



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

Estructura primaria de una PLA₂ básica, miotóxica local y sistémica, deducida a partir de mRNA extraído de veneno total de *Crotalus durissus terrificus*

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biología
Molecular

AUTOR

Bertha Roxana MESTAS VALDIVIA

ASESOR

Dr. Luis Alberto PONCE SOTO

Lima, Perú

2013

RESUMEN

A partir del veneno total de *Crotalus durissus terrificus* procedente de la provincia de Tambopata - Madre de Dios, se ha logrado aislar el mRNA que codifica la proteína PLA 2, utilizando una técnica simple. Esto es, amplificando el cDNA que codifica la PLA 2 D49 a través de RT-PCR.

El análisis del cDNA codificador de PLA 2 muestra que esta tiene un marco de lectura abierto de 414 pares de bases que codifican un polipéptido de 138 aminoácidos, con un péptido señal de 16 residuos de aminoácidos, seguido de una secuencia polipeptídica de 122 aminoácidos que corresponden a la PLA 2. El análisis también muestra que la proteína está compuesta por 33 aminoácidos con carga: 11 aminoácidos ácidos, 22 aminoácidos básicos, 44 aminoácidos polares y 28 aminoácidos hidrofóbicos, con un punto isoelectrico de 8.58 y una masa molecular de 14312.52 Da. El análisis de homología y árbol filogenético muestran que esta PLA 2 presenta un alto grado de homología y forma parte de las PLA 2 básicas N6F24D49.

Además, se ha logrado purificar dos isoformas de PLA 2 (fracciones V y VI) empleando cromatografía en HPLC de fase reversa con un alto grado de pureza, según lo revelado por la SDS-PAGE. Al realizar la repurificación de la fracción V, esta se muestra como un monómero, pues el espectro revela la presencia de una sola cadena polipeptídica con una masa molecular de 14238.71 Da. Según el análisis biológico, la PLA 2 V es capaz de elevar los niveles de CK plasmáticos cuando es inyectada por vía intramuscular y por vía intravenosa.

Palabras clave: PLA 2, cDNA, *Crotalus durissus terrificus*

ABSTRACT

From the whole venom of *Crotalus durissus terrificus* from, Tambopata-Madre de Dios, mRNA encoding a fosfolipase A 2 (PLA 2) protein has been isolated, using a simple technique. That is, cDNA encoding the PLA 2 D49, has been amplified by RT-PCR.

Analysis of cDNA encoding PLA 2, has shown that this open reading frame of 414 bp encoding a polypeptide of 138 amino acids with a signal peptide of 16 amino acid residues, followed by a polypeptide sequence of 122 amino acids corresponding to PLA 2. The analysis also shows that the protein is composed of 33 charged amino acids: 11 amino acids acidic, 20 basic amino acids, 44 polar amino acids and 28 hydrophobic amino acids, having an isoelectric point of 8.58 and a molecular mass of 14312.52 Da. The homology and phylogenetic tree analysis shows that this PLA 2 has a high degree of homology and belongs to the basic PLA 2 N6F24D49.

Moreover, two isoforms of PLA 2 (fractions V and VI) have been purified with a high degree of purity, using reverse phase chromatography HPLC, as revealed by SDS-PAGE. When performing the repurification of fraction V, it is shown as a monomer, because the spectrum reveals the presence of a single polypeptide chain with a molecular weight of 14238.71 Da. According to biological analysis, this PLA 2 V can elevate plasma CK levels when injected intramuscularly and intravenously.

Key words: PLA 2 , cDNA, *Crotalus durissus terrificus*