNINTKARC				
	X:
SNKPLA	SWQCIKTPTCNSKTGCERSVCDATAAKCFAPYNNKKNYNIDTEKRC				
	110	120	130	140	150

>LSLPLA2R Laticauda laticaudata (elapidae) fosfolipasa A,

68.1% de identidad en 47 aminoácidos superpuestos

	10	20	30	40	50
ossct	SWKCYGKAPSCNTKTRCQRFVCNCDAKAADCFARSPYQKKNWNINTKARC				
	: . . . X:
LSLPLA	SYCGGDPYCNKTECQRFVCDVRAADCFARYPNKKNYNINTSKRC				
	110	120	130	140	150

>SNKPLA2 Aipysurus laevis (elapidae) fosfolipasa A, neurotóxica

54.0% de identidad en 50 aminoácidos superpuestos

	10	20	30	40	50
ossct	SWKCYGKAPSCNTKTRCQRFVCNCDAKAADCFARSPYQKKNWNINTKARC				
	X:
SNKPLA	SWQCTENVPTCNSESGCQKSVCCATAAKCFAPYNNKKNYNINT-SNC				
	110	120	130	140	150

>SNKTOXCRB Crotalus durissus (viperidae) crotoxina B

72.7% de identidad en 11 aminoácidos superpuestos

	10	20	30	40	50
ossct	SWKCYGKAPSCNTKTRCQRFVCNCDAKAADCFARSPYQKKNWNINTKARC				
	X:
SNKTOX	HDCCYGLAKCNTKWDIYPYSLKSGYITCGKGTWCEEQICECDRVAECL				
	130	140	150	160	170

Comparación de la secuencia **carboxilo terminal** de la fosfolipasa A₂ de Oxyuranus scutellatus scutellatus contra la base de secuencias **FINAL**

>DOGPLA2 Canis sp. fosfolipasa A₂ de páncreas

45.1% de identidad en 51 aminoácidos superpuestos

	10	20	30	40	50
ossct	SWKCYGKAPSCNTKTR-CQRFVCNCDAKAADCFARSPYQKKNWNINTKARC				
 X:X :
DOGPL	SYSCSGSEITCSSKNKDCQAFICNCDRSAAICFSKAPYNKEHKNLDTKKYC				
	110	120	130	140	150

>PIGPLA2R Sus scrofa (cerdo doméstico) fosfolipasa A₂ de páncreas isoenzima mayoritaria.

43.1% de identidad en 51 aminoácidos superpuestos

	10	20	30	40	50
ossct	SWKCYGKAPSCNTKTR-CQRFVCNCDAKAADCFARSPYQKKNWNINTKARC				
 X:X :
PIGPLA	SYSCSNTEITCNSKNNACEAFICNCDRNAAICFSKAPYNKEHKNLDTKKYC				
	110	120	130	140	150

>PIGPLA2RA Sus scrofa (cerdo domestico) fosfolipasa A₂ de páncreas

43.1% de identidad en 51 aminoácidos traslapados

	10	20	30	40	50
ossct	SWKCYGKAPSCNTKTR-CQRFVCNCDAKAADCFARSPYQKKNWNINTKARC				
 X:X :
PIGPLA	SYSCSNTEITCNSKNNACEAFICNCDRNAAICFSKAPYNKEHKNLDTKKYC				
	110	120	130	140	150

>BOVPLA2R Bos taurus fosfolipasa A₂ pancreática

37.3% de identidad en 51 aminoácidos superpuestos

	10	20	30	40	50
ossct	SWKCYGKAPSCNTKTR-CQRFVCNCDAKAADCFARSPYQKKNWNINTKARC				
 X:X :
BOVPLA	SYSCSNNEITCSENNAACEAFICNCDRNAAICFSKVPYNKEHKNLDTKK-KC				
	110	120	130	140	150

En estos alineamientos las secuencia de caracteres que siguen al signo ">" son los índices de la secuencia con la que se encontró similitud en la base de datos.

ossat: es la secuencia amino terminal de la fosfolipasa de Oxyuranus scutellatus

ossc1: es la secuencia carboxilo terminal de la fosfolipasa de Oxyuranus scutellatus

Los dos puntos ":" indican aminoácidos idénticos en ambas secuencias.

El punto "." indica substitución de aminoácidos según la matriz PAM250 (Dayhoff M. et al. (1978)). Esto quiere decir que los cambios de aminoácidos están dentro de las posibles substituciones que se originan en una familia de proteínas relacionadas. Las X's marcan la longitud de la secuencia problema que es similar a la secuencia en la base de datos, lo que queda fuera de las X's indica similitud pero para encontrarla se tomaron en cuenta deleciones o inserciones.

Al comparar nuestra secuencia amino terminal y carboxilo terminal contra un banco de datos bastante extenso, la similitud más grande siempre se encontró con fosfolipasas de serpiente y de mamíferos, ambas partes amino terminal y carboxilo terminal, tienen similitud alta con las mismas proteínas de las bases de datos.

De acuerdo con esta comparación podemos decir que la fosfolipasa purificada por nosotros, en cuanto a su secuencia de aminoácidos es muy parecida a las fosfolipasas neurotóxicas de otras serpientes e inclusive tiene similitud con las fosfolipasas A₂ de mamíferos. Este dato se ve reforzado por la similitud encontrada con la fosfolipasa A₂ de la serpiente Akistrodon halys blomhoffii con la cual nuestra fosfolipasa conserva aminoácidos en común y que además son comunes a otras 30 fosfolipasas. La comparación con la fosfolipasa de Akistrodon halys blomhoffii a continuación la discutimos:

Al comparar nuestra secuencia con la obtenida por Tomoo K. et. al (1989), de una fosfolipasa básica del veneno de serpiente Akistrodon halys blomhoffi, tenemos lo siguiente:

```

1      10      20      30      40      50      60
(1) SIMQFETLINLIAGRSGIWIYYGSYGCYCGAGGQGRPOASDRCCFVHDCCYGVKVTGCDFK
    *  **  *
          ***** ** * * * * * ** * * *

```

```

1      10      20      30      40      50      60
(2) NLAQFGFMIRCANGGSRBALDYADYGCYCGE-----
    *  **  *
          *****

```

```

70      80      90      100      110
(1) LDVYTYTENGAIVCGGDDPCFKQICECDKDAACFRDNIDTYDNKYWFF
    *  *      *      *      * * * * * *

```

```

70      80      90      100      110
(2) -----SWICYGKAPSCNTRCQRVCMCDAKAAKCFAREPYQKQW
          *

```

```

115  120
(1) PANCGQRESEPC
    *

```

```

115
(2) NINTEARE

```

(1) Fosfolipasa básica de A. halys blomhoffi, los asteriscos debajo de esta secuencia indican aminoácidos conservados en 30 fosfolipasas en las que realizó estudios de homología Tomoo K. et. al 1989.

(2) Fosfolipasa neurotóxica del veneno de O. scutellatus scutellatus, (ESTA TESIS). Los símbolos (*) debajo de la secuencia indican los aminoácidos homólogos de ambas fosfolipasas.

De esta comparación obtenemos la siguiente información:
 Los aminoácidos L, Q, F, I de la región amino-terminal son compartidos con las otras 30 fosfolipasas estudiadas por Tomoo K. et. al 1989.

En nuestra secuencia hasta el momento obtenida, podemos observar que aparecen los aminoácidos Gln-30 y Thr-28 que son aminoácidos involucrados en el enlace al Ca^{++} , en nuestra secuencia también aparecen los aminoácidos Gln-4 y Tyr-73 que son aminoácidos del sitio activo de las fosfolipasas A_2 , de acuerdo al modelo propuesto por Dijkstra 1980, de acuerdo a este autor el sitio activo también tiene a los aminoácidos Asn-71 y Asp-99, en nuestra secuencia estos aminoácidos son diferentes ya que nosotros tenemos Lis en la posición 71 y Cys en la posición 99.

Admitiendo la similitud de la secuencia propuesta arriba podemos decir que la secuencia de aminoácidos de esta fosfolipasa conserva aminoácidos de la región amino terminal y algunos aminoácidos del sitio de enlace al calcio y del sitio activo. Los aminoácidos del sitio activo, que hasta ahora hemos secuenciado, presentan algunas substituciones. Estas diferencias podrían esperarse, dado que nuestra fosfolipasa es también neurotóxica y ésta otra actividad debe requerir una estructura especial dada por la secuencia de aminoácidos. Los aminoácidos involucrados en el enlace al ion Ca^{++} , que hasta este momento conocemos, están estrictamente conservados, hecho que concuerda perfectamente con la dependencia de Ca^{++} de la actividad de fosfolipasa A_2 .

Los aminoácidos que están conservados con respecto a otras 30 fosfolipasas secuenciadas según Kouji Tomoo et. al 1989, están en posiciones espaciales semejantes a las de los aminoácidos de las fosfolipasas de Crotalus atrox y de la fosfolipasa de páncreas bovino, estas posiciones son esenciales para la actividad catalítica y neurotóxica.

Todavía falta secuenciar 70 aminoácidos, según nuestros análisis de aminoácidos debemos esperar 150 aminoácidos, los aminoácidos que faltan por secuenciar están en un fragmento que va del aminoácido 31 al 68 y otro fragmento de 33 a.a. que seguramente es la región carboxilo terminal, hasta este momento el análisis de aminoácidos es coherente con la secuencia de nuestra fosfolipasa.

El conocimiento de la secuencia de aminoácidos completa será de gran ayuda para determinar la relación estructura-función de esta toxina a nivel molecular en el sistema nervioso de mamíferos.

Los ensayos de cristalización que dieron origen a formaciones que macroscópicamente se observan como cristales, son los que se realizaron con polietilenglicol 6000 al 5% y 20%, los cristales más grandes corresponden a un tamaño de 0.2 mm. Este tamaño por ahora no ha sido suficiente para obtener un patrón de difracción de rayos X, por lo que es necesario obtener condiciones donde se obtengan cristales mucho más grandes de al menos el doble de tamaño.

CONCLUSIONES.

- 1.- Se purificó a homogeneidad una de las fosfolipasas neurotóxicas del veneno de la serpiente Oxyuranus scutellatus scutellatus. Esta proteína representa el 4.0% de la proteína total y el 10.0% de la actividad de fosfolipasa del veneno total.
- 2.- El peso molecular de esta proteína es de 16000 y está compuesta de 150 aminoácidos.
- 3.- El tipo de actividad de fosfolipasa es A₂ dependiente de calcio.
- 4.- La secuencia de la proteína hasta este momento obtenida, corresponde a 30 aminoácidos de la región amino terminal, y una región que va del aminoácido 70 al 118, faltándonos por secuenciar una región intermedia del aminoácido 31 al 68 y la región carboxilo-terminal.
- 5.- Los estudios de similitud de la región amino terminal y carboxilo terminal nos han mostrado que la fosfolipasa estudiada en este trabajo pertenece a la familia de fosfolipasas tipo A₂ neurotóxicas de venenos de serpiente.
- 6.- Los ensayos de cristalización dieron origen a formaciones, que macroscópicamente parecen cristales de la proteína purificada, estas formaciones miden 0.2mm en su dimensión más larga.

APENDICE

BREVE DESCRIPCION DE LA SERPIENTE Oxyuranus scutellatus scutellatus. (Datos obtenidos de Mirtschin R. & Davis R. 1985).

Taipan Oxyuranus scutellatus (Peters 1867).

El género Oxyuranus está caracterizado por un gran tamaño (hasta 4.0 m), las escamas del cuerpo son rómbicas hasta antes del cuello; las escamas suboculares esta ausentes, una sola escama anal, y escamas subcaudales divididas; el color de la serpiente es café oscuro en la parte dorsal, y pálido o café crema en la parte lateral del cuerpo, la cabeza es pálida o amarilla en las etapas juveniles y obscura en la adulta. (ver Fig. 2.1).

DISTRIBUCION GEOGRAFICA.

Esta serpiente es una de las más venenosas del mundo, su nombre común es Taipán y se halla distribuida en el norte y el este de Australia con una subespecie en Nueva Guinea. (Ver Fig. 2.2).

HABITAT.

De hábitos diurnos y crepusculares, algunas veces nocturnos. Se encuentra en un amplio rango de habitats desde tropicales húmedos hasta selva montañosa. Esta serpiente se alimenta principalmente de pequeños mamíferos.

SUBESPECIES.

scutellatus (Australia)

canni (Nueva Guinea)

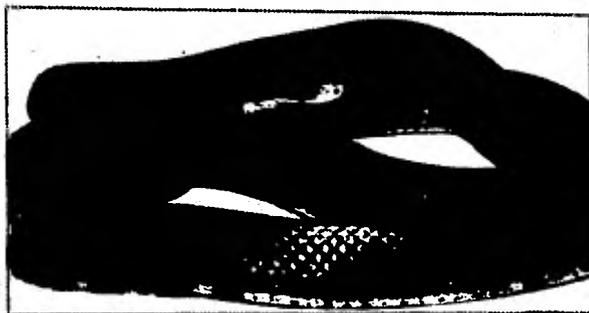


FIG.2.1.- Serpiente adulta Taipan Oxyuranus scutellatus scutellatus. (Fotografías tomadas de Mirtechin P. & Davis R. 1985)

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



FIG.2.2.- Distribución geográfica del Taipan Australiano.

BIBLIOGRAFIA.

Brian A.B., Cohen A.S. & Tarvin L.T. (1984) Rapid analysis of amino acids using precolumn derivatization. *Journal of Chromatography*, **336**:93-104.

Breithaupt A.H., Rüksamen K. & Haberman E. (1974) Biochemistry and pharmacology of crotoxin complex. Biochemical analysis of crotoxin and basic *Crotalus* phospholipase A *Eur.J.Biochem.* **49**:333-345.

Brunie S., Bolin J., Gewirt D. & Sigler P. B. (1985) The refined crystal structure of dimeric phospholipase A at 2.5 Å. Access to shielded catalytic center. *J. Biol. Chem.* **260**: 9742-9749.

Cleland, W. W. (1964) *Biochemistry* **3**, 480.

Dayhoff M., Schwartz R. M. and Orcutt B. C. (1978) Atlas of protein sequence and structure (Dayhoff M. ed.) vol 5 suppl.3, p.345. National Biomedical Research Foundation. Silver Spring, Maryland, 1978.

Dijkstra B.W., Drenth J., Kalk K.H., Vardermaelen P.J. (1978) Tree dimensional structure and disulfide bond connections in bovine pancreatic phospholipase A. *J. Mol. Biol.* **124**:53-60.

Dijkstra B.W., Kalk K.H., Hol W.G.J., Drenth J., (1981) structure of bovine pancreatic phospholipase A₁ at 1.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **147**:97-123.

Dijkstra B. W., Renetseder R., Kalk K. H., Hol W.G.J. & Drenth J. (1983). Structure of porcine pancreatic phospholipase A at 2.6 Å resolution and comparison with bovine phospholipase A₁. *J. Mol. Biol.* **168**:163-179.

Dutton M. J., Eaker D. & Hider C.R. (1983) Conformational properties of phospholipases A₂. Secondary-structure prediction, circular dichroism and relative interface hydrophobicity. *Eur. J. Biochem.* **137**: 537-544.

Edman P. & Begg G. (1967) A Protein Sequenator. *Eur. J. Biochem.* **1**(1):80-91.

Fohlman J., Eaker D., Karlsson E., Thesleff S. (1976) Talpoxin, an extremely potent presynaptic neurotoxin from venom of the Australian snake taipan (Oxyuranus scutellatus scutellatus) Eur. J. Biochem 66:457-469.

Gomez F., Vandermeers A., Vandermeers-Piret M.C., Herzog R., Rathe J., Stevenat M., Winand J., Crostophe J. (1989) Purification and characterization of five variants of Phospholipase A₂ and Complete Primary Structure of Main Phospholipase A₂ variant in Heloderma suspectum (Gila Monster) venom. Eur. J. Biochem. 186: 23-33

Halpert J. & Eaker D. (1975) Amino acid sequence of presynaptic neurotoxin from venom of Notechis scutatus scutatus (Australian tiger snake) J. Biol. Chem. 250:6990-6997.

Heinrikson R.L. & Meredith C.S. (1983) Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: Precolumn derivatization with phenylisothiocyanate.

Howard B.D. (1975) Effects of B-bungarotoxin on mitochondrial respiration are caused by associated phospholipase A activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 67:58-65.

Kannan K.K., Lövgrens, Cid-Dresdener H., Petef M., Eaker D. (1977). Crystallization and crystallographic data of Notexina: a neurotoxic basic phospholipase A from the venom of Australian tiger snake Notechis scutatus scutatus Toxicon 15:435-439.

Kraut J. (1977) Serine proteases: Structure and mechanism of catalysis. Annu. Rev. Biochem. 46:331-358.

Komiyama M., Bender M.L. (1979) Do cleavage of amides by serine proteases occur through a stepwise pathway involving tetrahedral intermediates?. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:557-560.

Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature Lond. 227: 680-685.

MacPherson Alexander (1985) Crystallization of macromolecules: General Principles. *Methods in Enzymology*. 114:112-125.

Mark J. Dufton & Robert C. Hider (1983) Classification of phospholipases A according to sequence. *Eur. J. Biochem.* 137:545-551.

Mirtschin P. & Davis R. (1985) *Dangerous snakes of Australia*. Rigby Publishers. Adelaide Australia.

Moore S. & Stein W.H. (1963) *Methods Enzymol.* 6:819.

Opperdoes F.R. & Van Roy J. (1982) The phospholipases of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms and cultured procyclics. *Molecular and Biochemical Parasitology* 5: 309-319.

Pearson W. R. (1990) Rapid and sensitive sequence comparison with FATP and FASTA. *Methods in Enzymology* 183: 63-98.

Possani L.D., Martin B.M., Svendsen I., Rode G.S. & Erickson B. W. (1985) Toxins from the Brazilian scorpion *Titus serrulatus* Lutz and Mello: Primary structure and sequence comparison by metric analysis. *Biochem. J.* 229:739-750.

Peck M., Keith C., Feldman D., Singler P.B. (1975) Characterization of crystals of two venom phospholipases A. *J. Mol. Biol.* 97:395-397.

Reisner A.H., Nemes P., Bochoitz C. (1975). The use of coomassie brilliant blue G-250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrilamide gels. *Analyt. Biochem.* 64:509-516.

Rock O.C. & Snyder F. (1975). Rapid purification of phospholipase A from *Crotalus adamanteus* venom: by affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* 250:6564-6566.

Shloah J. Klibansky C., De Vries A. & Berger A. (1973). Phospholipase B activity of purified phospholipase from *Vipera palestinae* venom. *J. Lip. Res.* 14:267-276.

Shipolini R.A., Callewaert G.L., Cotrell R.C., Vernon C.A. (1974) The amino acid sequence and carbohydrate content of phospholipase A from bee venom. *Eur. J. Biochem.* **48**:465-476.

Soea P. B., Alagón C. A., Martín B. M. & Possani D. L. (1986) Biochemical characterization of phospholipase A2 purified from the venom of the Mexican beaded lizard (Heloderma horridum horridum Wiegmann) *Biochemistry* **25**:2927-2933.

Strong P. N., George J., Oberg S. G. & Kelly R.B. (1976) B-bungarotoxin a presynaptic toxin with enzymatic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**:178-182.

Tomoo K., Ohishi H., Ishida T., Inoue M., Ikeda K., Aoki Y., & Semejimas Y. (1989) Revised amino acid sequence, Crystallization, and Preliminary X-ray Diffraction Analysis of Acid Phospholipase A from the Venom of Agkistrodon halys blomhoffii. *J. Biol. Chem.* **264**: 3636-3638.

Tu A.T. (ed) (1977) *Venoms, Chemistry and Molecular Biology*. John Wiley, New York. 673

Weber K. & Osborn M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**:4406-4412.

Wells M. A. (1973) Effects of modification chemical on activity of Crotalus adamanteus phospholipase A. Evidence for an essential aminogroup. *Biochemistry* **12**:1086-1093.

Wernick J. F., Vanier A. D. & Howard B. D. (1975) The mechanism of action of B-bungarotoxin. *J. Neurochem.* **25**:483-496.

Verheij H.M., Boffa M.C., Rothen Ch., Bryckaert M.C., Verger R., de Haas G. H. (1980a). Correlation of enzymatic activity and anticoagulant properties of phospholipase A. *Eur. J. Biochem.* **112**: 25-32.

Verheij H. M., Volwerk J.J., Jansen E.H.J.M., Puljk W.C., Dijkstra B. W. Drenth J., De Haas G. H. (1980b). Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A. Role Histidine and calcium ion in catalytic mechanism. *Biochemistry* **19**:743-750.

Verheij H. M., Slotboom A. J., de Haas G. H. (1981) Structure and function of phospholipase A2. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 91:92-160.